

**Vergleichende Analyse verschiedener
Stressreaktionen alter Landsorten und
moderner Hohertragsorten von Gerste
(*Hordeum vulgare* L.)**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Simone Gatzke
aus Meerbusch

Düsseldorf, Mai 2012

aus dem Institut für Bio- und Geowissenschaften Pflanzenwissenschaften
(IBG-2)
des Forschungszentrums Jülich

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Ulrich Schurr
Korreferent: Prof. Dr. Jürgen Zeier

Tag der mündlichen Prüfung: 04.07.2012

Zusammenfassung	i
Abstract	iii
Abkürzungsverzeichnis	v
1. Einleitung	1
1.1 Pflanzliche Abwehrmechanismen	2
1.2 BVOC als pflanzliche Abwehrmechanismen	4
1.3 Anwendung von abiotischen Stressoren (MeJA und Ozon) für die Induktion von BVOC-Emissionen	6
1.4 Biosynthese der BVOC	6
1.4.1 Oktadecanoidweg	8
1.4.2 Terpenoide	10
1.4.2.1 Der Acetat-Mevalonat-Weg: HMG-CoA-Reduktase	12
1.4.2.2 Der MEP-Weg: DXS und DXR	12
1.4.3 Aromatische BVOC	13
1.5 Gerste als Modellorganismus	15
1.6 Zielsetzung der Arbeit und prinzipielle Vorgehensweise	16
2. Material und Methoden	18
2.1 Chemikalien.....	18
2.2 Geräte	19
2.3 Pflanzenmaterial	20
2.4 Pflanzenanzucht.....	22
2.5 Aufbau der Pflanzenkammern.....	22
2.6 Aufbau einer Screening Anlage	24
2.7 Gasphasenmessungen	26
2.8 Bestimmung von Flussdichten	27
2.9 Expositionen von Gerstenpflanzen.....	28

Inhaltsverzeichnis

2.10	Blattflächenbestimmung und Probennahme.....	30
2.11	Kontrollexperimente und Fehlerrechnung.....	30
2.12	Bestimmung der endogenen Jasmonsäure (JA)-, Salicylsäure (SA)- und	
	Salicylsäureglucosid (SAG)-Gehalte	33
2.13	Molekularbiologische Methoden.....	36
2.13.1	Verwendete genspezifische Primer	36
2.13.2	Isolierung der Gesamt-RNA aus dem Pflanzenmaterial	40
2.13.3	cDNA-Herstellung (Reverse Transkription)	40
2.13.4	Reverse Transkription - Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) zur Amplifikation ..	
	der cDNA Proben	40
2.13.5	Gelelektrophoretische Analyse der DNA.....	41
2.13.6	Elution der PCR-Produkte aus dem Agarosegel	41
2.13.7	TOPO-TA-Klonierung	41
2.13.7.1	Klonierung.....	42
2.13.7.2	Transformation	42
2.13.7.3	Plasmid-Mini-Präparation	42
2.13.7.4	Kolonie-PCR	42
2.13.7.5	Sequenzanalyse	43
2.13.8	quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR).....	43
2.14	Pathogenbefall mit <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	45
3.	Ergebnisse	46
3.1	Muster der BVOC-Emissionen nach MeJA- und Ozonexposition	46
3.2	zeitlicher Verlauf der BVOC-Emissionen nach MeJA- bzw. Ozonexposition von .	
	Gerste.....	51
3.3	Aufbau einer Screening-Anlage	54
3.4	Screening-Experimente der 31 Gerstensorten nach MeJA-Exposition.....	55

3.5	Emissionen der Kontrollpflanzen im Vergleich zu den nach MeJA- oder Ozonexposition.....	57
3.6	Photosynthese- und Transpirationsraten der verschiedenen Gerstensorten	59
3.7	Untersuchungen nach MeJA-Exposition.....	62
3.7.1	Emissionen nach MeJA-Exposition	62
3.7.1.1	Vergleich der Emissionen nach MeJA-Exposition	62
3.7.1.2	Vergleich des Musters der BVOC-Emissionen nach MeJA-Exposition.....	65
3.7.2	Endogene JA- und SAG-Gehalte nach MeJA-Exposition	67
3.7.2.1	Endogener JA-Gehalt nach MeJA-Exposition	67
3.7.2.2	Endogener SA- und SAG-Gehalt nach MeJA-Exposition	71
3.7.3	Einfluss der MeJA-Applikation auf Genexpression.....	73
3.8	Untersuchungen nach Ozonexposition.....	76
3.8.1	Emissionen nach Ozonexposition	76
3.8.1.1	Vergleich der Emissionen nach Ozonexposition.....	76
3.8.1.2	Vergleich der Muster der Mono- und Sesquiterpenemissionen nach Ozonexposition.....	79
3.8.2	Vergleich der BVOC-Emissionen nach Ozonexposition mit denen nach einem Pathogenbefall mit <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	81
3.8.3	Endogene Gehalte von JA, SA und SAG nach Ozonexposition.....	83
3.8.3.1	Endogener JA-Gehalt drei und 24 Stunden nach Ozonexposition	84
3.8.3.2	Endogene SA- und SAG-Gehalte drei und 24 Stunden nach Ozonexposition.....	86
3.8.4	Endogene Gehalte von JA, SA und SAG nach einem Pathogenbefall am Beispiel der Sorte BCC 173	88
3.8.5	Einfluss der Ozonexposition auf die Genexpression.....	89
4.	Diskussion	92
4.1	Reaktionen der verschiedenen Gerstensorten auf MeJA-Exposition	93

Inhaltsverzeichnis

4.1.1	Untersuchung der Emissionen der 31 Gerstensorten (Screening-Experiment).....	93
4.1.2	Detaillierte Untersuchung der Reaktion von alten und modernen Gerstensorten..... auf MeJA-Exposition (6 Sorten mit je 6 Wiederholungen)	93
4.1.2.1	Nachweis von Terpenoidemissionen während MeJA-Exposition.....	94
4.1.2.2	Kein Nachweis von GLV-Emissionen während MeJA-Exposition	100
4.1.2.3	Kein Nachweis aromatischer BVOC-Emissionen während MeJA-Exposition ..	101
4.1.2.4	Vergleich MeJA – Herbivorie Reaktionen	103
4.2	Reaktionen der Gerstensorten auf die Ozonexposition	104
4.2.1	Nachweis von GLV-Emissionen nach Ozonexposition	105
4.2.2	Nachweis von Terpenoidemissionen nach Ozonexposition	106
4.2.3	Kein Nachweis von MeSA-Emissionen nach Ozonexposition	109
4.2.4	Vergleich Ozon – Pathogen Reaktionen	110
4.3	Schlussbetrachtung und Ausblick	116
5.	Literatur	118
	Danksagung	144
	Erklärung	146

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob Kulturpflanzen durch die Züchtung in Richtung Hohertrag veränderte Stressantworten auf verschiedene abiotische und biotische Stressoren im Vergleich zu ihren Vorfahren aufweisen.

Dazu wurden erstmalig die Emissionen biogener flüchtiger organischer Verbindungen (BVOC; biogenic volatile organic compounds) von verschiedenen Gerstensorten analysiert. Es wurden die Emissionsraten (Quantität) und die Emissionsmuster (Qualität) der emittierten BVOC heutiger Hohertragsorten mit denen alter Landsorten verglichen, um Anhaltspunkte auf mögliche Veränderungen der Stressreaktionen der Kulturpflanzen zu erlangen. BVOC-Emissionen gehören dem Sekundärmetabolismus an und spielen häufig eine Rolle bei den Interaktionen von Pflanzen mit ihrer biotischen Umwelt. Ein Rückgang der Abwehrmechanismen aufgrund der Züchtung der Kulturpflanzen in Richtung Hohertrag könnte sich demnach in einem Verlust der Fähigkeit BVOC zu emittieren widerspiegeln. Die Analyse der Emissionsmuster der verschiedenen Gerstensorten erfolgte dabei jeweils nach Applikation von Methyljasmonat (MeJA) und Ozon, als Trigger typischer pflanzlicher Stressreaktionen.

Um den Durchsatz der vermessenen Pflanzen zu erhöhen wurde eine Anlage aufgebaut, mit der mehrere Experimente parallel durchgeführt werden konnten. In einem ersten Screening wurden die durch Applikation mit MeJA induzierten BVOC-Emissionen 31 verschiedener Gerstensorten analysiert (n=1). Dieses erste Screening sollte Hinweise auf die für weiterführende Experimente am besten geeigneten Sorten liefern. Wiederholte Messungen mit Pflanzen einer Sorte (n=2) zeigten aber so hohe Variabilitäten der Emissionsraten, dass eine Eingruppierung in stark bzw. schwach emittierende Sorten nach einem Experiment nicht möglich war. Die Analyse der Emissionen wurde auf sechs Sorten eingeschränkt. Drei alte Landsorten (BCC 1479, BCC 173 und BCC 869) sowie drei moderne Hohertragsorten (Barke, Varde und Marthe) wurden ausgewählt und mit sechs Wiederholungen je Sorte untersucht.

Nach MeJA-Exposition emittierten alle sechs Sorten immer die gleichen BVOC, wobei ausschließlich Terpenoidemissionen nachweisbar waren. Die alten Landsorten zeigten jedoch höhere Emissionsraten als die Hohertragsorten, wobei hauptsächlich das Monoterpen Linalool und das Sesquiterpen β -Caryophyllen emittiert wurden. Die Unterschiede der Emissionsstärken zwischen den Sorten konnten bisher nicht durch Ergebnisse ergänzender Genexpressionsanalysen erklärt werden.

Auch nach Ozonexposition emittierten alle Gerstenpflanzen immer die gleichen BVOC, Terpenoide und *green leaf volatiles* (GLVs). Die GLV-Emissionen machten den Hauptanteil an den gesamten Emissionen aus. Die Stärke der GLV-Emissionen war zwischen den Gerstensorten nicht signifikant unterschiedlich. Unterschiede der Emissionsraten waren ausschließlich für die Monoterpenemissionen zweier alter Landsorten (BCC 869 und BCC 173) zu erkennen. Diese wiesen im Vergleich zu den anderen Sorten erhöhte Monoterpenemissionen auf. Jedoch konnten diese Unterschiede wiederum nicht anhand der in dieser Arbeit ermittelten Genexpressionen erklärt werden.

Die nachgewiesenen Terpenoidemissionen der Gerstensorten könnten durch Pflanzenhormone, wie Jasmonsäure (JA), beeinflusst werden. Von JA wird angenommen, dass es die Biosynthese und Emission terpenoider BVOC triggern soll. Es wurde jedoch keine Korrelation zwischen den endogenen JA-Gehalten und der Stärke der Terpenoidemissionen nachgewiesen. In Gerste ist wahrscheinlich die Akkumulation von JA nicht direkt erforderlich für die Synthese und Emission der Terpenoide. Die gleich starke Expression von JA-responsiven Genen aller Sorten nach MeJA-Exposition zeigt jedoch, dass die Wahrnehmung, also die Reaktion auf JA in allen Sorten gleich stark ist. Um potentielle Unterschiede in emissionsrelevanten Stoffwechselwegen zu finden, müssen weitere molekularbiologische Untersuchungen durchgeführt werden. Dabei müssten besonders die Schritte nach der JA-Akkumulation betrachtet werden.

Zusätzlich wurde auch überprüft, ob die Ozonexpositionen tatsächlich ein vergleichbares Emissionsmuster wie nach einem Pathogenbefall induzieren. Exemplarisch wurde eine Infektion mit *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* durchgeführt. Nach dem Pathogenbefall waren Emissionen von Methylsalicylsäure nachweisbar, die nach Ozonexposition nicht vorkamen. Das Emissionsmuster nach dem Pathogenbefall unterscheidet sich daher von dem nach Ozonexposition. Ein vergleichender Herbivorenbefall wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt.

Insgesamt weisen die Ergebnisse daraufhin, dass durch die Züchtung der Kulturpflanzen von Gerste nicht das Emissionsmuster verändert wurde, sondern es zu einer Reduktion der Emissionsstärke kam. Dieser eindeutige Einfluss auf Teile des Sekundärstoffwechsels lässt vermuten, dass auch andere Elemente des Sekundärmetabolismus durch die Ertragszüchtung beeinflusst wurden und sich somit die Abwehreigenschaften der heutigen Kultursorten im Vergleich mit den alten Landsorten von Gerste verändert haben.

Abstract

The present study investigates whether selection of agriculturally used plants by mankind has suppressed stress responses of plants against abiotic and biotic stressors. For this purpose emissions of biogenic volatile organic compounds (BVOC) of modern high-yield barley cultivars were compared to those of their ancestors. For the first time BVOC emissions of different barley cultivars were measured here and differences in the emission rates (quantity) and the emission pattern (quality) of the emitted BVOC were compared between modern high-yield cultivars and old landraces. The emissions were induced by stressing the plants using methyl jasmonate (MeJA) and ozone exposure. These abiotic stressors are a trigger for typical stress responses of plants.

A system was established to measure the emissions of different plants in parallel. This accelerated the throughput of measurements enabling the necessary high number of replicates. BVOC emissions from 31 different barley cultivars were analysed after the exposure to MeJA (n=1). The results from this first screening experiment should yield information about the extent of the stress-induced BVOC emissions and for sorting the cultivars into groups according to their ability to emit BVOC. But repeated measurements of plants (n=2) showed a high variability precluding the possibility of classification in strong and low emitters. Hence measurements of the BVOC emissions were restricted to six cultivars with six replicates for MeJA and ozone exposures respectively. Tested cultivars were three old landraces (BCC 1479, BCC 173 and BCC 869) and three modern high-yield cultivars (Barke, Varde and Marthe).

After MeJA exposures all investigated plants emitted the same BVOC. Only emissions of terpenoids were observed and the old cultivars showed a stronger emission response than the modern cultivars. Mainly the monoterpene linalool and the sesquiterpene β -caryophyllene were emitted. The differences in the BVOC emission strengths could not be explained by the analysis of the expression of certain genes that are involved in the biosynthesis of terpenoid emissions.

After ozone exposure terpenoids as well as green leaf volatiles (GLV) were emitted and qualitatively the reaction of all investigated cultivars was the same. Main emissions were those of GLV and the emission strengths of GLV were the same for all cultivars. Differences in the terpenoid emissions were only detectable for the old cultivars BCC 869 and BCC 173. Monoterpene emissions for these two old cultivars were more intensive than those from the other cultivars. Again, the stronger emissions of these cultivars could not be explained by differences in the expression of emission-relevant genes.

The emissions of terpenoids can be influenced by plant hormones like jasmonic acid (JA). JA is supposed to trigger the synthesis and emission of terpenoids. However, for barley I found no correlation between the internal JA content and the terpenoid emission rate. For barley the accumulation of JA is probably not essential for the emission strengths of terpenoids. The results of the expression analysis of JA-responsive genes indicate that JA perception is comparable in old and modern cultivars. Further molecular biological analyses are needed to dissect potential differences in the emission-relevant pathways. Especially steps after the accumulation of JA are of interest.

In addition to that it was investigated, if the emission pattern after the exposure with ozone is comparable to that after pathogen attack. For this purpose a pathogen attack with *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* was conducted. Contrary to ozone exposure, the pathogen attack induced emissions of methyl salicylic acid indicating that for barley an ozone exposure does not resemble pathogen attack. In this study herbivore attack was not conducted. Overall the results show that breeding of barley plants did not change the emission pattern, but the emission strengths. This clear influence on parts of the secondary metabolism might indicate that other elements of the secondary metabolism are affected by breeding of high-yield cultivars as well and that modern cultivars of barley differ in their defence mechanisms from old landraces.

Abkürzungsverzeichnis

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Abkürzungen und Symbole verwendet:

λ	Wellenlänge
Acc.Nr.	Accession number (Zugangsnummer)
AOC	Allenoxidcyclase
AOS	Allenoxidsynthase
AOS2	AOS: Isoform 2
BCC	Internationale Barley Core Collection
bp	Basenpaare
BVOC	biogenic volatile organic compounds (biogene flüchtige organische Verbindungen)
BX1	Benzoxazin 1
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNA)
<i>cis</i> (+)-OPDA	<i>cis</i> (+)-12-Oxophytodiensäure
cfu	colony-forming units
cv.	Kultivar
DAHP	3-Deoxy-D-arabino-heptulosonat-7-phosphat
DMAPP	Dimethylallylpyrophosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DXP	1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat
DXR	DXP-Reduktoisomerase
DXS	DXP-Synthase
DXS2	DXS-Typ2
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAOSTAT	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FG	Frischgewicht
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GC	Gaschromatographie
GLV	Green Leaf Volatiles
h	Stunden
HDR	HMBPP-Reduktase
HMBPP	4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyldiphosphat
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-Coenzym A
HMGR	3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA-Reduktase
HPL	Hydroperoxid-Lyase
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HR	Hypersensitive Reaktion
Igl	Indol-3-glycerinphosphat-Lyase
IPK	Leibniz Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenuntersuchungen

Abkürzungsverzeichnis

IPP	Isopentenylpyrophosphat
JA	Jasmonsäure
JA-Ile	JA-Isoleucin
JIP	jasmonate-induced protein (Jasmonat-induziertes Protein)
JIP23	JIP mit einer molekularen Masse von 23 kDa
JMT	Jasmonsäure-Carboxyl-Methyltransferase
JRG5	jasmonate-responsive gene 5 (Jasmonat-responsives Gen 5)
kDa	kilo Dalton (atomare Masseneinheit)
LC-ESI-MS	Liquid chromatography electrospray ionisation tandem mass spectrometry (Kopplung von HPLC und MS mit Elektrosprayionisation)
LOX	Lipoxygenase
LOX-100	Lipoxygenase mit einer molekularen Masse von 100 kDa
LTP	Lipid Transfer Protein
MeJA	Methyljasmonat
MJE	Methyljasmonatesterase
MEP	Methylerythritol-4-Phosphat
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MES	Methylesterase
MeSA	Methylsalicylsäure
MeSAG	Methylsalicylsäureglucosid
MS	Massenspektrometer
n	Anzahl der Durchführungen (Replikatanzahl)
NCBI	National Center for Biotechnological Information
n.s.	nicht signifikant
OsIgl	<i>Oryza sativa</i> Igl
PAL	Phenylalanin-Ammonium-Lyase
PCD	programmed cell death (programmierter Zelltod)
PCR	Polymerasekettenreaktion
ppb	„Teile pro Milliarde“ (parts per billion 10^{-9})
ppt	„Teile pro Billion“ (parts per trillion 10^{-12})
PR-Protein	pathogenesis related protein (Pathogen assoziiertes Protein)
<i>P. syringae</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>
pv.	Pathovar
qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffspezies)
SA	Salicylsäure
SAG	Salicylsäureglucosid
SE	Standardfehler
SER	systemisch erworbene Resistenz

Abkürzungsverzeichnis

SGE	Salicylsäureglucoseester
SGT	Salicylsäure-Glucosyltransferase
SMT	Salicylsäure-Methyltransferase
TH	Thionin
TMTT	(E,E)-4,8,12-Trimethyl-1,3,7,11-tridecatetraen
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSA	α -Untereinheit der Tryptophansynthase
TSB	β -Untereinheit der Tryptophansynthase
u. N.	unterhalb der Nachweisgrenze
v/v/v	Volumenverhältnisse
ZmIgl	<i>Zea mays</i> Igl
w/v	Verhältnis Gewicht zu Volumen

1. Einleitung

Pflanzen begegnen in ihrer natürlichen Umwelt einer Vielzahl von negativen Umweltfaktoren. Hierzu gehören abiotische Einflüsse wie Wassermangel, Hitze und Kälte ebenso wie biotische Einflüsse, wie der Befall mit Herbivoren oder Pathogenen. Beim kommerziellen Anbau von Pflanzen werden Herbivoren- oder Pathogenbefall durch besondere Maßnahmen, wie hohen Pestizideinsatz minimiert. Auch die Menge an konkurrierenden Unkräutern wird in den typischen Monokulturen der heutigen Kulturpflanzen aktiv reduziert. Durch diese Reduktion der biotischen Stresseinflüsse beim Anbau war es möglich, die Züchtung landwirtschaftlich genutzter Pflanzen hauptsächlich in Richtung Optimierung der Produktivität und entsprechend der Optimierung des Primärmetabolismus voranzutreiben. Unklar ist, inwieweit diese Züchtung in Richtung Hohertrag die Fähigkeit reduziert hat, auf Stressoren, wie Herbivorie oder Pathogene mit pflanzlichen Abwehrmechanismen zu antworten (Benrey et al., 1998; Gols et al., 2008). Viele Abwehrmechanismen sind mit kohlenstoffreichen und energiereichen Metaboliten des Sekundärmetabolismus verbunden. Bei gleicher Photosyntheserate wird der Kohlenstoff für eine entsprechende Steigerung des Ertrages im Primärmetabolismus verwendet, wodurch es zu einer Reduktion des Sekundärmetabolismus kommt (Schoonhoven et al., 2005). Eine solche Veränderung könnte einen Rückschritt in der Evolution der Abwehrmechanismen bedeuten. Um zu prüfen, inwieweit sich die Züchtung tatsächlich auf den Sekundärmetabolismus ausgewirkt hat, wurden in dieser Arbeit die Stressreaktionen moderner Hohertragssorten von Gerste mit denen ihrer Vorfahren verglichen. Diese Grundlagen könnten in Zukunft genutzt werden, um durch entsprechende selektive Rückzüchtung des Emissionspotentials die Resistenz moderner, hohertragreicher Gerstensorten zu verbessern. Dieser alternative endogene statt applizierte Pflanzenschutz könnte die ansteigende Resistenzbildung der Schädlinge gegen häufig angewendete Pestizide (Pimentel, 2005) eindämmen.

Im Folgenden wird zunächst auf den aktuellen Stand der Forschung eingegangen, um schließlich die Zielsetzung dieser Arbeit näher zu charakterisieren.

1.1 Pflanzliche Abwehrmechanismen

Im Laufe der Evolution haben sich vielfältige pflanzliche Reaktionen entwickelt, um negativen Umwelteinflüssen zu begegnen. So lösen Herbivorie oder Pathogenbefall komplexe Signalkaskaden und Abwehrmechanismen innerhalb der Pflanzen aus (Walling, 2000). Eine erfolgreiche Abwehr gewährleistet die Aufrechterhaltung des vegetativen Wachstums der Pflanzen und somit ihre Vermehrung (Karban und Baldwin, 1997). Für eine erfolgreiche pflanzliche Abwehr müssen die Pflanzen die Schädlinge jedoch rechtzeitig erkennen und effizient verschiedene Abwehrmechanismen anwenden. Gelingt diese rechtzeitige Erkennung und damit die Hemmung der Pathogenentwicklung in der Pflanze-Pathogen-Interaktion spricht man von einer inkompatiblen Interaktion. Wenn Pflanzen Pathogene nicht frühzeitig erkennen, kann das Pathogen in die Pflanzen eindringen, sich entwickeln und vermehren. Es wird dann von einer kompatiblen Interaktion gesprochen (z.B. Pontier et al., 1994; Boyko und Kovalchuk, 2011).

Ob ein Pathogen eine Pflanze erfolgreich infizieren kann ist u. a. davon abhängig, ob die Pflanze sogenannte *Resistenzgene* (R-Gene) besitzt. R-Proteine erkennen und binden die aus dem Pathogen stammenden Moleküle (Elicitoren, welche durch Avirulenzgene kodiert werden), um so die pflanzlichen Abwehrmechanismen zu induzieren (z.B. Dempsey et al., 2011). Dies ist oft mit einer Hypersensitiven Reaktion (HR) verbunden, welche mit einem programmierten pflanzlichen Zelltod (programmed cell death, PCD) in unmittelbare Nähe des Infektionsortes einhergeht (Hammond-Kosack und Jones, 1996). Durch diese pflanzlichen Abwehrreaktionen wird die Ausbreitung der Pathogene unterbunden. Ein Ausbreiten des PCDs über die Infektionsstelle hinaus wird durch die Induktion des Pflanzenhormon Jasmonsäure (JA) verhindert (Kangasjärvi et al., 2005; Jaspers et al., 2005).

Der HR geht ein sogenannter oxidativer Burst, eine hohe Produktion der sogenannten reaktiven Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) voraus (Goodman und Novacky, 1994; Hammond-Kosack und Jones, 1996). Bei dem oxidativen Burst kann zwischen zwei Phasen unterschieden werden. Die erste Phase tritt bei kompatiblen und inkompatiblen Pflanzen-Pathogen-Wechselwirkungen auf, wobei es zu einer nicht so starken und lang andauernden ROS-Akkumulation wie in der zweiten Phase des oxidativen Bursts kommt. Die zweite Phase findet ausschließlich bei inkompatibler Pflanzen-Pathogen-Wechselwirkung statt (Lamb und Dixon, 1997) und stellt eine aktive Bildung von ROS als Teil der HR dar.

Neben dieser aktiven ROS-Bildung kommt es zur Akkumulation von Salicylsäure (SA), einem weiteren für die Steuerung der Pflanzenabwehr wichtigen Pflanzenhormon, und in der Folge zur Expression der sogenannten PR-Proteine (pathogenesis related proteins) (Tsuda et

al., 2008; Vlot et al., 2009). PR-Proteine werden nach einem Pathogenbefall induziert und können direkt oder indirekt die Ausbreitung der Pathogene inhibieren, etwa durch die Hydrolyse der bakteriellen Zellwände (Kombrink und Somssich, 1995).

Gewöhnlich werden PR-Proteine nach einem Pathogenbefall verbunden mit einer HR induziert (Edreva, 2005). PR-Proteine können aber auch nach einem Herbivorenbefall induziert werden und eine inhibierende Wirkung auf das Wachstum der Herbivoren ausüben (Walling, 2000; Edreva, 2005). Neben einer Induktion von PR-Proteinen werden nach Herbivorie weitere Abwehrsignalkaskaden ähnlich wie nach einem Pathogenbefall induziert (Walling, 2000; Maffei et al., 2007; Howe und Jander, 2008). Dabei basieren viele Schutzmechanismen auf toxischen Sekundärmetaboliten, wie Glucosinolaten oder Alkaloiden (Übersicht in Bennett und Wallsgrove, 1994).

Pflanzenhormone, wie JA, SA oder Ethylen spielen eine wichtige Rolle in den Signalwegen der pflanzlichen Abwehrmechanismen. Ihre Akkumulation und Wirkung hängt dabei auch wesentlich von den befallenden Pathogenen ab (Übersicht z.B. in Pieterse et al., 2009). Biotrophe Pathogene beziehen ihre Nährstoffe von lebendem Zellgewebe ohne die Wirtszellen zu zerstören. Necrotrophe Pathogene dagegen zerstören zunächst die Wirtszellen und beziehen anschließend ihre Nährstoffe von den Wirtszellen. Pflanzenpathogene, die beide Lebensformen aufweisen werden als hemibiotrophe Pathogene bezeichnet (Glazebrook, 2005). Diese verschiedenen Infektionsprinzipien erfordern entsprechend auch unterschiedliche Abwehrmechanismen.

Je nach Schädling können JA, SA und Ethylen unterschiedlich stark in den Pflanzen induziert werden. SA soll primär die Resistenz gegen biotrophe und hemibiotrophe Pathogene vermitteln und die Resistenz gegen nekrotrophe Pathogene und Insekten soll auf den Signalwegen von JA und Ethylen beruhen (z.B. Stout et al., 2006; Spoel et al., 2007; Koornneef et al., 2008). In der Literatur wird meist eine antagonistische Wirkung zwischen SA und JA/Ethylen beschrieben. Jedoch sind diese Interaktionen sehr komplex und es sind auch synergetische Wirkungen zwischen SA und JA/Ethylen bekannt (Übersicht z.B. in Pieterse et al., 2009).

Häufig kommt es nach Herbivorie oder einem Pathogenbefall zu einer vermehrten Bildung von biogenen flüchtigen organischen Verbindungen (BVOC; biogenic volatile organic compounds) (Maffei et al., 2007). Dabei kann zum einem die Emissionsstärke konstitutiver pflanzlicher BVOC beeinflusst werden (Schuh et al., 1996) und zum anderen kann es zu einer Induktion anderer BVOC-Emissionen kommen (Croft et al., 1993; Rosahl, 1996). Ihre Rolle bei der Pflanzenabwehr wird im folgenden Kapitel 1.2 beschrieben.

1.2 BVOC als pflanzliche Abwehrmechanismen

Höhere Pflanzen emittieren BVOC konstitutiv sowie unter Stress. Bei konstitutiven Emissionen handelt es sich um beständige Emissionen, wie die von Isopren und einigen Monoterpenen. Diese BVOC werden entweder direkt nach ihrer Biosynthese emittiert oder sie werden in speziellen Pflanzenorganen gespeichert (z.B. Kesselmeier und Staudt, 1999).

BVOC werden durch Pflanzen häufig in bestimmten Entwicklungsphasen emittiert, um z.B. Bestäuber anzulocken (Reinhard et al., 2004). Während Stresssituationen, wie nach einem Herbivoren- oder Pathogenbefall dienen BVOC-Emissionen auch als Abwehrverbindungen (Dicke, 1994; Walling, 2000; Pichersky und Gershenzon, 2002; Park et al., 2007; Heil und Bueno, 2007; Maffai et al., 2007).

Hierzu gehören z.B. die *green leaf volatiles* [GLVs, z.B. (Z)-3-Hexenol oder (Z)-3-Hexenylacetat] (z.B. Croft et al., 1993), welche unmittelbar nach einer Verletzung des Pflanzengewebes emittiert werden (Hatanaka et al., 1987; Maffei et al., 2007). Diese Alkohole oder Aldehyde werden nach biotischen und abiotischen Stressoren, die mit der Zerstörung von Membranen einhergehen gebildet (Heiden et al., 1999b; 2003). Bei einigen dieser Verbindungen handelt es sich um Bitterstoffe, die Fraßfeinde abschrecken (Schaller, 2001). Sie können aber auch direkt das Wachstum vieler Bakterien und Pilze inhibieren (Zeringue und McCormick, 1989; Deng et al., 1993). So konnte für *trans*-2-Hexenal (C₆-Aldehyd) gezeigt werden, dass seine exogene Applikation die Zusammensetzung der Proteine bei *Botrytis cinerea* (Myung et al., 2007) verändert. Die nach einem Insektenbefall nachgewiesene Emission von z.B. (Z)-3-Hexenylacetat (Parè und Tumlinson, 1999; D'Auria et al., 2007) führt darüber hinaus zur Anlockung von natürlichen Feinden der Insekten (Dicke et al., 1999; Shiojiri et al., 2006).

Als Stressantwort werden neben den GLVs auch Terpenoide, vor allem Mono- und Sesquiterpene, emittiert. Ihre Biosynthese und Emission wird durch pflanzeninterne Signalmoleküle beeinflusst. So soll etwa das Pflanzenhormon JA die Synthese und Emission der Terpenoide triggern (z.B. Boland et al., 1995). Mono- und Sesquiterpene dienen u. a. als Abwehrstoffe gegen Pathogene und Herbivoren (Gershenzon und Croteau, 1991). Terpenoide Emissionen können das Fraß-, Ausbreitungs- bzw. Besiedlungs- und das Eiablageverhalten von Herbivoren verändern (Weaver et al., 1994; Farentinos et al., 1981; Elliott und Loudon, 1987). Terpenoidemissionen wird außerdem eine tritrophische Funktion zugeschrieben. Turlings et al. (1990) konnten zeigen, dass von Raupen befallene Maispflanzen - induziert durch Inhaltsstoffe im Raupenspeichel – Terpenoide emittieren. Durch die Terpenoidemissionen werden wiederum Raubwespen angelockt, die schließlich ihre Eier in

die Raupen legen und somit den Raupenbefall eindämmen. Zudem wird Terpenoidemissionen eine antimikrobielle Wirkung zugesprochen (Cheniclet, 1987; Lewinsohn et al., 1991; Himejima et al., 1992; Funk et al., 1994; Gershenzon und Dudareva, 2007).

Eine dritte Gruppe von BVOC stellen die aromatischen Verbindungen dar (z.B. Heiden et al., 1999a und 1999b). Ihre Hauptemissionen sind Indol und Methylsalicylsäure (MeSA). Indolemissionen werden insbesondere bei Pflanzen gefunden, die von Herbivoren befallen sind (z.B. Frey et al., 2000). Die Rolle von Indol in der Interaktion zwischen Pflanzen und Herbivoren ist dabei abhängig von der jeweiligen Pflanzen-, Herbivoren- bzw. Carnivorenart (Zhuang et al., 2012).

MeSA wird mit der Resistenz sowohl gegen mikrobielle Pathogene als auch Insekten in Zusammenhang gebracht. Bei der Resistenz gegen Insekten sollen durch die MeSA-Emissionen die natürlichen Feinde der Schädlinge angelockt werden (van Poecke et al., 2001; Zhu und Park, 2005). Bei der Resistenz gegen mikrobielle Pathogene wird derzeit MeSA als Signal für die systemisch erworbene Resistenz (SER) innerhalb einer Pflanze diskutiert (Park et al., 2007; Attaran et al., 2009; Liu et al. 2010). Für *Arabidopsis* ist jedoch gezeigt worden, dass MeSA nicht essentiell für die Ausbildung der SER ist (Attaran et al., 2009). In der Studie von Liu et al. (2010) soll für *Arabidopsis* jedoch MeSA notwendig für die Ausbildung der SER sein. Diese Diskrepanzen bezüglich der Rolle von MeSA als mobiles Signal für die SER sind durch unterschiedliche Lichtbedingungen nach der Pathogeninfektion ausgelöst worden (Liu et al., 2011). Wahrscheinlich gibt es aber auch andere mobile Signalmoleküle, die an der SER beteiligt sind (z.B. Vlot et al., 2009; Shah, 2009; Liu et al., 2011) und die Suche nach dem oder den mobilen Signalmolekül(en) für die Ausbildung der SER ist Bestandteil der derzeitigen Forschungen (z.B. Jung et al., 2009; Chanda et al., 2011).

MeSA-Emissionen wurde darüber hinaus eine Rolle als Botenstoff zur Induktion der SER in benachbarten Pflanzen zugeschrieben (Shulaev et al., 1997; Park et al., 2007; Koo et al., 2007). Diese Rolle von MeSA-Emissionen ist jedoch fraglich, da die in den bisherigen Untersuchungen angewendeten MeSA-Konzentrationen unphysiologisch hoch sind (Shulaev et al., 1997; Park et al., 2007; Koo et al., 2007) und nicht die natürlichen Bedingungen während der SER widerspiegeln (Attaran et al. 2009).

1.3 Anwendung von abiotischen Stressoren (MeJA und Ozon) für die Induktion von BVOC-Emissionen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden BVOC-Emissionen vorwiegend anhand der abiotischen Stressoren Methyljasmonat (MeJA) bzw. Ozon induziert. Die Exposition von MeJA soll bis zu einem bestimmten Grad dieselben BVOC-Emissionen wie nach Herbivorie induzieren (z.B. Hopke et al., 1994; Koch et al., 1999, van Poecke und Dicke, 2004). Ozonexposition soll bei Pflanzen dagegen ähnliche Reaktionen wie nach einem Pathogenbefall auslösen. Bei vielen Pflanzenarten kommt es nach Ozonexposition z.B. zur Induktion von PR-Proteinen (Tabak: Schraudner et al., 1992; norwegische Fichte: Kärenlampi et al., 1994; Petersilie: Eckey-Kaltenbach et al., 1994; Ackerschmalwand: Sharma et al., 1996) und zu einer Induktion von BVOC-Emissionen (Sandermann et al., 1998; Rao et al., 2000; Kangasjärvi et al., 1994; Heiden et al., 1999b und 2003; Vuorinen et al., 2004; Beauchamp et al., 2005; Miebach, 2008). Die Anwendung von abiotischen Stressoren bietet den Vorteil, dass ihre Applikationen im Vergleich zu biotischen Stressoren wesentlich reproduzierbarer sind und demnach die Stressapplikationen auch quantitativ sind (z.B. Beauchamp et al., 2005; Filella et al., 2005).

1.4 Biosynthese der BVOC

Die meisten BVOC leiten sich hauptsächlich aus vier Biosynthesewegen ab (Abb. 1; Kessler und Baldwin, 2002). Die GLV werden über den sogenannten Oktadecanoidweg synthetisiert (Abb. 1; z.B. Croft et al., 1993). Die Terpenoide können über zwei mögliche Wege, dem Acetat-Mevalonat-Weg und den Methylerythritolphosphat-Weg (MEP-Weg) gebildet werden (Abb. 1 und 2; z.B. Kessler und Baldwin, 2002). Aromatische BVOC-Verbindungen leiten sich zumeist aus dem Phenylpropanoidweg ab (Abb. 1 und 3; z.B. Heiden et al., 1999a).

Daneben können noch kurzkettenige oxigenierte BVOCs ($C < 5$), wie Methanol von Pflanzen emittiert werden (Kreuzwieser et al., 1999; Fall, 2003; Hüve et al., 2007; Folkers et al., 2008). Im Folgenden wird die Biosynthese der für diese Arbeit relevanten Substanzgruppen näher erläutert und auch auf die dabei untersuchten Enzyme bzw. Proteine eingegangen.

1.4.1 Oktadecanoidweg

Wie bereits erwähnt entstehen GLVs über den Oktadecanoidweg (Abb. 1; z.B. Croft et al., 1993). Durch Lipasen werden freie Fettsäuren aus den Lipiden der Zellmembranen gelöst. Die Fettsäuren werden anschließend durch Lipoxygenase (LOX)-Enzyme zu Hydroperoxiden oxidiert. LOX katalysieren den regio- und stereoselektiven Einbau von molekularem Sauerstoff (Dioxygenierung) in mehrfach ungesättigte Fettsäuren mit einer (Z,Z)-1,4-Pentadien-Konfiguration, wodurch Hydroperoxide entstehen (Vörös et al., 1998). In Pflanzen sind dabei Linol (C_{18:2})- und α -Linolensäure (C_{18:3}) die bevorzugten Substrate für die Dioxygenierung (Gardner, 1991). Es kann der molekulare Sauerstoff an die C₉- oder C₁₃-Position der ungesättigten Fettsäure eingebaut und entsprechend 9- oder 13-Hydroperoxide gebildet werden (Vick und Zimmerman, 1987). Diese Positionsspezifität wird genutzt um die pflanzlichen LOX in 9-LOX bzw. in 13-LOX einzuteilen. Des Weiteren werden die pflanzlichen LOX anhand der Ähnlichkeit ihrer cDNA-Sesquenzen klassifiziert (Shibata et al., 1994). Dabei besitzen die sogenannten LOX1-Typen kein chloroplastidäres Transitpeptid und haben untereinander eine hohe Sesquenzhomologie. Enzyme, die ein chloroplastidäres Transitpeptid besitzen gehören in die Gruppe der LOX2-Typen, wobei diese untereinander weniger homolog sind (Shibata et al., 1994). Bei den LOX1-Typen wurden sowohl 9-LOX als auch 13-LOX nachgewiesen (Feussner und Wasternack, 2002).

LOX werden neben ihrer Funktion bei Entwicklungsprozessen, wie Seneszenz (Rosahl, 1996) eine besondere Rolle während einem Pathogenbefall zugeschrieben (Rancé et al., 1998). Jedoch können auch Insekten durch Fraßschaden die LOX induzieren (Stotz et al., 2000).

Die von den LOX gebildeten Hydroperoxide können als Ausgangssubstrat für viele weitere enzymatische Reaktionen, wie z.B. der Biosynthese der GLVs und von JA dienen (z.B. Feussner und Wasternack, 2002; Abb. 1).

Für die Biosynthese der GLV werden die Hydroperoxide durch Hydroperoxid-Lyasen (HPL) in flüchtige C₆-Verbindungen (Aldehyde bzw. Alkohole) umgewandelt (Blée, 1998; Abb. 1). HPL katalysieren dabei die Umwandlung von 13-(S)-Hydroperoxy-Linolensäure in (Z)-3-Hexenal (Abb. 1) und von 13-(S)-Hydroperoxy-Linolsäure in (Z)-3-Hexenal (Bate und Rothstein, 1998). Diese C₆-Verbindungen sind für den charakteristischen Geruch vieler Blätter, Früchte und Gemüse verantwortlich und werden daher auch als *green leaf volatiles* (GLVs) bezeichnet (Hatanaka et al., 1987). Die (Z)-3-Alkenale können durch allylische Isomerisierung zu (E)-2-Alkenale umgewandelt werden. Aus (Z)-3-Hexenal kann so z.B. (E)-2-Hexenal entstehen (Grechkin, 1998). Die gebildeten Aldehyde können durch eine Alkohldehydrogenase zu ihren entsprechenden Alkoholen reduziert werden (Blée, 1998).

Durch eine Acetyltransferase kann eine Veresterung erfolgen, wie z.B. (Z)-3-Hexenol zu (Z)-3-Hexenylacetat (Hatanaka et al., 1987; Olias et al., 1993; St-Pierre und De Luca, 2000; D'Auria et al., 2007; Abb. 1). Nach Beschädigung von Membranen werden GLV-Emissionen, unabhängig von den induzierenden Elicitoren dieser Beschädigung, emittiert (z.B. Heiden et al., 2003).

Neben der Bildung von flüchtigen C₆-Verbindungen können Hydroperoxide auch der Biosynthese von JA dienen (Abb. 1). Die Hydroperoxide müssen dafür über α -Linolensäure entstanden sein (Vick und Zimmerman, 1984), wobei ausschließlich 13-(S)-Hydroperoxy-Linolensäuren für die JA-Biosynthese verwendet werden. Über die Allenoxidsynthese (AOS) erfolgt eine Dehydration von 13-(S)-Hydroperoxy-Linolensäure zu 13-(S)-Epoxyoctatriensäure (Abb. 1; Ziegler et al., 2001). Eine Induktion der AOS-Expression konnte durch mechanische Verwundung sowie nach einem Herbivorenbefall nachgewiesen werden (Ziegler et al., 1997; Laudert und Weiler, 1998). Ihre Expression korreliert dabei mit dem JA-Gehalt, was eine wichtige regulatorische Rolle der AOS bei der Biosynthese der JA vermuten lässt (Maucher et al., 2000).

Die Umsetzung des instabilen Allenoxids, 13-(S)-Epoxyoctatriensäure zu *cis*-(+)-OPDA (12-Oxophytodiensäure; C₁₈-Verbindung) erfolgt durch die Allenoxidcyclase (AOC) (Abb. 1; Blée, 1998). In dem von der AOC katalysierten Schritt wird die enantiomere Grundkonfiguration der Jasmonate gebildet (Maucher et al., 2004). Es wird wie für die AOS ein Zusammenhang der AOC-Expression mit der JA-Biosynthese vermutet, wobei die AOS und AOC ein ähnliches Expressionsmuster aufweisen (Maucher et al., 2004).

Nach Reduktion des Cyclopentenonringes der OPDA durch die 12-oxo-PDA-Reduktase (Vick und Zimmerman, 1984; Schaller und Weiler, 1997) und einer dreimaligen β -Oxidation entsteht die instabile (+)-7-iso-JA. Es wird angenommen, dass die Reduktion sowie β -Oxidationen in den Peroxisomen stattfinden (Strassner et al., 2002; Übersicht in Wasternack, 2007). Die instabile (+)-7-JA wird schließlich zu dem thermodynamisch stabileren Stereoisomer (-)-JA epimerisiert (Wasternack und Parthier, 1997). JA gilt dabei u. a. als Trigger für Terpenoidemissionen (Boland et al., 1995). Neuerdings wird angenommen, dass besonders das JA-Aminosäure-Konjugat JA-Isoleucin (JA-Ile) eine besondere Rolle in der JA-Wahrnehmung einnehmen soll (Thines et al., 2007; Chini et al., 2007) und u. a. die Biosynthese von abwehrrelevanten Terpenoidemissionen induzieren soll (Tamogami et al., 2008).

1.4.2 Terpenoide

Terpenoide sind Oligomere des Kohlenwasserstoffs Isopren (2-Methyl-1,3-butadien) und setzen sich aus C_5 -Bausteinen (Isopreneinheiten) zusammen. Je nach Anzahl dieser Isopreneinheiten werden Terpenoide in Monoterpene (C_{10}), Sesquiterpene (C_{15}), Diterpene (C_{20}), Triterpene (C_{30}), Tetraterpene (C_{40}) und Polyterpene (C_5)_n eingeteilt (McGarvey und Croteau, 1995). Je höher dabei die Anzahl der Isopreneinheiten der gebildeten organischen Verbindungen ist, desto geringer sind sie flüchtig.

Terpenoide werden über Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) und Isopentenylpyrophosphat (IPP) gebildet. Die Biosynthese von DMAPP und IPP kann dabei bei Pflanzen über zwei unterschiedliche Stoffwechselwege erfolgen (Abb. 2). Der klassische Acetat-Mevalonat-Weg wurde lange Zeit als der einzige Weg zur Bildung von Terpenoiden angenommen. Untersuchungen von Rohmer et al. (1993 und 1999) mit Bakterien zeigten jedoch einen alternativen Weg zur Biosynthese von IPP, den Methylerythritolphosphat-Weg (MEP-Weg) oder auch 1-Deoxy-D-xylulose-Weg.

Dabei ist allgemein akzeptiert, dass der klassische Acetat-Mevalonat-Weg im Cytosol stattfindet (Kesselmeier und Staudt, 1999; Dubey et al., 2003) und u. a. zur Bildung von Sesquiterpenen führt (Kleinig, 1989). Der MEP-Weg dagegen ist in Pflanzen plastidenlokalisiert und führt u. a. zur Bildung von Mono- und Diterpenen (Lichtenthaler, 1999; Eisenreich et al., 2001). Beide Stoffwechselwege finden parallel in Pflanzen statt und ein Austausch von Intermediaten oder Endprodukten ist möglich (Hemmerlin et al., 2003; Laule et al., 2003).

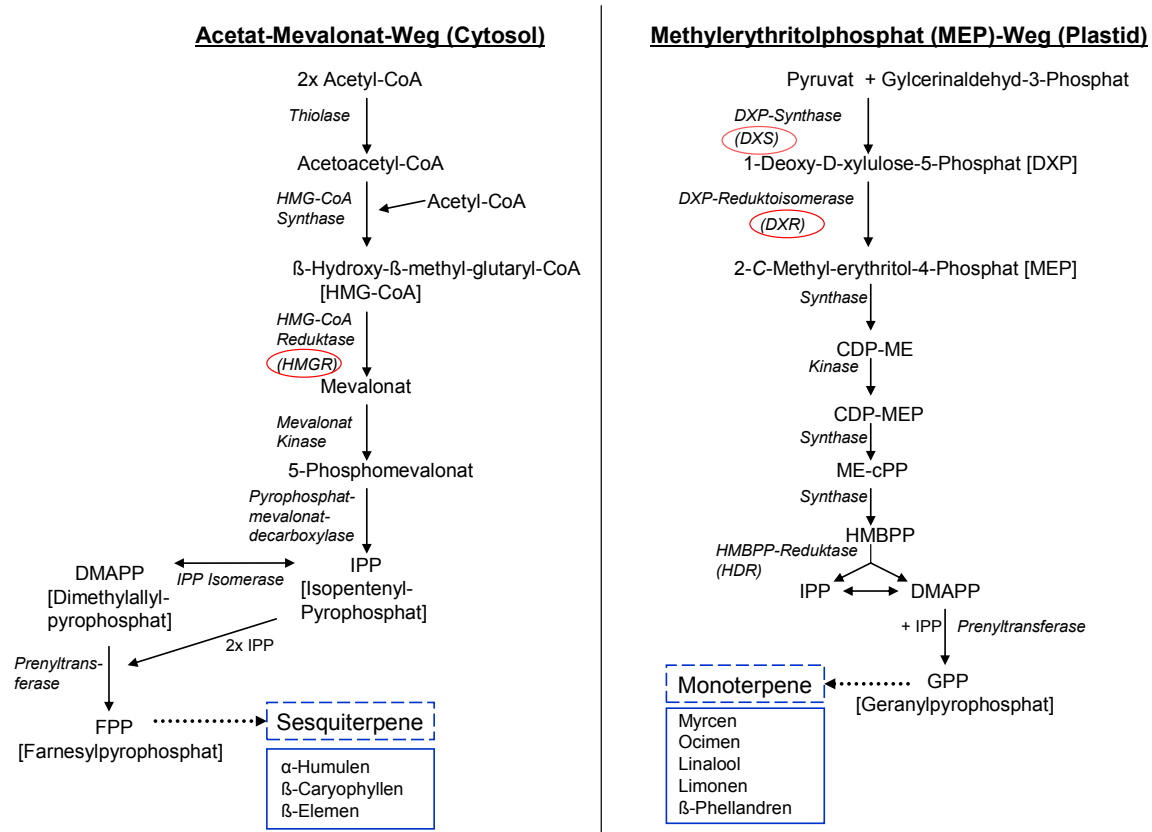


Abb. 2: Biosynthesewege der Emissionen von Terpenoiden (blau gestrichelte Umrandung) über den Acetat-Mevalonat-Weg (Cytosol) und dem MEP-Weg (Plastid)

Rot umkreist sind Enzyme, die in dieser Arbeit untersucht wurden. Schwarze Pfeile bedeuten eine direkte Biosynthese, gestrichelte Pfeile eine direkte Biosynthese beispielhaft ausgewählter Verbindungen. Über den Acetat-Mevalonat-Weg werden u. a. Sesquiterpene (wie z.B. α-Humulen, β-Caryophyllen, β-Elementen) gebildet (Kleinig, 1989). Der MEP-Weg dagegen führt u. a. zur Bildung von Monoterpenen (wie z.B. Myrcen, Ocimen, Linalool, Limonen, β-Phellandren). Abkürzungen sind wie folgt: CDP-ME, 4-(Cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol; CDP-MEP, 2-Phospho-4-(cytidine-5'-di-phospho)-2-C-methyl-D-erythritol; DMAPP, Dimethylallyldiphosphat; DXP, 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat; DXR, DXP-Reduktoisomerase; DXS, DXP-Synthase; FPP, Farnesylpyrophosphat; GPP, Geranylpyrophosphat; HMBPP, 4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyldiphosphat; HDR, HMBPP-Reduktase; IPP, Isopentenylidiphosphat; ME-cPP, 2-C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat (Lichtenthaler, 1999; Eisenreich et al., 2001; Dubey et al., 2003).

1.4.2.1 Der Acetat-Mevalonat-Weg: HMG-CoA-Reduktase

Im Acetat-Mevalonat-Weg werden schrittweise drei Moleküle Acetyl-CoA zu Mevalonat zusammengefügt (Abb. 2). Die Bildung von Mevalonat erfolgt durch die Reduktion der C₆-Verbindung 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl CoA (HMG-CoA). Das verantwortliche Enzym ist dabei die HMG-CoA-Reduktase (HMGR) (Moore und Oishi, 1993). Die HMGR stellt dabei einen wichtigen Kontrollpunkt des Acetat-Mevalonat-Weges dar (Bach et al., 1986; Stermer und Bostock, 1987; Gondet et al., 1992), wobei sie geschwindigkeitslimitierend für die Biosynthese der Endprodukte sein soll (Aquil et al., 2009). Die HMGR Aktivität wird u. a. durch einen Pathogenbefall erhöht und führt zu Bildung von Phytoalexinen (Stermer und Bostock, 1987). Bei Kartoffelpflanzen wurde nach einer Pilzinfektion eine gesteigerte HMGR Aktivität beschrieben, wobei die Expression der HMGR nach zwei Tagen der Inokulation am höchsten war (Suzuki et al., 1975).

1.4.2.2 Der MEP-Weg: DXS und DXR

Im MEP-Weg wird aus der Glykolyse stammendes Pyruvat und aus dem Calvin-Zyklus stammendes Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat (DXP) umgewandelt (Abb. 2; Übersicht in Dubey et al., 2003). Die DXP-Synthase (DXS) katalysiert diese Reaktion (Sprenger et al., 1997; Lange et al., 1998; Lois et al., 1998). Im Weiteren katalysiert die DXP-Rudoktoisomerase (DXR) die Bildung von MEP (z.B. Cordoba et al., 2009). Die DXS soll einen geschwindigkeitslimitierenden Schritt des MEP-Weges darstellen und somit die Bildung der Terpenoide in den Plastiden beeinflussen. Diese Terpenoide beinhalten z.B. Pigmente der Photosynthese (Chlorophylle oder Carotinoide) oder Pflanzenhormone (Abscisinsäure, Gibberelline). Experimente mit transgenen *Arabidopsis* Pflanzen, die entweder eine erhöhte oder erniedrigte DXS-Expression aufwiesen, zeigten je nach transgener Pflanze entsprechende Gehalte dieser Terpenoide (Estévez et al., 2001). Ähnliche Ergebnisse wurden auch für Tomate (Lois et al., 2000; Enfissi et al., 2005) und Kartoffel (Morris et al., 2006) gefunden. Von der DXS gibt es je nach Pflanzenart mehrere Isoformen (z.B. Phillips et al., 2007). Bei Gerste wurde eine DXS-Typ2 (DXS2) nach Besiedlung mit Mykorrhiza-Pilzen beschrieben (Walter et al., 2000 und 2002). Bei anderen Pflanzenarten, wie Fichte (*Picea abies*; Phillips et al., 2007), Ginkgo (*Ginkgo biloba*; Kim et al., 2006) und Kiefer (*Pinus densiflora*; Kim et al., 2009) korrelierte die Terpenoidsynthese mit der Expression der DXS2. Dies führt zur Annahme, dass die DXS2 in der Synthese von Terpenoiden involviert ist (Cordoba et al., 2009).

Auch die DXR sowie die HDR (4-Hydroxy-3-Methylbut-2-Enyldiphosphat-Reduktase; Abb. 2) könnte der geschwindigkeitsbestimmende Schritt für die Synthese von IPP und DMAPP sein (Walter et al., 2000; Carretero-Paulet et al., 2006). Die HDR katalysiert dabei den letzten Schritt zur Bildung von IPP und DMAPP. Diese kontrollierende Funktion der Bildung von IPP und DMAPP der DXR und HDR variiert entlang verschiedener Pflanzenarten und Bedingungen (Cordoba et al., 2009).

1.4.3 Aromatische BVOC

Die am besten bekannten BVOC des Phenylpropanoidweges (Abb. 3) sind MeSA und Indol. Aus dem Calvin-Zyklus stammendes Erythrose-4-Phosphat und aus der Glykolyse stammendes Phosphoenolpyruvat wird zunächst zu 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonat-7-phosphat (DAHP) umgewandelt. Diese Reaktion wird von der DAHP-Synthase katalysiert (Herrmann, 1995a und 1995b; Schmid und Amrhein, 1995; Herrmann und Weaver, 1999). Nach mehreren Schritten wird Chorismat gebildet, welche einen Verzweigungspunkt für die Biosynthese vieler Metabolite, u. a. auch von Indol und MeSA darstellt (Tzin und Galili, 2010).

Die Biosynthese von Indol ist bisher am besten in Mais charakterisiert (Frey et al., 2000 und 2004). Emissionen von Indol sollen bei Mais über die *Zea mays* Indol-3-glycerinphosphat-Lyase (ZmIgl) katalysiert werden. Indol-3-glycerinphosphat wird über die ZmIgl in Glycerinaldehyd-3-Phosphat und in flüchtiges Indol umgewandelt (Frey et al., 2000). In Mais sind zwei weitere Enzyme (BX1 und TSA) vorhanden, die in der Biosynthese von Indol involviert sind. BX1 (Benzoxazin 1) bildet Indol für die Biosynthese von sogenannten Benzoxazinonen (Frey et al., 2000). Benzoxazinone kommen vor allem in Gräsern, aber auch in wenigen Familien der dikotylen Pflanzen (*Acanthaceae*, *Scrophulariaceae*, *Ranunculaceae*) vor (Sicker et al., 2000). Diese wirken toxisch auf eine Vielzahl von Insekten und Pathogenen (Heath, 1987; Grün et al., 2005). TSA ist die α -Untereinheit der Tryptophansynthase. Zusammen mit der β -Untereinheit (TSB) bilden sie den aktiven Komplex der Tryptophansynthase (Kriechbaumer et al., 2008). In diesem Komplex wird Indol vorübergehend gebildet und zu Tryptophan umgewandelt. Jedoch führt vermutlich ausschließlich die Igl zu Emission von Indol (Frey et al., 2000). Für Reis konnten fünf zu der ZmIgl homologe Gene nachgewiesen werden. Nach einem Insektenbefall wurden ausschließlich eine Erhöhung der Expression des Gens Os03g58300 sowie Indolemissionen nachgewiesen. Daher wurde dieses Gen als OsIgl (*Oryza sativa* Igl) bezeichnet. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass die anderen vier Gene von Reis unter bisher

unbekannten Bedingungen induziert werden und zu Indolemissionen führen (Zhuang et al., 2012).

Für die Bildung von MeSA wird SA benötigt (z.B. Shulaev et al., 1997). Es wird angenommen, dass SA über zwei Biosynthesewege entstehen kann (Abb. 3). Ein möglicher Biosyntheseweg von SA kann über die Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) erfolgen (Dempsey et al., 2011). Hierbei wird Phenylalanin über die PAL zu *trans*-Zimtsäure umgewandelt. Über Benzoessäure wird schließlich SA gebildet (Mauch-Mani und Slusarenko, 1996). Des Weiteren ist eine Bildung von SA über *ortho*-Cumarsäure möglich (Yalpani et al., 1993).

Wildermuth et al. (2001) entdeckten einen alternativen SA-Biosyntheseweg. Dabei wird SA direkt aus Chorismat über Isochorismat gebildet. Über welchen Biosyntheseweg SA gebildet wird ist dabei je nach Pflanzenart unterschiedlich. Bei *Arabidopsis thaliana* wird SA z.B. überwiegend über Isochorismat gebildet (Übersicht in Dempsey et al., 2011).

Gebildete SA kann durch das Enzym SA-Methyltransferase (SMT) zu MeSA methyliert werden (Chen et al., 2003). Hierbei wird eine Methylgruppe von S-Adenosyl-L-methionin zur Carboxylgruppe der SA übertragen. Unter konstanten Temperatur- und Lichtintensitätsbedingungen, spiegelt bei Tomatenpflanzen die Emission von MeSA die pflanzeninterne Konzentration von SA wider (Miebach 2008).

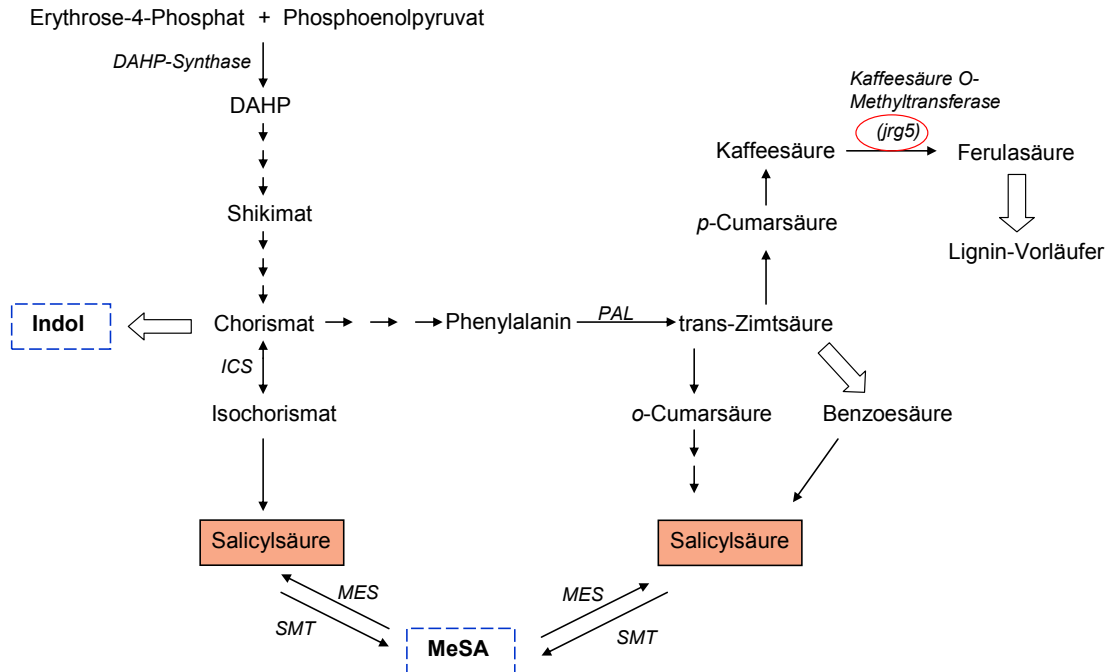


Abb. 3: Biosynthese von Methylsalicylsäure und Indol (blau gestrichelte Umrandung)

Enzyme sind kursiv dargestellt, wobei rot umkreiste Enzyme in dieser Arbeit näher für die Betrachtung der Stoffwechselwege untersucht wurden. Schwarze Pfeile zeigen die direkte Biosynthese der jeweiligen Verbindung an. Offene Pfeile deuten mehrere Biosyntheseschritte an. Abkürzungen: DAHP, 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonat-7-phosphat; ICS, Isochorismat-Synthase; jrg5, jasmonate-responsive gene 5; MES, Methyltransferase; MeSA, Methylsalicylsäure; PAL, Phenylalanin-Ammonium-Lyase; SMT, Salicylsäure-Methyltransferase (verändert nach Dempsey et al., 2011; Lee et al., 1997a und b).

1.5 Gerste als Modellorganismus

Gerstenpflanzen gehören zu den ältesten Getreiden, da sie bereits vor über 10.000 Jahren von Wildtypen von *Hordeum* (u. a. *Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*) domestiziert wurden. Unter den Getreidearten ist Gerste bezüglich der Produktion neben Weizen, Mais und Reis weltweit eine der wichtigsten Zerealien (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAOSTAT, Stand 2009, <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>). Gerste wird in der Lebensmittel- sowie in der Futtermittelindustrie verwendet (Poehlman, 1985). Dabei wird zwischen zweizeiligen und sechszeiligen Gersten je nach Anzahl der Samen am Halm unterschieden (z.B. Goldammer, 2008). In Deutschland werden zweizeilige Gersten aufgrund ihres niedrigeren Eiweißgehaltes überwiegend zur Bierherstellung verwendet (Goldammer, 2008; Ullrich, 2011).

Nach der FAOSTAT wurden in Deutschland im Jahr 2009 über 112 Millionen Tonnen Gerste geerntet. Allerdings wird geschätzt, dass Ernteverluste aufgrund von Pathogenen, Herbivoren und Unkräutern, immer noch den Ertrag um mehr als 50% reduzieren (Oerke und Dehne, 1997).

Mittlerweile existiert eine Vielzahl an molekularen Daten und Datenbanken von Gerste (Überblick in Sreenivasulu et al., 2008). Das Leibniz Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenuntersuchungen (IPK) in Gatersleben besitzt eine umfangreiche Samenbank, bestehend aus Wildtypen von Gerste sowie aus charakterisierten, modernen, durch Inzucht erzeugte Linien, welche zum Teil bereits im Hinblick auf genbasierende molekulare Marker charakterisiert wurden. Aufgrund dieser molekularen Marker ist eine genetische Kartierung bei Gerste möglich, d.h. bestimmte Eigenschaften können bestimmten Chromosomenorten zugeordnet werden.

Ein weiterer Vorteil von Gerste ist der geringe Ploidiegrad. Während z.B. Weizen ein hexaploides Genom ($2n=6x=42$) besitzt, verfügt Gerste dagegen nur ein diploides Genom ($2n=2x=14$). Die Identifizierung von molekularen Markern ist also wesentlich einfacher. Gewonnene Erkenntnisse bei Gerste sind jedoch auf Weizen übertragbar, da viele Merkmale zwischen Gerste und Weizen stark konserviert sind und die Anordnung der Gene sehr ähnlich ist (Mayer et al., 2011).

Des Weiteren erlaubt die Verfügbarkeit von kommerziellen Microarrays (Gerste Genchip 1), bestehend aus 21.000 Einzelgenen, die Untersuchung der Genexpressionen von bestimmten Stoffwechselwegen als Antworten von Stress. Hierdurch können Schlüsselenzyme identifiziert werden, die möglicherweise in ihrer Regulation während der Züchtung von modernen Gerstensorten verändert wurden. Dadurch wird Gerste zu einem idealen Untersuchungsobjekt.

1.6 Zielsetzung der Arbeit und prinzipielle Vorgehensweise

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Stressreaktionen verschiedener Gerstensorten analysiert werden, um Anhaltspunkte für mögliche Verluste der pflanzlichen Abwehreigenschaften zu erlangen. Dazu sollten BVOC-Emissionen aus Gerste untersucht werden, da diese eine nicht-invasive Methode zur Bestimmung der pflanzlichen Stressreaktionen darstellen. Erstmals sollten BVOC-Emissionen von modernen Hohertragssorten mit denen ihrer Vorfahren, alter Landsorten von Gerste verglichen werden. Wildformen wurden nicht weiter berücksichtigt, da hier - im Vergleich zu alten Landsorten - mögliche Rückkreuzungen zur Verbesserung der Stressresistenz der modernen Hohertragssorten schwieriger durchzuführen sind.

Für eine statistisch abgesicherte Ermittlung der Emissionen sollte eine Anlage aufgebaut werden, mit der es möglich war mehrere Gerstenpflanzen parallel zu untersuchen. In einem ersten Screening sollten die durch Applikation des abiotischen Stressors Methyljasmonat (MeJA) induzierten BVOC-Emissionen analysiert werden (Boland et al., 1995; Koch et al., 1999). Ziel dieses Screening-Experiments war eine Unterscheidung der Sorten anhand ihrer Emissionsstärken in Sorten mit einer geringen und starken Antwort der BVOC-Emission, um so eine Auswahl der am besten geeigneten Gerstenvarietäten für weitergehenden Untersuchungen treffen zu können.

Ausgewählte Sorten sollten dann hinreichend häufig auf ihre Emissionen nach MeJA- und Ozonexposition untersucht werden. MeJA-Exposition wurde genutzt, um einen Herbivoriebefall zu simulieren, Ozonexposition soll vergleichbare Reaktionen wie nach einem Pathogenbefall auslösen (siehe Kapitel 1.3).

Eine weitere Fragestellung war, ob die Expositionen mittels MeJA und Ozon tatsächlich ein vergleichbares Emissionsmuster wie nach einem Schädlingsbefall induzieren. Exemplarisch wurde daher ein Pathogenbefall mit *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* durchgeführt.

Neben den Emissionen sollte auch untersucht werden, ob andere Bestandteile des Sekundärmetabolismus verändert sind. Ziel war metabolische Unterschiede sowie die dafür verantwortlichen Enzyme und Stoffwechselwege aufzuklären. Die metabolischen Unterschiede sollten anhand der endogenen Gehalte der Pflanzenhormone JA und SA analysiert werden. Darüber hinaus sollten verschiedene Enzyme näher untersucht, die eine Rolle in der Biosynthese der Emissionen spielen. Hierzu gehören u. a. die Hydroperoxid-Lyase, welche in der Biosynthese der GLVs involviert ist (Blée, 1998) sowie die Allenoxidsynthase und Allenoxidcyclase, welche in der JA-Biosynthese beteiligt sind (Ziegler et al., 2001). Neben diesen Enzymen der emissionsrelevanten Biosynthesewege sollten weitere stressassoziierte Proteine, wie PR-Proteine untersucht werden. Diese Untersuchungen sollten Hinweise liefern, inwieweit sich die pflanzlichen Abwehrmechanismen zwischen alten und modernen Gerstensorten unterscheiden.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien

In der Tabelle 1 sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Chemikalien aufgelistet. Salicylsäureglucosid (SAG) wurde von Prof. Dr. H. Kneifel, Forschungszentrum Jülich nach der Synthesevorschrift von Gryniewicz et al. (1993) hergestellt.

Tab. 1: Verwendete Chemikalien

Substanz	Firma
Agarose	Bio-Rad (München)
β-Mercaptoethanol	Merck (Darmstadt)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich (Steinheim)
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Fluka (Buchs, Schweiz)
Essigsäure	Merck (Darmstadt)
Ethanol 99,8 %	KMF Laborchemie Handels GmbH
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Gene Ruler™ 1 kb Ladder	Fermentas (St. Leon-Roth)
Glycerin	Merck (Darmstadt)
Hefeextrakt	Merck (Darmstadt)
iQTM SYBER® Green Supermix	Bio-Rad (München)
iScript™ cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad (München)
Jasmonsäure	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Kaliumchlorid	KMF (Lehmar)
Magnesiumchlorid x 4H ₂ O	Merck (Darmstadt)
Methanol	Merck (Darmstadt)
Methyljasmonat (MeJA)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Nähragar	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid > 99,5 %	Roth (Karlsruhe)
Optosil®	Heraeus Kulzer (Dormagen)
Salicylsäure	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck (Darmstadt)
Tris (ultrapure)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Xylencyanol	Bio-Rad (München)

2.2 Geräte

In der Tabelle 2 sind die Geräte aufgeführt, welche für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche verwendet wurden.

Tab. 2: Verwendete Geräte

Gerät	Modell	Firma
Adsorptionstrockner	Ecodyr KE-MT multitronic	Zander (Essen)
Brutschrank	Modell 300	Memmert (Schwabach)
Brutschüttler	TH 15	Johanna Otto GmbH (Hechingen)
Drei-Wege-Magnetventile	Galtek, PVA-T4-T4-2	Teltec (Mainhardt)
Feinwaagen	PB3002-5	Mettler Toledo (Giessen)
	Explorer	OHAUS (Giessen)
GC-MS	GC: HP 5890 Serie II	Agilent Technologies (Waldbronn)
	MS: HP 5972	Agilent Technologies (Waldbronn)
	Thermodesorptionssystem	Gerstel (Mühlheim an der Ruhr)
	Kaltaufgabesystem	Gerstel (Mühlheim an der Ruhr)
Infrarot-Messgerät	LI-COR 7000	LI-COR Biosciences (Bad Homburg)
Kugelmühle	MM 200	Retsch (Haan)
Massenflussregler	Für 10 L/min: F-201CV-10K-RAD-00-V	Bronkhorst / Mättig (Kamen)
	Für 50 ml/min: F-201CV-050-RAD-00-Z	
	Für 50 L/min: F-202AV-M20-RAD-00-V	
MilliQ-Anlage	MilliQ-Gradient	Millipore (Schwalbach)
Palladium-Katalysator	-	Eigenbau Forschungszentrum Jülich
PCR-Gerät	RoboCycler Gradient 96	Stratagene (Heidelberg)
Pflanzenkammer-Beleuchtung	LED Panels, SL 3500-W-G	Photon Systems Instruments (Tschechien)
Pflanzenkammer-Kühlung	Clima Butler Split, RCS-55000UC	Kältetechnik Bucher (Talheim)
pH-Meter	Accumet model 15	Fischer Scientific (Schwerte)
qRT-PCR-Gerät	iCycler MyIQ	Bio-Rad (München)
Seifenblasen-Strömungsmesser	Gilibrator II	DEHA Haan & Wittmer (Heimsheim)
Spannungsversorgung	Power Pac 300	Bio-Rad (München)
Spectrophotometer	NanoDrop	Thermo Fisher Scientific (Wilmington)
Taupunktspiegel	MTS MK1	Walz (Effeltrich)
Thermoblock	Thermoblock comfort	Eppendorf (Hamburg)
Vakuum-Zentrifuge	Concentrator 5301	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge	Centrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg)

2.3 Pflanzenmaterial

Die Samen von 31 verschiedenen Sommergersten wurden vom IPK in Gatersleben bezogen (Tab. 3). Es wurden alte sowie moderne Sorten unterschiedlichen Ertrags verwendet, die sich darüber hinaus in der Zeiligkeit der Ähren unterschieden.

Tab. 3: Liste der 31 Gerstensorten

BCC-Nummer: Internationaler Barley Core Collection (BCC). Sammlung von genetisch gut definierten Accessionen mit möglichst großer Diversität, die aus vorhandenen Sammlungen gebildet wird (Knüpfper und van Hintum, 1995). Diese Accessionen sind vom IPK Gatersleben charakterisiert und dokumentiert. Farblich unterlegt sind die Sorten, die für vertiefende Versuche ausgewählt wurden. Grau unterlegt traditionelle Sorten. Gelb unterlegt moderne Sorten.

BCC-Nummer	Abkürzung Accessionsnamen	Vollständiger Accessionsnamen	Ähren (2/6-zeilig)
HOR 1804	HOR 1804	<i>Hordeum vulgare</i> L. convar. <i>vulgare</i> var. <i>hybernum</i> Vib.	6
BCC 421	Xin Mai 1 Hao	<i>Hordeum vulgare</i> L. convar. <i>vulgare</i> var. <i>hybernum</i> Vib	6
BCC 447	Mulan	<i>Hordeum vulgare</i> L. convar. <i>vulgare</i> var. <i>hybernum</i> Vib	6
BCC 579	Bijoria	<i>Hordeum vulgare</i> L. convar. <i>vulgare</i> var. <i>hybernum</i> Vib.	6
BCC 719	Senshutsu 18	<i>Hordeum vulgare</i> L. convar. <i>vulgare</i> var. <i>hybernum</i> Vib.	6
BCC 149	IG 32019	<i>Hordeum vulgare</i> L. convar. <i>vulgare</i> var. <i>hybernum</i> Vib.	6
BCC 167	Shayir IG 32973	<i>Hordeum vulgare</i> L. convar. <i>vulgare</i> var. <i>rikotense</i> Regel	6
BCC 173	IG 128104	<i>Hordeum vulgare</i> L.	6
BCC 1479	K 9338	<i>Hordeum vulgare</i> L. convar. <i>vulgare</i> var. <i>hybernum</i> Vib.	6
BCC 219	K-10628	<i>Hordeum vulgare</i> L. convar. <i>vulgare</i> var. <i>coeleste</i> L.	6
BCC 817	Beecher	<i>Hordeum vulgare</i> L.	6
BCC 1476	Afrasiab	<i>Hordeum vulgare</i> L. convar. <i>vulgare</i> var. <i>hybernum</i> Vib.	6
BCC 768	Ulleri 20	<i>Hordeum vulgare</i> L. convar. <i>intermedium</i> (Körn.) Mansf. var. <i>haxtoni</i> Körn.	6
Morex			6
BCC 1471	Nutans 115	<i>Hordeum vulgare</i> L. convar. <i>distichon</i> (L.) Alef. var. <i>nutans</i> (Rode) Alef.	2
BCC 1431	Goldfoil	<i>Hordeum vulgare</i> L. convar. <i>distichon</i> (L.) Alef. var. <i>nutans</i> (Rode) Alef.	2
BCC 899	Libra	<i>Hordeum vulgare</i> L. convar. <i>distichon</i> (L.) Alef. var. <i>nutans</i> (Rode) Alef.	2
BCC 1444	Slovensky 802	<i>Hordeum vulgare</i> L. convar. <i>distichon</i> (L.) Alef. var. <i>nutans</i> (Rode) Alef.	2
BCC 1417	Trumpf (Triumph)	<i>Hordeum vulgare</i> L. convar. <i>distichon</i> (L.) Alef. var. <i>nutans</i> (Rode) Alef.	2
BCC 1405	Plumage Archer	<i>Hordeum vulgare</i> L. convar. <i>distichon</i> (L.) Alef. var. <i>nutans</i> (Rode) Alef.	2
HOR 11373	W 23833/2196 11	<i>Hordeum vulgare</i> L. convar. <i>distichon</i> (L.) Alef. var. <i>nutans</i> (Rode) Alef.	2
BCC 1468	Tselinij 213	<i>Hordeum vulgare</i> L. convar. <i>distichon</i> (L.) Alef. var. <i>medicum</i> Körn.	2
BCC 1497	K 11749	<i>Hordeum vulgare</i> L. convar. <i>distichon</i> (L.) Alef. var. <i>persicum</i> Körn.	2
BCC 869	Gobernadora	<i>Hordeum vulgare</i> L.	2
BCC 1458	Ilmen	<i>Hordeum vulgare</i> L. convar. <i>distichon</i> (L.) Alef. var. <i>nutans</i> (Rode) Alef.	2
BCC 1390	Ingrid	<i>Hordeum vulgare</i> L. convar. <i>distichon</i> (L.) Alef. var. <i>nutans</i> (Rode) Alef.	2
HOR 930	HOR 930	<i>Hordeum vulgare</i> L. convar. <i>vulgare</i> var. <i>hybernum</i> Vib.	2
HOR 8113	HOR 8113	<i>Hordeum vulgare</i> L. convar. <i>distichon</i> (L.) Alef. var. <i>nutans</i> (Rode) Alef.	2
Barke		<i>Hordeum vulgare</i> L. cv. Barke	2
OWB rec		Oregon Wolfe Barley rec; <i>Hordeum vulgare</i> L. cv. REC	
OWB dom		Oregon Wolfe Barley dom; <i>Hordeum vulgare</i> L. cv. DOM	

Je drei alte und drei moderne Sorten wurden für detailliertere Untersuchungen verwendet (Tab. 4). Dabei wurden vier Sorten aus den 31 Sorten ausgewählt (siehe Tab. 3) und mit zwei modernen Hohertragsorten (Varde und Marthe) ergänzt. Die Samen dieser Sorten stammen ebenfalls vom IPK Gatersleben. Diese ausgewählten Sorten wurden teilweise vom IPK Gatersleben auf Anfälligkeit für zwei Mehltautypen untersucht (unveröffentlicht, Stand 2009). Die Anfälligkeit für Mehltau der Sorten Barke und Marthe wurde aus der Beschreibenden Sortenliste des Bundessortenamtes (Juni 2011) entnommen. Es wurden sowohl anfällige als auch resistente Sorten gegen Mehltau ausgewählt (Tab. 4), um die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse mit der Anfälligkeit für Mehltau zu vergleichen. Dadurch sollte ausgeschlossen werden, dass die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zufällig mit der Resistenz gegen Mehltau korrelieren. Deshalb wurden für die modernen und für die alten Sorten sowohl resistente als auch anfällige Sorten ausgewählt.

Tab. 4: Liste der sechs Gerstensorten zur Bestimmung der Emissionen nach MeJA- bzw. Ozonapplikation (je sechs Replikate)

Grau unterlegt traditionelle bis verbesserte Sorten. Gelb unterlegt moderne Sorten.

Abkürzungen wie folgt: - sehr geringer; (-) geringer; 0 mittlerer; (+) hoher Ertrag

*¹ Daten vom IPK Gatersleben (unveröffentlicht, 2009)

*² Daten vom Bundessortenamt (Stand 15. Juni 2011 in Deutschland)

BCC-Nummer	Abkürzung Accessionsnamen	Vollständiger Accessionsname	Ähren (2 /6-zeilig)	Biologischer Status	Ertrag	Resistenz gegen Mehltau
BCC 1479	K 9338	<i>Hordeum vulgare</i> L. convar. <i>vulgare</i> var. <i>hybernum</i> Vib.	6	Traditionelle Landsorte	- ^{*1}	anfällig ^{*1}
BCC 869	Gobernadora	<i>Hordeum vulgare</i> L.	2	Verbesserte Sorte	(-) ^{*1}	anfällig ^{*1}
BCC 173	IG 128104	<i>Hordeum vulgare</i> L.	6	Traditionelle Landsorte	- ^{*1}	resistent ^{*1}
Barke		<i>Hordeum vulgare</i> L. cv. Barke	2	Moderne Sorte	0 ^{*2}	resistent ^{*2}
Marthe		<i>Hordeum vulgare</i> L. cv. Marthe	2	Moderne Sorte	(+) ^{*2}	resistent ^{*2}
Varde		<i>Hordeum vulgare</i> L. cv. Varde	6	Moderne Sorte	(+) ^{*1}	anfällig ^{*1}

2.4 Pflanzenanzucht

Die Anzucht der Gerstenpflanzen erfolgte mit einem 12-stündigen Tag-Nacht-Zyklus bei einer Temperatur von 23 / 18 °C, einer Lichtintensität von $900 \pm 100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ auf Höhe Mitte Pflanze sowie einer relativen Feuchte von 60 % bei einer Temperatur von 23 °C. Es wurden immer vier Samen je Gerstensorte auf Einheitserde[®] ED73 (Ferdinand Irnich GmbH und Co. KG, Jülich) in 9 x 9 cm breiten mit einer Tiefe von 10 cm großen Töpfen ausgesät. Die Pflanzen wurden jeden Tag mit Leitungswasser gegossen.

2.5 Aufbau der Pflanzenkammern

Die Stärke von BVOC-Emissionen ist von vielen Faktoren, wie z.B. der Temperatur oder der Lichtintensität abhängig (Guenther et al., 1993; Schuh et al., 1997; Kesselmeier und Staudt, 1999; Gouinguéné und Turlings, 2002). Deshalb muss die Bestimmung der BVOC-Emissionen unter kontrollierten Bedingungen erfolgen. Dazu wurden die Pflanzen in abgeschlossene Pflanzenkammern gesetzt (Abb. 4). Diese Kammern haben ein Volumen von etwa 8 L und bestehen aus inertem Glas (Duran, Borosilikat-Glas, Schott Engineering), welches für normales sichtbares Licht durchlässig ist. Diese Pflanzenkammern sind für einen Durchflussbetrieb konstruiert. Sie sind mit je vier Gewindeflanschen (GL 25) und einem Planflansch versehen. Erstere dienen der Zu- und Abführung der Gasströme, der Temperaturmessung sowie der MeJA-Applikation. Letzterer war für den Einsatz eines Ventilators vorgesehen. In dieser Arbeit wurde jedoch von einem Ventilator abgesehen, da eine gute Durchmischung der Luft durch die gegenüberliegenden Zu- und Abführungen der Gasströme gewährleistet war.

Unterhalb der Glaskammer wurde eine Teflonplatte befestigt, welche ein Loch für einen Pflanzentopf beinhaltet. Die Pflanzen wurden von oben in das Loch der Teflonplatte in die Kammer eingeführt. Die Abdichtung des Pflanzentopfes mit der Teflonplatte erfolgte schließlich mittels Optosil[®] (Heraeus Kulzer).

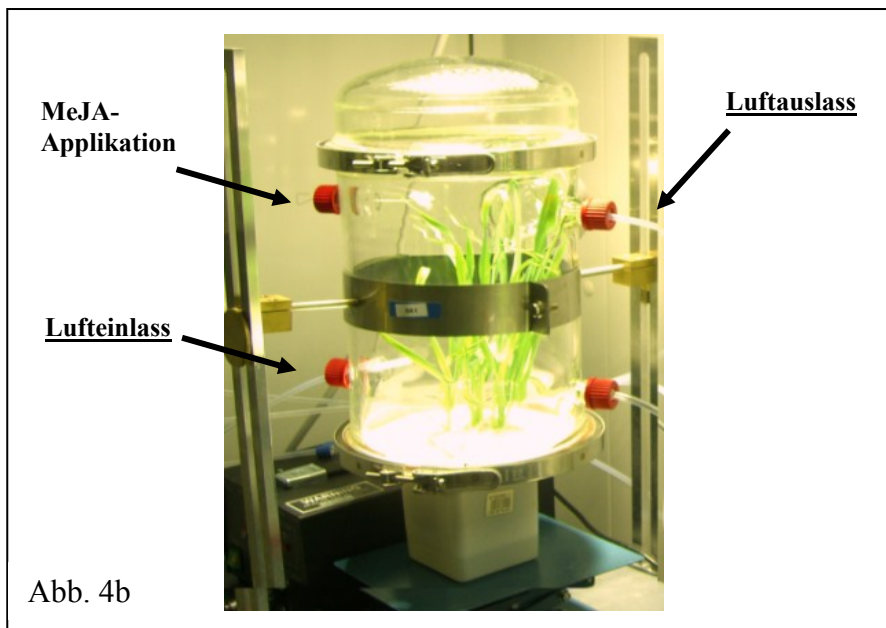
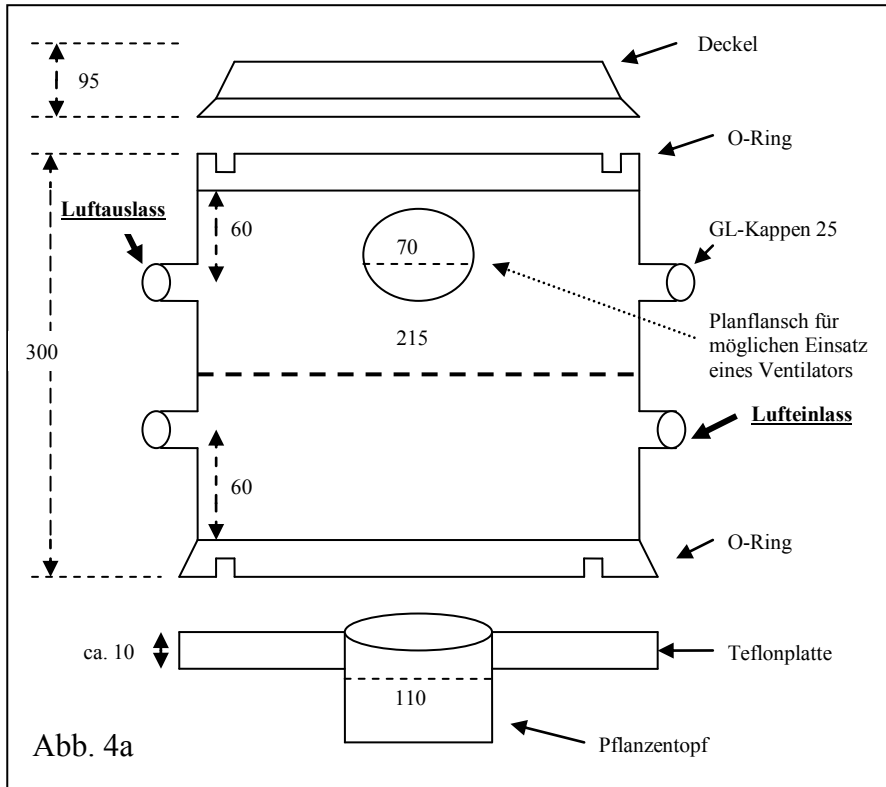


Abb. 4: Pflanzenkammer zur Exposition mit MeJA oder Ozon

4a: Schematische Darstellung einer Pflanzenkammer

4b: Foto einer Pflanzenkammer mit eingebauter Gerstenpflanze

Am Flansch „Lufteinlass“ wird Luft in die Kammer überführt. Gegenüber befindet sich der „Luftauslass“. Von dort wird die Luft zum GC-MS-System und zu den Messgeräten für die Gasphasen (CO₂, H₂O, Taupunkt) geleitet (Größen in mm). In Abb. 4b ist zusätzlich die MeJA-Applikation mittels Filterpapier sichtbar.

Oberhalb der Pflanzenkammer wurden Diodenarrays (Photon Systems Instruments, LED Panels SL 3500-W-G, weißes Licht) befestigt und eine Lichtintensität von 700 / 900 / 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Höhe des Bodens / Mitte Pflanze / Oberkante der Pflanzenkammer) eingestellt. Bei den hier durchgeführten Versuchen wurden die Pflanzen unter Dauerlicht gehalten. Um den Einfluss des Bodens auf die Transpirations- und Ozonaufnahmeraten zu minimieren, wurde der Boden mit Parafilm abgedeckt. Die Temperatur wurde auf etwa 22°C eingestellt.

Alle Leitungen bestehen aus Poly-Fluor-Ethylen (PTFE, Teflon), um Wand- sowie Memoryeffekte für die Messung der BVOC zu reduzieren. Die den Pflanzenkammern zugeführte Luft wurde zunächst gereinigt und getrocknet (Adsorptionstrockner Ecodry KE-MT multitronic, Zander). Verunreinigungen mit Kohlenwasserstoffen wurden durch einen Palladium-Katalysator (Betriebstemperatur 400 °C) beseitigt. Die aufgereinigte Luft wies eine geringe CO₂-Konzentration von ca. 100 ppm auf. Zur Gewährleistung natürlicher CO₂-Konzentrationen von etwa 350 ppm wurde CO₂ kontrolliert zu dosiert (vgl. Abb. 5). Der Luftfluss wurde bei allen Messungen auf 11 L/min im Durchfluss eingestellt. Zur Überprüfung des Luftflusses diente ein Seifenblasen-Strömungsmesser (Gilibrator II, DEHA Haan & Wittmer).

2.6 Aufbau einer Screening Anlage

Für die MeJA-Expositionsexperimente wurde eine Screening-Anlage bestehend aus vier Pflanzenkammern aufgebaut, wobei die gesamte Anlage ein offenes System darstellt (Abb. 5). Die aus drei Kammern austretende Luft wurde verworfen und nur die Luft aus der Kammer, in der die entsprechenden Messungen stattfinden, wurde den Messgeräten zugeführt. Für eine bessere konstante Regelung der Luftflüsse zu den einzelnen Pflanzenkammern wurde vor die Massenflussregler (FC) ein Vorrats- und Druckbehälter eingesetzt. Dieser Vorrats- und Druckbehälter dient somit als Puffervolumen zur Dämpfung der von den FC verursachten Schwankungen der Luftflüsse. Jede der Kammern wurde mit einem Luftfluss von 11 L/min betrieben.

2. Material und Methoden

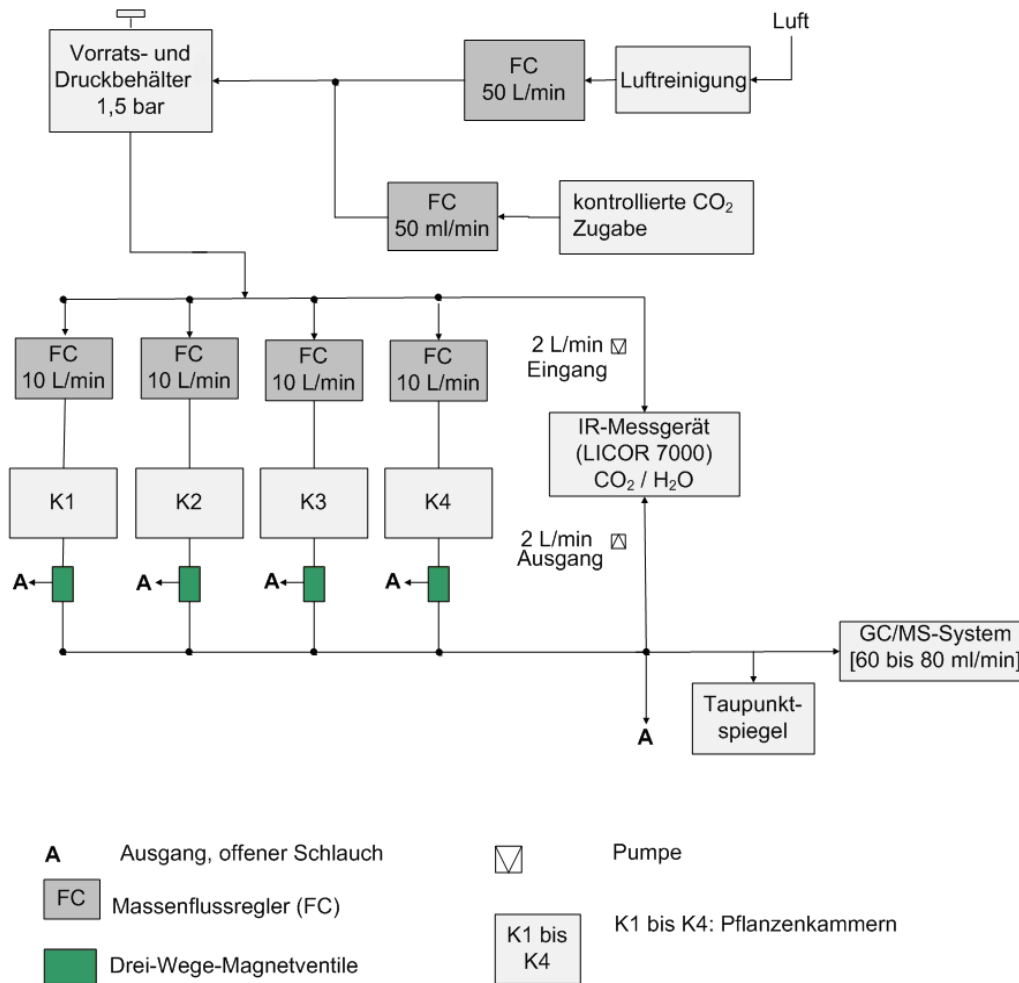


Abb. 5: Schematische Darstellung der Screening-Anlage für MeJA-Expositionsexperimente

Die Luft für die Pflanzkammern K1 bis K4 (siehe Abb. 4) wird zunächst über einen Adsorptionstrockner (Zander) und einen Katalysator gereinigt (Eingangsluft). Die Zugabe von CO₂ erfolgt über einen 50 ml/min Massenflussregler (FC). Der Vorrats- und Druckbehälter dient als Puffervolumen zur Gewährleistung von konstanten Luftflüssen. CO₂- und H₂O-Konzentrationen der Luft am Pflanzkammereingang und -ausgang werden mittels Infrarot (IR)-Messgerät (LI-COR 7000) bestimmt. Der gezeigte Taupunktspiegel (MTS MK1, Walz) dient der Überprüfung der über das IR-Messgerät gemessenen Wasserdampfkonzentrationen. Bestimmung der BVOC-Emissionen mittels automatisierten GC-MS-Systems. Die Schaltung zur Zuleitung der Luft aus der jeweilig zu messenden Pflanzkammer wurde manuell verändert.

Für die Ozonexpositionsexperimente wurde eine Versuchsanlage bestehend aus einer einzelnen Pflanzkammer aufgebaut (Abb. 6). Hierbei wurden die Temperatur und Lichtintensität innerhalb der Kammer gleich hoch wie bei den Versuchen zur MeJA-Exposition eingestellt. Die Luftführungen sind bis auf die Durchleitung durch die Ozongeneratoren (Eigenbau mit Penray Lampe zur Sauerstoff-Photolyse; $\lambda = 189 \text{ nm}$) identisch zu der Anlage für die MeJA-Expositionen.

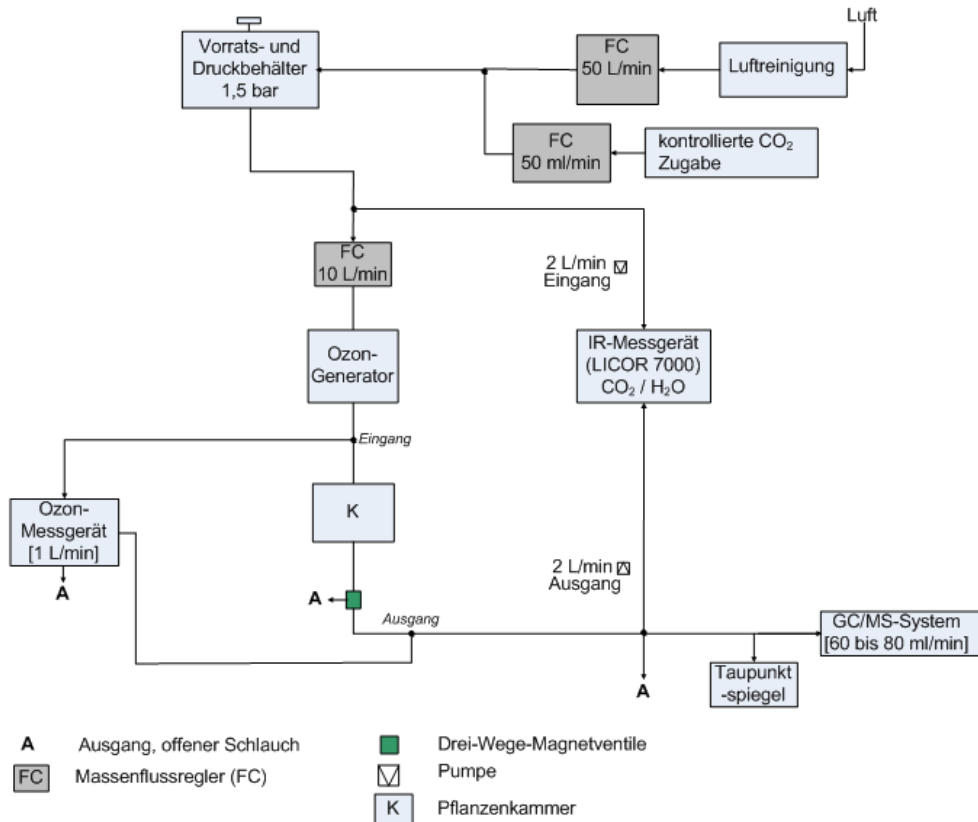


Abb. 6: Schematische Darstellung der Anlage für Ozon-Expositionsexperimente

Ozonapplikation erfolgt über einen Ozongenerator (Quecksilberentladungslampen, Jelight Company, CA, USA). Die Ozonkonzentration wird dabei am erst am „Luftreinlass“ und nach kurzer Zeit am „Luftauslass“ der Pflanzenkammer mittels Ozonmessgerät (UV Photometric O₃ Analyzer, Model 49, Thermo Environmental Instruments, USA) bestimmt.

2.7 Gasphasenmessungen

Die Transpirations- sowie Netto-Photosyntheseraten der Pflanzen und die Emissionsraten verschiedener BVOC-Emissionen wurden anhand der Differenzen der jeweiligen Konzentrationen am Ein- und Ausgang der Pflanzenkammern bestimmt (für H₂O und CO₂: LI-COR 7000). Die Trennung und Identifizierung der BVOC-Emissionen erfolgte mit einem automatisiertem Gaschromatographie-Massenspektrometer System (GC: HP 5890 Serie II, Agilent; MS: HP 5972, Agilent). Vor der Analyse der von den Pflanzen emittierten Verbindungen findet eine Anreicherung der Luftprobe statt. Dies wird über eine on-line Thermodesorptionseinheit (TDS-G 2, Gerstel) gewährleistet, wobei eine Zwischenfokussierung über einen temperaturprogrammierbaren Split-Splitlos-Injektor (Kaltaufgabesystem KAS 3, Gerstel) erfolgt. Einzelheiten des GC-MS-Systems für die Bestimmung der Konzentrationen der analysierten BVOC sowie zu der dazugehörigen

Kalibrationseinheit finden sich in Heiden et al. (1999a, 2003), Folkers (2002) und Miebach (2008). Die Zykluszeit dieser angewendeten Methode beträgt ca. 72 Minuten, wobei der chromatographische Lauf 60 Minuten benötigt und die restliche Zeit auf die Thermodesorption entfallen. Die Anreicherung der nächsten Probe im TDS erfolgt während der Chromatographie für 50 Minuten.

Die von den Pflanzen emittierten Substanzen wurden anhand der Massenspektren und ihrer Retentionszeit mit den reinen Substanzen sowie über die Benutzerbibliothek nbs75k.l identifiziert. Die Quantifizierung der Konzentrationen der Substanzen anhand der erhaltenen Chromatogramme erfolgte durch Integration der Signale einzelner Ionen auf ihren Massenspektren (Heiden et al., 1999a). Die Nachweisgrenze für die gemessenen BVOC lag bei ca. 1 ppt (siehe Heiden et al., 1999a; Folkers, 2002).

Vorversuche haben gezeigt, dass die BVOC in der Eingangsluft durch die in der vorliegenden Arbeit neu aufgebaute Luftreinigung auf Konzentrationen unter 1 ppt reduziert wurden, so dass sie mit dem vorhandenen GC-MS System nicht mehr nachzuweisen waren. Damit erübrigten sich regelmäßige Messungen zur Bestimmung der BVOC-Konzentrationen in der Zuluft der Kammern und es waren gelegentliche Kontrollen ausreichend. Die Auswertung erfolgte über die Annahme von steady state Bedingungen und als Referenzgrößen dienten Flussdichten (siehe folgendes Kapitel 2.8). Die Bestimmung der stomatäre Öffnungsweite der Pflanzen erfolgte nach Heiden et al. (1999a).

2.8 Bestimmung von Flussdichten

Zur Bestimmung der Emissions- bzw. Aufnahmearten wurde die folgende Formel genutzt:

$$\Phi(X) = \frac{F_{Luft}}{A_{Blatt}} \cdot ([X]_A - [X]_E) \quad [\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})] \quad (\text{Gleichung 1})$$

ϕ	Flussdichte bzw. Emissionsrate [mol/(m ² *s)]
F_{Luft}	Luftfluss durch die Kammer [mol/s]
A_{Blatt}	Blattfläche [m ²]
$[X]_A$	Mischungsverhältnis der Substanz X am Kammerausgang [ppb]
$[X]_E$	Mischungsverhältnis der Substanz X am Kammereingang [ppb]

Mit:

X = H₂O: Transpirationsrate

X = CO₂: Netto-Photosyntheserate

X = BVOC: BVOC-Emissionsrate

X = O₃: Ozon-Aufnahmerate

Bei den neu aufgebauten Pflanzenkammern zeigten sich keine Wandverluste von BVOC, CO₂ oder H₂O. Mögliche Wandverluste wurden anhand der BVOC α -Pinen, β -Myrcen und Limonen (Monoterpene), β -Caryophyllen (Sesquiterpen), (*Z*)-3-Hexenol (GLV) und für MeSA überprüft. Im Rahmen der Reproduzierbarkeit des Gesamtsystems (etwa als 5 %) waren keine Unterschiede in den Konzentrationen zu erkennen, wenn die BVOC am Eingang oder am Ausgang der Kammer gemessen wurden. Wandverluste für BVOC wurden daher bei der Berechnung der Emissionsraten vernachlässigt.

Bei der Applikation von MeJA mussten jedoch Wandeffekte berücksichtigt werden. MeJA wurde zwar einerseits von den Pflanzen aufgenommen, andererseits haftet MeJA auch an den Wänden der Kammer und wird nach und nach abgegeben. Aufgrund dieser Wandeffekte konnten Memoryeffekte nicht ausgeschlossen werden. Daher wurden nach jeder MeJA-Exposition die leeren Pflanzenkammern mit Ethanol gereinigt und für einen Tag mit gereinigter Luft durchspült. Danach war kein MeJA nachweisbar.

2.9 Expositionen von Gerstenpflanzen

Für die **MeJA-Expositionsexperimente** wurden fünf bis sechs Wochen alte Gerstenpflanzen in die Pflanzenkammern (vgl. Abb. 4) platziert und für einen Tag an die Kammerbedingungen akklimatisiert. Anschließend erfolgte die MeJA-Applikation, indem für jede Kammer einmalig 20 μ l MeJA (Sigma-Aldrich[®], (-)-MeJA) auf ein Filterpapier gegeben wurde, das dann in die Kammer gehängt wurde. Auf diese Weise war gewährleistet, dass MeJA über die Gasphase in die Pflanzen gelangt. Erste Reaktionen der Pflanzen erfolgten innerhalb eines Tages. Die gesamten Blätter wurden nach 48 Stunden geerntet. Die Exposition mit MeJA erfolgte die gesamten 48 Stunden. Erste Experimente zeigten, dass die Emissionsraten ab ca. 36 Stunden in einen näherungsweise steady state Zustand gelangten (vgl. Kapitel 3.2, Abb. 12). Daher war es möglich, die Emissionen nach 36 Stunden für die letzten 12 Stunden der MeJA-Exposition mittels GC-MS-System zu messen (Abb. 7a). Dadurch wurde ein höherer Durchsatz an Emissionsmessungen gewährleistet. Es wurden die 31 verschiedenen Gerstensorten (Tab. 3) mit MeJA exponiert (je Sorte ein Replikat). Nach diesem ersten Screening der Emissionen der 31 Sorten wurden die sechs ausgewählten Gerstensorten (Tab. 4) mit MeJA exponiert (je Sorte n=6). Daneben wurden Pflanzen der Sorten Barke und BCC 1479 für 2 und 12 Stunden mit MeJA exponiert (je Sorte n=2).

Für die **Ozonexpositionsexperimente** wurden ausschließlich die sechs ausgewählten Gerstensorten (Tab. 4) verwendet. Fünf bis sechs Wochen alte Gerstenpflanzen der sechs Sorten wurden jeweils in eine Pflanzenkammer gesetzt und zunächst für einen Tag an die

Kammerbedingungen akklimatisiert. Danach wurden die Gerstenpflanzen einer 60-minütigen Ozonexposition mit hohen Ozonkonzentrationen von durchschnittlich 550 ppb ausgesetzt. Diese hohen Ozonkonzentrationen waren erforderlich, da die pflanzlichen Reaktionen bei diesen hohen Ozonkonzentrationen schneller auftraten als bei niedrigen Konzentrationen (vgl. Beauchamp et al., 2005). Um eine zu große Stresseinwirkung dieser hohen Ozonkonzentration zu vermeiden erfolgte die Exposition der Pflanzen ausschließlich für eine Stunde. Des Weiteren war es nicht möglich die Emissionen während der Ozonexposition zu messen, da BVOC mit Ozon reagieren und somit keine BVOC nachweisbar sind. Die Messung der BVOC-Emissionen erfolgte über einen Tag, da die Emissionen ein pulsformiges Verhalten aufwiesen (vgl. Kapitel 3.2, Abb. 13). Die Ernte des gesamten Blattmaterials erfolgte 24 Stunden nach der einstündigen Ozonexposition (je Sorte n=6; Abb. 7b). Zusätzlich wurden Versuche mit allen sechs Sorten durchgeführt, die drei Stunden nach der einstündigen Ozonexposition geerntet wurden (je Sorte n=1).

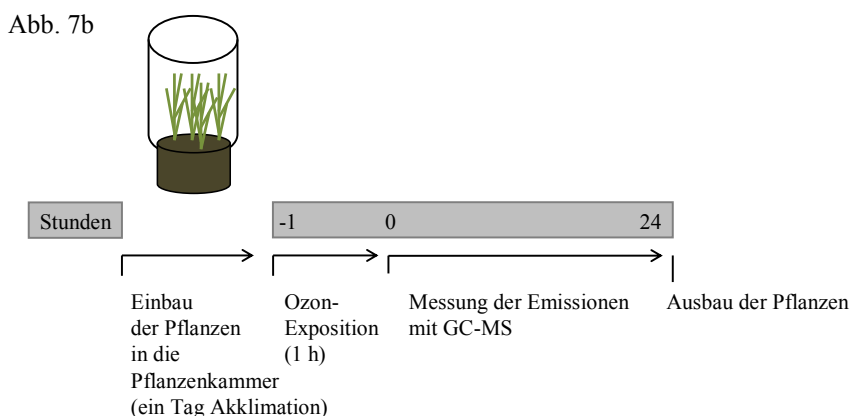
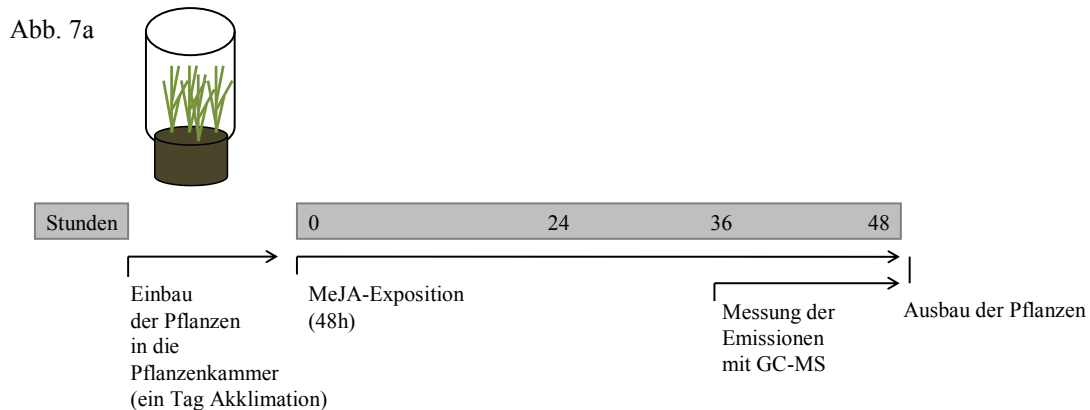


Abb. 7: Schematische Darstellung der Zeitfenster der Expositionen mit MeJA bzw. Ozon der Gerstenpflanzen

7a: Zeitfenster der MeJA-Exposition sowie Messung der Emissionen mittels GC-MS-System

7b: Zeitfenster der Ozonexposition sowie Messung der Emissionen mittels GC-MS-System

Angaben in Stunden (h). Nähere Erläuterungen siehe Text (Kapitel 2.9)

2.10 Blattflächenbestimmung und Probennahme

Für die Bestimmung der Blattfläche wurden die Gerstenpflanzen direkt nach den Experimenten ausgebaut. Es wurde ein repräsentatives Blatt der jeweiligen Gerstenpflanze entnommen, gewogen und eingescannt. Die Berechnung der einseitigen Blattfläche des eingescannten Blattes erfolgte durch die Software „ImageJ“ (National Institutes of Health). Die restlichen Gerstenblätter wurden ebenfalls entnommen, gewogen und schließlich in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die ermittelte Fläche der Einzelblätter wurde entsprechend auf die restlichen Blätter hochgerechnet. Hierbei wird angenommen, dass das Blattgewicht proportional zur Blattfläche ist. Testmessungen mit verschiedenen Gerstensorten zeigten je Sorte immer sehr gute Korrelationen zwischen beiden Größen mit einem Mittelwert von $200 \pm 27 (1\sigma) \text{ cm}^2$ Blattfläche pro g Frischgewicht. Der durch die Umrechnung von Frischgewicht auf Blattfläche entstehende Fehler ist deutlich kleiner als die gemessenen Unterschiede der Emissionsraten. Dieser Fehler wurde im Rahmen der hier durchgeführten Experimente daher vernachlässigt.

Das repräsentative Blatt wurde nach der Blattflächenbestimmung nicht weiter verwendet. Ausschließlich die restlichen Blätter der Gerstenpflanzen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Aufbereitung bei -80 °C gelagert. Unter flüssigem Stickstoff wurden die Blattproben in einem Mörser zu feinem Pulver zerkleinert und bei -80 °C aufbewahrt. Informationen zur weiteren Probenaufbereitung finden sich in den Kapiteln 2.12 und 2.13.

2.11 Kontrollexperimente und Fehlerrechnung

Kontrollpflanzen

Neben den beiden Behandlungsvarianten MeJA und Ozon wurden Pflanzen ohne Exposition in die Pflanzenkammer gestellt (Kontrollpflanzen). Dazu wurden fünf bis sechs Wochen alte Pflanzen in die Pflanzenkammer überführt und für einen Tag an die Kammerbedingungen akklimatisiert. Anschließend standen die Pflanzen für weitere 48 Stunden in der Pflanzenkammer ($n=6$). Diese Pflanzen wurden als Kontrollpflanzen für die Pflanzen der 48-stündigen MeJA-Exposition sowie für die ozonexponierten Pflanzen, die 24 Stunden nach der einstündigen Ozonexposition geerntet wurden, verwendet (Tab. 5). Für die Genexpressionsanalysen konnten diese Kontrollpflanzen jedoch nicht herangezogen werden und es wurden Kontrollpflanzen für die Sorten BCC 1479 und Barke durchgeführt, welche

nach einer eintägigen Akklimation an die Kammerbedingungen nach weiteren 25 Stunden (entspricht 24 Stunden nach einer einstündigen Ozonexposition) geerntet wurden.

Zusätzlich wurden weitere Pflanzen ohne Exposition in die Pflanzenkammer gestellt, wobei diese auch zuvor einen Tag an die Kammerbedingungen akklimatisiert wurden. Die Pflanzen der Sorte Barke und BCC 1479 standen anschließend für weitere 2 bzw. 12 Stunden ohne Exposition in der Pflanzenkammer (n=2). Diese Pflanzen dienten als Kontrollen der Pflanzen, welche 2 bzw. 12 Stunden mit MeJA exponiert wurden. Des Weiteren standen Pflanzen aller sechs Sorten nach der eintägigen Akklimation für weitere vier Stunden in der Pflanzenkammer (n=1). Diese wurden als Kontrollpflanzen der ozonexponierten Pflanzen herangezogen, welche drei Stunden nach der einstündigen Ozonexposition geerntet wurden (Tab. 5).

Tab. 5: Übersicht der Erntezeitpunkte der mit MeJA bzw. Ozon exponierten Pflanzen und den entsprechenden Kontrollpflanzen sowie der Angabe der Replikatzahl

Alle Pflanzen wurden immer zuvor für einen Tag an die Bedingungen der Pflanzenkammer akklimatisiert. Anschließend erfolgte die Exposition mit MeJA bzw. Ozon oder die Kontrollpflanzen standen entsprechend für weitere Stunden ohne Exposition von MeJA bzw. Ozon in der Pflanzenkammer. * Für Punkt 4. ist zu beachten, dass für die Genexpressionsanalysen für die Sorten BCC 1479 und Barke Kontrollpflanzen verwendet wurden, welche nach weiteren 25 Stunden geerntet wurden (n=2).

	Exponierte Pflanzen	Kontrollpflanzen	Replikatzahl je Sorte (n)
	eintägige Akklimation. Danach Erntezeitpunkt nach weiteren:	eintägige Akklimation. Danach Erntezeitpunkt nach weiteren:	
1.	48 h nach Beginn der MeJA-Exposition	48 h	6
2.	12 h nach Beginn der MeJA-Exposition	12 h	2
3.	2 h nach Beginn der MeJA-Exposition	2 h	2
4.	24 h nach Ende der Ozonexposition	48 h (wie bei 1.)*	6
5.	3 h nach Ende der Ozonexposition	4 h	1

Fehlerrechnung

Wenn bei Kontrollpflanzen Emissionen nachweisbar waren, wurden diese von denen nach der Exposition mit MeJA oder Ozon abgezogen. Hierzu wurde der Mittelwert der Emissionsraten, der für die sechs Kontrollexperimente gemessenen einzelnen emittierten Substanzen von den einzelnen Substanzen der exponierten Pflanzen je Replikat abgezogen.

Um zu überprüfen, ob sich die Emissionsraten der Kontrollpflanzen von denen der durch die Exposition induzierten Emissionen unterscheiden, wurde die Messunsicherheit nach dem Gauß'schen Fehlerfortpflanzungsgesetz (Gleichung 2) berechnet.

$$\Delta G \equiv \sqrt{\left(\frac{\partial G}{\partial x} \Delta x\right)^2 + \left(\frac{\partial G}{\partial y} \Delta y\right)^2} \quad (\text{Gleichung 2})$$

$$\Delta G \equiv \sqrt{(1 * \Delta x)^2 + (1 * \Delta y)^2}$$

Mit:

ΔG	wahrscheinliche Messunsicherheit (Fehler der Messung)
x	Mittelwerte der Emissionsraten der sechs Replikate unter behandelten Bedingungen (nach Exposition)
y	Mittelwerte der Emissionsraten der sechs Replikate unter unbehandelten Bedingungen (Kontrolle)
$\Delta x, \Delta y$	Standardfehler des Mittelwertes der einzelnen Messgrößen x, y
$\frac{\partial G}{\partial x}, \frac{\partial G}{\partial y}$	Partielle Ableitung der Funktion $G = f(x, y)$ nach den Messgrößen x, y

Zusätzlich wurde eine Varianzanalyse mit einem Zweistichproben t-Test durchgeführt, um die Wahrscheinlichkeit des Unterschiedes zwischen unbehandelten und exponierten Pflanzen zu bestimmen. Es wurden weitere Zweistichproben t-Tests durchgeführt, um die Wahrscheinlichkeit des Unterschiedes der Emissionen innerhalb einer Gerstensorte und zwischen zwei Sorten zu untersuchen. Einfaktorielle ANOVA-Analysen ergaben für die ermittelten Werte der Emissionsraten der alten Landsorten und der modernen Hohertragsorten keine Normalverteilung sowie keine Varianzhomologie. Daher wurden in dieser Arbeit von ANOVA-Analysen abgesehen. Die Durchführung eines Zweistichproben t-Tests war dagegen möglich, da die Emissionsraten zwischen zwei Sorten Varianzhomologie aufwiesen.

2.12 Bestimmung der endogenen Jasmonsäure (JA)-, Salicylsäure (SA)- und Salicylsäureglucosid (SAG)-Gehalte

Die Bestimmung der endogenen JA-, SA- und SAG-Gehalte für alle Gerstenpflanzen erfolgte zunächst nach Segarra et al. (2006) mittels Flüssigkeitschromatographie Elektrospray-Ionisation gekoppelt mit Massenspektroskopie (Liquid chromatography electrospray ionisation tandem mass spectrometry, LC-ESI-MS/MS). Aufbau des verwendeten LC-ESI-MS-Systems und die dazugehörigen Parameter der in dieser Arbeit angewendeten Methode finden sich in Koch (2008).

Aufgrund von Problemen durch Ausfällen der Proben nach der Verdünnung mit Wasser wurde die Probenvorbereitung verändert. Es wurde statt der Methanol-H₂O-Essigsäure-Extraktionslösung (90:9:1, v/v/v) nach Segarra et al. (2006) eine Methanol-H₂O-Essigsäure-Extraktionslösung (60:39:1, v/v/v) verwendet. Die Extraktion erfolgte mit zusätzlich 100 mg Seesand und eine zweite Extraktion des Sediments mit 200 µl Extraktionslösung wurde eingearbeitet. Nach Auffüllen des Extraktes auf 2 ml mit Extraktionslösung wurde der Extrakt gefiltert (GHP Acrodisc[®] 13 mm Syringe Filter mit 0,45 µm GHP Membran, PALL, Life Science). Diese Optimierungsschritte der Extraktion ergaben eine doppelt so hohe Ausbeute an JA sowie eine verbesserte Reproduzierbarkeit der Ergebnisse im Vergleich zu der Extraktion nach Segarra et al. (2006).

In der Abbildung 8 sind die Kalibrationen von JA, SA und SAG dargestellt. Freie SA war ohne Zudotierung des SA-Standards bei keiner Pflanze nachweisbar. Nach Zudotierung des SA-Standards in die Pflanzenextrakte war SA ab 10 nM (entspricht etwa 7 ng/g FG) nachweisbar.

Das Detektorrauschen lag bei einer Peakfläche < 10 counts (< 0,01 nM). Bei einer Quantifizierung der Ergebnisse müssen sogenannte Ionensuppressionen berücksichtigt werden. Ionensuppressionen können durch co-eluierende Analyten oder Matrixsubstanzen entstehen und können das Signal des zu analysierenden Ions vermindern (Matuszewski et al., 2003). Zur Bestimmung des Matrixeffekts wurden daher Kalibrationen durchgeführt. Hierzu wurden 4 bzw. 5 verschiedene Konzentrationen des internen Standards JA, SA und SAG zu allen sechs Gerstensorten sowie zu dem reinen Extraktionsmittel zudotiert (Abb. 8). Anhand dieser Kalibrationen wird deutlich, dass aufgrund der Pflanzenproben Matrixeffekte bestehen. Für die Konzentrationsbestimmungen der jeweiligen endogenen Gehalte der verschiedenen Sorten wurden daher die Peakflächen der Analyten in den jeweiligen Kalibrationen der entsprechenden Pflanzen verwendet. Da schon in den Kontrollpflanzen ohne Zudotierung eines internen Standards Konzentrationen von JA bzw. SAG nachweisbar waren, erfolgte die

Konzentrationsberechnung ausschließlich über die Steigung der jeweiligen Trendlinie. Die Bestimmung der Konzentrationen von JA, SA und SAG wurde für alle Pflanzen unter behandelten (MeJA bzw. Ozon exponiert) sowie unter unbehandelten (Kontrollen) Bedingungen durchgeführt. Die Anzahl der Wiederholungen variierte je nach Messzeitpunkt. Die Wiederholungen sowie die entsprechenden Kontrollpflanzen sind der Tabelle 5 zu entnehmen. Zusätzlich wurden die endogenen Inhaltsstoffe der Sorte BCC 173 bestimmt, welche mit *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* infiltriert wurde. Als Kontrolle dienten Pflanzen, welche mit 100 mM MgCl₂ infiltriert wurden (n=1).

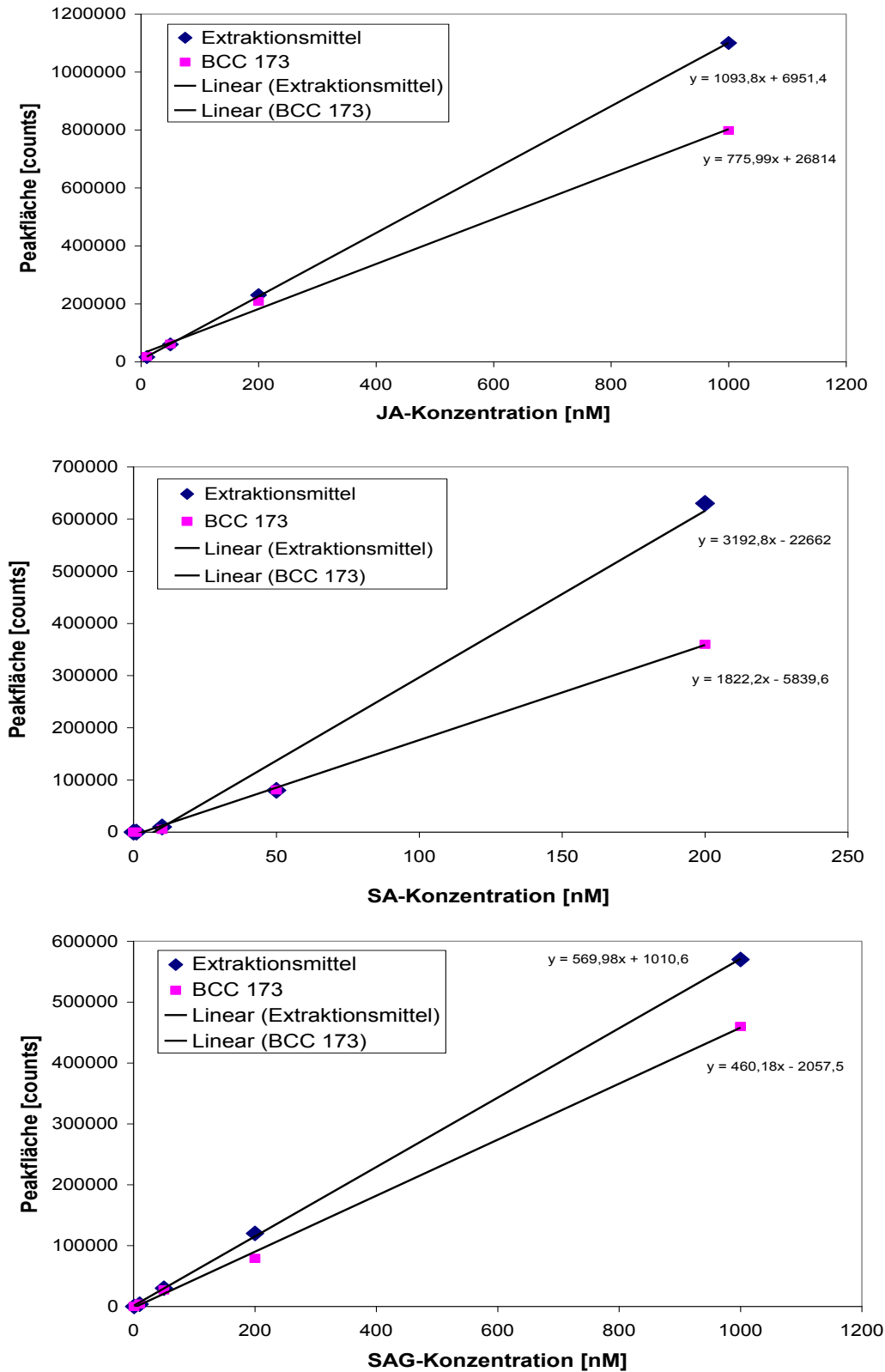


Abb. 8: Kalibrationen von JA, SA und SAG

Es wurden verschiedene Konzentrationen des jeweiligen Standards zu dem reinen Extraktionsmittel und exemplarisch zu dem Extrakt der unbehandelten Gerstensorte BCC 173 dotiert. Für die JA-Kalibration wurden 10, 50, 200, 1000 nM JA zudotiert. Für die SA-Kalibration wurden kleinere SA-Konzentrationen gewählt (1, 10, 50, 200 nM). Für die SAG-Kalibration wurde 1, 10, 50, 200, 1000 nM SAG zudotiert.

2.13 Molekularbiologische Methoden

2.13.1 Verwendete genspezifische Primer

Die Expressionsstärke verschiedener Gene, welche bei den emissionsrelevanten Biosynthesewegen, aber auch an weiteren Stressreaktionen beteiligt sind, wurde mithilfe der quantitativen Real-Time Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) ermittelt (Kapitel 2.13.8). Dazu war es zunächst notwendig genspezifische Primer (Oligonukleotide) für die zu analysierenden Gene zu identifizieren. Die Nukleotidsequenz der Primer wurde anhand von Sequenzrecherchen- und vergleichen des Programms „nucleotide blast“ von National Center for Biotechnological Information (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ermittelt. Für das Design der Primer wurde das Programm DNAMAN Version 4.1 (Lynnon BioSoft, Canada) verwendet.

Bis auf die Gene der DXS und der HMGR lagen für alle im Rahmen dieser Arbeit betrachteten Gene bereits Gerstensequenzinformationen vor und die Primer dieser Gene konnten aus publizierten Nukleotidsequenzen von Gerste ermittelt werden. In der Tabelle 6 sind die in dieser Arbeit angewendeten genspezifischen Primer aufgelistet.

Für die DXS und HMGR musste daher zunächst ein hochkonservierter Nukleotidbereich der DXS bzw. der HMGR aus bekannten Sequenzen verschiedener Pflanzenarten ermittelt werden. Für die DXS wurden genspezifische Primer der DXS2 von bekannten DXS2-Nukleotidsequenzen von Mais und Reis sowie von weiteren Pflanzenarten nach Phillips et al. (2007) abgeleitet (Tab. 6). Genspezifische Primer für die HMGR wurden aus den Nukleotidsequenzen der drei HMGR-Gene (*Hmg*) von Reis, der zwei von *Arabidopsis thaliana* sowie die der HMGR2 von Tomate nach Ha et al. (2001) abgeleitet (Tab. 6).

Die amplifizierte Fragmente der DXS sowie der HMGR zeigten jedoch keine Ähnlichkeit mit den jeweiligen bekannten Sequenzen der verschiedenen Pflanzenarten. Es ist daher davon auszugehen, dass keine genspezifischen PCR-Produkte generiert wurden. Daher wurde in weiteren Untersuchungen auf die Analyse der Expressionsstärke dieser Gene verzichtet.

Mittels der weiteren abgeleiteten Primer (Tab. 6) konnten alle anderen Genprodukte einwandfrei nachgewiesen werden.

Die Expression der LOX wurde anhand der 13-LOX (LOX2-Typ) untersucht (Feussner und Wasternack, 2002). Bei Gerste wurden zwei Isoformen mit einer molekularen Masse von 92 und 100 kDa (LOX-92 und LOX-100) nachgewiesen und in den LOX2-Typ eingruppiert (Vörös et al., 1998). In dieser Arbeit wurden Primer für LOX-100 abgeleitet.

Für die Untersuchung der GLVs wurden Gerstensequenzinformationen von der HPL nach Koeduka et al. (2003) verwendet. Die in dieser Arbeit ermittelten ct-Werte (siehe Kapitel

2.13.8) der HPL waren jedoch sehr hoch und die Schmelzkurven waren für alle untersuchten Gerstensorten sowie Behandlungsvarianten nicht spezifisch. Demnach konnten ungewollte Nebenprodukte während der PCR nicht ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse der HPL-Expression konnten daher nicht weiter berücksichtigt werden.

Für Gerste sind drei AOS-Formen isoliert (AOS1, AOS2 und AOS3; Maucher et al., 2000 und 2004). Von den drei verschiedenen AOS-Formen wurde in dieser Arbeit die AOS2 untersucht (Acc. Nr. AJ251304). Zudem wurden die Sequenzinformationen der von Maucher et al. (2004) charakterisierten AOC aus *Hordeum vulgare* cv. Salome verwendet (Acc. Nr. AJ308488).

Die PR-Proteine wurden u. a. anhand des basischen PR-1 Proteins (PR-1b; Acc. Nr. X74940) untersucht. Weitere Gruppen der PR-Proteine sind Lipid Transfer Proteine (LTP) und Thionine (TH) (van Loon und van Strien, 1999). Im Blattgewebe von Gerste wurden vier LTP-Isoformen nachgewiesen (Molina und García-Olmedo, 1993; Molina et al., 1993). Für die vierte LTP-Isoform wurden Primer aus drei verschiedenen LTP4-Isogenen von Gerste abgeleitet (Acc.Nr. AAA03284, Z66529, Z66528).

Die Untersuchung der Thionine erfolgte in dieser Arbeit anhand des blattspezifischen Typs-II von fünf bekannten Typen (Übersicht in García-Olmedo et al., 1996). Dazu wurden Primer aus drei verschiedenen blattspezifischen TH (DB4, BTH6 und DG3) ermittelt (Bohlmann und Apel, 1987; Bohlmann et al., 1988).

Daneben wurde die Expression sogenannter jasmonat-induzierter Proteine (jasmonate-induced proteins; JIP) sowie jasmonat-responsiver Gene (jasmonate-responsive genes; JRG) untersucht, welche durch JA erhöht wird (Kramell et al., 2000; Sembdner und Parthier, 1993; Lee et al., 1996). In dieser Arbeit wurde das JIP mit einer molekularen Masse von 23 kDa (JIP23) untersucht. Für die JRG wurde die Expression von JRG5 untersucht, welches für eine Kaffeesäure *O*-Methyltransferase codiert (Lee et al., 1997a und 1997b).

Als Referenzgene wurden Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und Tubulin verwendet. Die dazugehörigen Primer sind in Burton et al. (2004) zu finden. Die kommerziell angebotenen pCT[®]II-TOPO[®] Vektor spezifischen M13 Forward (-20) und M13 Reverse Primer wurden von der Firma Invitrogen bezogen (M13 Forward (-20) Primer: GTAAAACGACGGCCAG; M13 Reverse Primer: CAGGAAACAGCTATGAC, Schmelztemperatur 55°C).

2. Material und Methoden

Tab. 6: Genspezifische Primer mit ihrer Schmelztemperatur (T_m).

Die Zugangsnummer (Accession number; Acc. Nr.) entspricht der Nukleotidsequenz, welche für die Primer-Ableitung verwendet wurde. Nach dem DNA-Buchstaben Code steht M für A, C; R für A, G; Y für C, T. Die Sequenzanalyse wurde mit NCBI Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/) und DNAMAN 4.1 (Lynnon BioSoft, Canada) durchgeführt.

Gen, Klon	Originalsequenzlänge (Basenpaare, bp)	Fragment-Länge (bp)	Primersequenz (5' - 3' Orientierung) P1 = 5' - Primer; P2 = 3' - Primer T _m : Schmelztemperatur der Primer [°C]	Accession number
LOX-100	3055	455	P1: ATGGCCGGG TACATCCCTAA P2: CACACACACAAGGCAGCTCAA T _m : 58	U56406
HPL	1673	232	P1: CAGAGGTGCATCTTCCGGTT P2: ACGAAGCGGTATAGCAGGTCA T _m : 59	AJ318870
AOS2	1722	249	P1: TCTTTGACGTCACCAAGGTCG P2: TTGGACTTGCCGCTGAGAA T _m : 56	AJ251304
AOC	920	183	P1: ACAGCATGTACTTCGGCGACT P2: GGGATGCCCTTGAGGTAGAAA T _m : 59	AJ308488
DXR	1455	220	P1: TCTCCATCGTCGGTTCAACTG P2: TTCCGGCATCTCCTCACAAC T _m : 59	AJ583446
DXS2	Ermittelt aus hochkonservierten Nukleotidsequenzbereichen verschiedener Pflanzenarten	194	P1: GGMCAAYAGTTCYACMAGYAT P2: GAMACYTGCTTGTTGTCRRT T _m : 58	<i>Zea Mays</i> : EF507249 <i>Oryza sativa</i> : AK059821.1 <i>Picea abies</i> : ABS50520 <i>Ginkgo biloba</i> : AAR95699 <i>Mentha piperita</i> : AF019383 <i>Tagetes erecta</i> : AF251020 <i>Medicago truncatula</i> : AM746342.1 <i>Stevia rebaudiana</i> : AJ429232.2 <i>Narcissus pseudo-narcissus</i> : AJ279019 <i>Catharanthus roseus</i> : AJ011840

2. Material und Methoden

Gen, Klon	Originalsequenzlänge (Basenpaare, bp)	Fragment-Länge (bp)	Primersequenz (5' - 3' Orientierung) P1 = 5' - Primer; P2 = 3' - Primer Tm: Schmelztemperatur der Primer [°C]	Accession number
HMGR	Ermittelt aus hochkonservierten Nukleotidsequenzbereichen verschiedener Pflanzenarten	400	P1: GGGCARTGCTGYGAGATG P2: CATYCCCATRGCATCMCC Tm: 56	<i>Oryza sativa</i> Hmg1: L28995 <i>Oryza sativa</i> Hmg2: U43961 <i>Oryza sativa</i> Hmg3: AF110382 <i>A. thaliana</i> Hmg1: X15032 <i>A. thaliana</i> Hmg2: XM002884007 <i>Solanum lycopersicum</i> Hmg2: M63642
PR-1b	760	441	P1: CAGCCGCCATGGTTAACCTT P2: TCTGTCCAACGATGTTCCCG Tm: 58	X74940
LTP4	Ermittelt aus drei verschiedenen LTP4-Isoformen von Gerste	123	P1: AGCACCGCTGACAAGCAA P2: AATCCCCTCCATGTGCGT Tm: 58	cw21 (LTP4): AAA03284 LTP4.2: Z66529 LTP4.3: Z66528
TH	Aus Blatt spezifischen TH Sequenzen (DB4, BTH6, DG3) von Gerste ermittelt	128	P1: TCTCCCTGAATCCGGTGAAC P2: TTGCTGCAGAGTCCCATGTC Tm: 59	DB4: X05576 BTH6: L36882 DG3: X05589
JRG 5	1131	222	P1: TCACCAAAGACAGAGGGGAC P2: CCAGGATCACAGAGTGCTGA Tm: 59	U54767
JIP 23	994	204	P1: TGGTTGCCACTTTGAACTTTG P2: CAAGAGAACAACCAATCGCA Tm: 55	AK252938.1

2.13.2 Isolierung der Gesamt-RNA aus dem Pflanzenmaterial

Die RNA-Isolierung erfolgte mit dem RNeasy[®] Plant Mini Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Aufgrund geringer RNA-Konzentrationen unterhalb von 50 ng/μl wurde das Protokoll zum Teil verändert. Es wurden das eingesetzte Pflanzenmaterial von 100 mg auf 200 mg sowie die Menge des RLC-Lyse-Puffers von 450 μl auf 900 μl verdoppelt. Diese Lösung wurde in einer Schwingmühle MM 200 (Retsch[®]) nach Zugabe einer Stahlkugel für eine Minute bei 30 Schwingungen pro Sekunde erneut gemörsert. Nach Homogenisierung im QIAshredder erfolgte die Zugabe von Ethanol. Dabei wurde die Menge an Ethanol von 230 μl auf 450 μl erhöht. Ethanol optimiert dabei die Bindungsfähigkeit der RNA an der Silikamembran-Säule. Um für die RNA-Isolierung eventuell störende Inhaltsstoffe, wie Kieselsäure zu minimieren, wurde nach einer DNase-Behandlung eine 15-minütige Inkubation mit 0,8 M Natriumcitrat / 1,2 M Natriumchlorid-Lösung durchgeführt. Anschließend erfolgten - wie nach dem RNeasy[®] Plant Mini Kit beschrieben - mehrere Waschschritte, um die Säule von weiteren Kontaminationen zu befreien. Die RNA wurde mit 60 μl RNase-freiem Wasser eluiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit dem Spectrophotometer NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific).

2.13.3 cDNA-Herstellung (Reverse Transkription)

Die Herstellung der cDNA erfolgte nach dem iSkript[™] cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad), wobei 1 μg Gesamt-RNA eingesetzt wurde.

2.13.4 Reverse Transkription - Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) zur Amplifikation der cDNA Proben

Bei der Reversen Transkription - Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) wurde die hergestellte cDNA (Kapitel 2.13.3) als Template für die PCR verwendet.

Alle 50 μl Reaktionsansätze beinhalten dabei 10 μl cDNA (mit 1 μg RNA Ausgangsmaterial); 1 μM Primer (5' und 3'); 1 x konzentrierte Pufferlösung; 25 mM MgCl₂; 2 mM dNTPs; 1,25 Units *Taq*-Polymerase (Fermentas, St. Leon-Rot) und steriles Wasser. Die Amplifikation der cDNA-Proben erfolgte in einen Thermocycler (RoboCycler Gradient 96, Stratagene, La Jolla, USA), wobei folgendes Programm eingestellt wurde:

PCR-Programm:

Aktivierungsschritt:	5 Minuten	95°C	}	1 Zyklus
Denaturierung der Template DNA:	1 Minute	95°C		35 Zyklen
Primerhybridisierung:	1 Minute	Tm*		
Amplifikation:	1 Minute	72°C		
Finaler Amplifikationsschritt:	5 Minuten	72°C		1 Zyklus

* die Annealing-Temperaturen der jeweiligen Primer sind der Tabelle 6 zu entnehmen

2.13.5 Gelelektrophoretische Analyse der DNA

Es wurden Gelelektrophoresen mit 1%-iger Agarose durchgeführt (85 Volt, 1 h). Als Elektrophoresepuffer wurde 1x TAE-Puffer verwendet. Die cDNA-Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit 1/10 Volumen Ladepuffer versetzt. Für die Abschätzung der Größe der DNA-Banden wurde ein 100 bp Größenmarker (GeneRuler™ 100 bp Leiter, Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet. Die Färbung der Gele erfolgte für 15 Minuten in Ethidiumbromidlösung (1µg/ml), die Entfärbung für 20 Minuten in Wasser. Die DNA wurde mittels einer Dokumentationsanlage nachgewiesen (UVT-28MP ICU-1, Herolab, Wiesloch und Video Graphic Printer UP-890CE Sony, Köln).

Lösungen:

50x TAE-Puffer: 2 M Tris; 0,9 M Essigsäure; 0,05 M EDTA; pH=7,3

10x Ladepuffer: 30% Glycerin; 0,25% Bromphenolblau; 0,25% Xylencyanol

2.13.6 Elution der PCR-Produkte aus dem Agarosegel

Die Elution erfolgte mittels NucleoSpin® Extract II Kit (Macherey-Nagel) nach Angaben des Herstellers. Die DNA wurde mit Wasser eluiert. Anschließend erfolgte die Konzentrationsbestimmung mittels Gelelektrophorese (Kapitel 2.13.5).

2.13.7 TOPO-TA-Klonierung

Die TOPO-TA-Klonierung ist eine Methode, um die PCR-Produkte, die mit Hilfe der *Taq*-Polymerase erzeugt wurden (Kapitel 2.13.4) effizient zu klonieren. Dazu wurden die PCR-Produkte in den pCT®II-TOPO® TAVektor kloniert.

2.13.7.1 Klonierung

Das TOPO TA Cloning[®] Kit (Invitrogen) wurde nach Herstellerangaben verwendet. 6 µl Reaktionsansätze bestehend aus 30 ng des PCR-Produktes, 1 µl TOPO-II-Vektor, 1 µl Salzlösung (1,2 M Natriumchlorid; 0,06 M MgCl₂) sowie einer entsprechenden Menge Wasser wurden bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubiert.

2.13.7.2 Transformation

Die Transformation der generierten Plasmide erfolgte durch die Aufnahme in OneShot[®] kompetente *Escherichia coli* Zellen (Invitrogen). Dazu wurden 50 µl kompetente Zellen zu 2 µl Ligationsansatz gegeben und für 20 Minuten auf Eis gestellt. Durch einen anschließenden Hitzeschock bei 42°C für 30 Sekunden schließen sich die Zellen wieder. Nach kurzer Inkubation auf Eis wurde zu dem Ansatz 250 µl SOC-Medium gegeben und für eine Stunde bei 37°C und 220 rpm inkubiert. Von diesem Ansatz wurden 50 µl bzw. 100 µl auf je zwei Agarplatten mit Ampicillin (50 mg/L) ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

SOC-Medium: 2% (w/v) Trypton; 0,5% (w/v) Hefeextrakt; 10 mM NaCl;
 2,5 mM KCl; autoklaviert; 10 mM MgCl₂ (steril filtriert);
 20 mM MgSO₄ (steril filtriert); 20 mM Glukose (steril filtriert)

2.13.7.3 Plasmid-Mini-Präparation

Die Plasmid-DNA der Bakterien wurde mit dem QIAprep[®] Spin Miniprep Kit (Qiagen) isoliert. Dabei werden die Bakterien unter alkalischen Bedingungen lysiert und die DNA auf einer Silikagelmembran gebunden. Die DNA-Elution erfolgte mit 50 µl sterilem Wasser.

2.13.7.4 Kolonie-PCR

Zur Überprüfung einer erfolgreichen Klonierung und Transformation wurden Kolonie-PCRs durchgeführt. Dabei wurde bei der PCR (Kapitel 2.13.4) als Template Zellmaterial von der Plattenkolonie verwendet. Die PCR-Ansätze beinhalteten dabei 1 µM Primer [M13 Forward (-20) und M13 Reverse Primer = pCT[®]-II-TOPO[®] Vektor spezifische Primer]; 0,2 mM dNTPs; 2 mM MgCl₂; 1 x adäquaten Puffer; 1, 25 Units *Taq*-Polymerase (Fermentas, St. Leon-Roth). und steriles Wasser. Das PCR-Programm erfolgte wie nach 2.13.4.

2.13.7.5 Sequenzanalyse

Die Sequenzanalyse erfolgte durch MWG Biotech (Ebersberg). Überprüft wurde die Sequenz mittels der Software DNAMAN 4.1 und dem NCBI Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

2.13.8 quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Die Bestimmung der Expressionsstärke ausgewählter Gene (Kapitel 2.13.1) wurde mittels qRT-PCR ermittelt. Um die Effizienz der PCR-Reaktion zu überprüfen wurde bei jedem Ansatz eine serielle Verdünnungsreihe einer cDNA-Probe von 1:1 bis 1:10000 durchgeführt. Die ct-Werte (Wert, bei dem ein zur gebildeten DNA-Menge proportionales Fluoreszenzsignal überschritten wird) wurden gegen die eingesetzte DNA-Menge logarithmisch aufgetragen und anhand der Steigung die Effizienz abgelesen. Eine Verdopplung der DNA in jedem Zellzyklus liegt vor, wenn die Effizienz 100% beträgt.

Es ist zu beachten, dass eine unterschiedliche Menge an cDNA in den einzelnen Proben einen Einfluss auf die ermittelten ct-Werte hat. Daher wird die Expression des Zielgens mit der Expression eines Referenzgens normalisiert. Referenzgene sind sogenannte Housekeeping Gene, welche in jeder Zelle in gleichbleibenden Mengen exprimiert und nicht aktiv reguliert werden. Die Quantifizierung der Menge an Template ist demnach eine relative Bestimmung. Es wurden bei allen Reaktionen die Referenzgene GAPDH und Tubulin verwendet.

Die Berechnung des x-fachen Expressionsunterschiedes mit Normierung auf die Referenzgene erfolgte nach folgender Gleichung 3:

$$\text{x-facher Anstieg der Expression} = \frac{\text{Eff}^{(ct_{\text{Kontrolle}} - ct_{\text{Probe}})} \text{Pr}}{\text{Eff}^{(ct_{\text{Kontrolle}} - ct_{\text{Probe}})} \text{Re}} \quad (\text{Gleichung 3})$$

Mit:

Eff	Effizienz
ct _{Kontrolle}	ct-Werte der Kontrollpflanzen (unbehandelt)
ct _{Probe}	ct-Werte der behandelten Pflanzen
Pr	Probengen
Re	Referenzgen

Bei allen Versuchen wurde der iQTM SYBER[®] Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, USA) verwendet. Als Reaktionsgefäße wurden PCR-96-Loch-Multititerplatten (Thermo-Fast[®] 96, Non-Skirted, Abgene, Hamburg) benutzt, die vor Replikationsbeginn mit einer Schutzfolie

(Absolute QPCR Seal, Abgene, Hamburg) zur Verhinderung der Verdunstung der Proben abgedeckt wurden.

Die Durchführung der qRT-PCR-Reaktionen erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Es wurde jedoch das Gesamtvolumen von 50 µl auf 20 µl reduziert und entsprechend alle Komponenten des Reaktionsansatzes angepasst. Die Primer-Konzentration betrug 300 mM im Reaktionsansatz. Als DNA-Matrize wurde für jede PCR-Reaktion 8 µl cDNA eingesetzt, die aus 1 µg RNA hergestellt wurde (Kapitel 2.13.2). Pro Probe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

Das Programm des qRT-PCR-Gerätes (iCycler MyIQ, Bio-Rad, Hercules, Hamburg) wurde folgendermaßen eingestellt:

PCR-Programm:

Denaturierung:	5 Minuten	95°C	}	1 Zyklus	
Denaturierung:	0,5 Minuten	95°C		}	40 Zyklen
Hybridisierung ¹ :	0,5 Minuten	Tm*			
Amplifikation ¹ :	0,5 Minuten	72°C			
Finale Amplifikation ¹ :	5 Minuten	72°C		1 Zyklus	

¹ nach der Hybridisierung und der Amplifikation wurde jeweils die Fluoreszenz gemessen

* die Annealing-Temperaturen der jeweiligen Primer sind der Tabelle 6 zu entnehmen

Die erhaltenen Daten wurden mit dem Programm IQTM Optical System Software aufgezeichnet und ausgewertet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels REST2009 V2.0.13 Software. Hierbei werden die Unterschiede der Expression des Zielgens zu den Expressionen der beiden Referenzgene normiert, wobei neben technischen auch biologische Wiederholungen möglich sind. Die Software gibt dabei an, ob ein signifikanter Unterschied der Expressionsstärke des Zielgens unter behandelten Bedingungen zu der unter unbehandelten Bedingungen besteht. Die Software betrachtet bei der Auswertung der Expressionsstärke durch die Behandlung neben den Kontrollen auch die beiden Referenzgene. Eine Angabe des Standardfehlers, also die Angabe der Schwankungen der Expressionsstärke innerhalb einer Sorte ist daher nicht sinnvoll.

2.14 Pathogenbefall mit *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*

Neben den abiotischen Stressoren MeJA und Ozon wurden zusätzlich Versuche mit einem biotischen Stressor durchgeführt. Hierzu wurde das Gram-negative Bakterium *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* verwendet. Die in dieser Arbeit verwendete Stammkultur von *P. syringae* pv. *syringae* war avirulent und die Interaktionen sind inkompatibel. Die Stammkulturen stammen von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig.

Für die Kultivierung wuchsen die Bakterien zunächst über Nacht bei 28°C, 220 rpm im DSMZ Medium 54 (20g Glukose, 10g Hefeextrakt in 1 L Milli-Q-Wasser) in sterilen Schikanekolben. Anschließend erfolgte die Konzentrationsbestimmung der Bakterien mittels Photometer bei $\lambda=600$ nm [OD_{600} von entspricht 1×10^8 cfu (colony-forming units) ml^{-1}] Nach Erreichen dieser Konzentration erfolgten zwei Waschschrte mit 100 mM $MgCl_2$ zur Entfernung des Mediums. Die Bakteriensuspension wurde anschließend mit 100 mM $MgCl_2$ auf eine Konzentration von ca. 1×10^6 cfu ml^{-1} verdünnt. Mit dieser Konzentration wurden die Blattoberflächen von fünf Blättern der Sorten Barke und BCC 173 mit einer 20 ml Spritze (B | BRAUN, Omnifix®) ohne Nadel infiltriert. Als Kontrolle diente die Infiltration mit 100 mM $MgCl_2$. Die Emissionen wurden über fünf Tage gemessen. Anschließend wurden die Pflanzen für die Bestimmung der endogenen Inhaltsstoffe bei -80°C eingefroren. Dieser Pathogenversuch wurde für die Sorten Barke und BCC 173 je einmal durchgeführt.

In einem Einzelversuch wurden die Signaleffekte des Pflanzenhormons JA auf bereits Pathogen infizierte Gerstenpflanzen untersucht. Dazu wurden Gerstenpflanzen der Sorte Barke fünf Tage nach einer Primärfektion der Blätter mit *P. syringae* pv. *syringae* zusätzlich mit MeJA exponiert und die resultierenden Emissionen über einen Tag gemessen. Die Applikation erfolgte durch Aushängen eines Filterpapiers mit 20 μ l MeJA in der Pflanzenkammer.

3. Ergebnisse

3.1 Muster der BVOC-Emissionen nach MeJA- und Ozonexposition

BVOC-Emissionen sind eine einfache und nicht-invasiv zu bestimmende Größe des Sekundärstoffwechsels und lassen Rückschlüsse auf Veränderungen der pflanzlichen Abwehrmechanismen zu. Exposition mit MeJA soll dabei bis zu einem bestimmten Grad dieselben Emissionen induzieren wie nach Herbivorie (z.B. Koch et al., 1999; van Poecke und Dicke, 2004), Ozonexposition entsprechend wie bei Pathogenbefall (Sandermann et al., 1998). In der Abbildung 9a und 9b sind beispielhaft die Chromatogramme der BVOC-Emissionen der Sorte BCC 173 während MeJA- bzw. nach Ozonexposition im Vergleich zu den BVOC-Emissionen einer Kontrollpflanze von der Sorte BCC 173 dargestellt. Anhand dieser beispielhaften Chromatogramme wird deutlich, dass nach Ozonexposition im Gegensatz zu der MeJA-Exposition Emissionen der C₆-Blattalkohole und -Aldehyde (GLV) nachgewiesen wurden. Nach Ozonexposition emittierten alle Pflanzen die GLV-Verbindungen (Z)-3-Hexenol und (Z)-3-Hexenylacetat.

Sowohl nach MeJA- als auch nach Ozonexposition waren Monoterpen- und Sesquiterpenemissionen nachweisbar. Dies gilt für alle untersuchten Gerstensorten. Es wurden überwiegend folgende Monoterpene Myrcen, Limonen, β -Phellandren, β -Ocimen, Linalool und folgende Sesquiterpene β -Elemen, β -Caryophyllen, α -Humulen, α -Copaen emittiert (Abb. 9a und 9b; Abb. 11a und 11b).

Nach MeJA-Exposition wurde zusätzlich für alle Gerstensorten die Emission des Homoterpens TMTT [(E,E)-4,8,12-Trimethyl-1,3,7,11-tridecatetraen] nachgewiesen (Abb. 9). Bis auf diese Ausnahme emittierten alle Gerstenpflanzen immer die gleichen Terpenoide.

Bei manchen Sorten (BCC 173, BCC 869 und Varde) wurden auch für die Kontrollpflanzen einige Terpenoidemissionen (Linalool, β -Caryophyllen, α -Humulen) nachgewiesen (vgl. Kapitel 3.5). Wie anhand der Chromatogramme (Abb. 9a und 9b) zu erkennen wurden die Emissionen durch beide Expositionsformen erhöht.

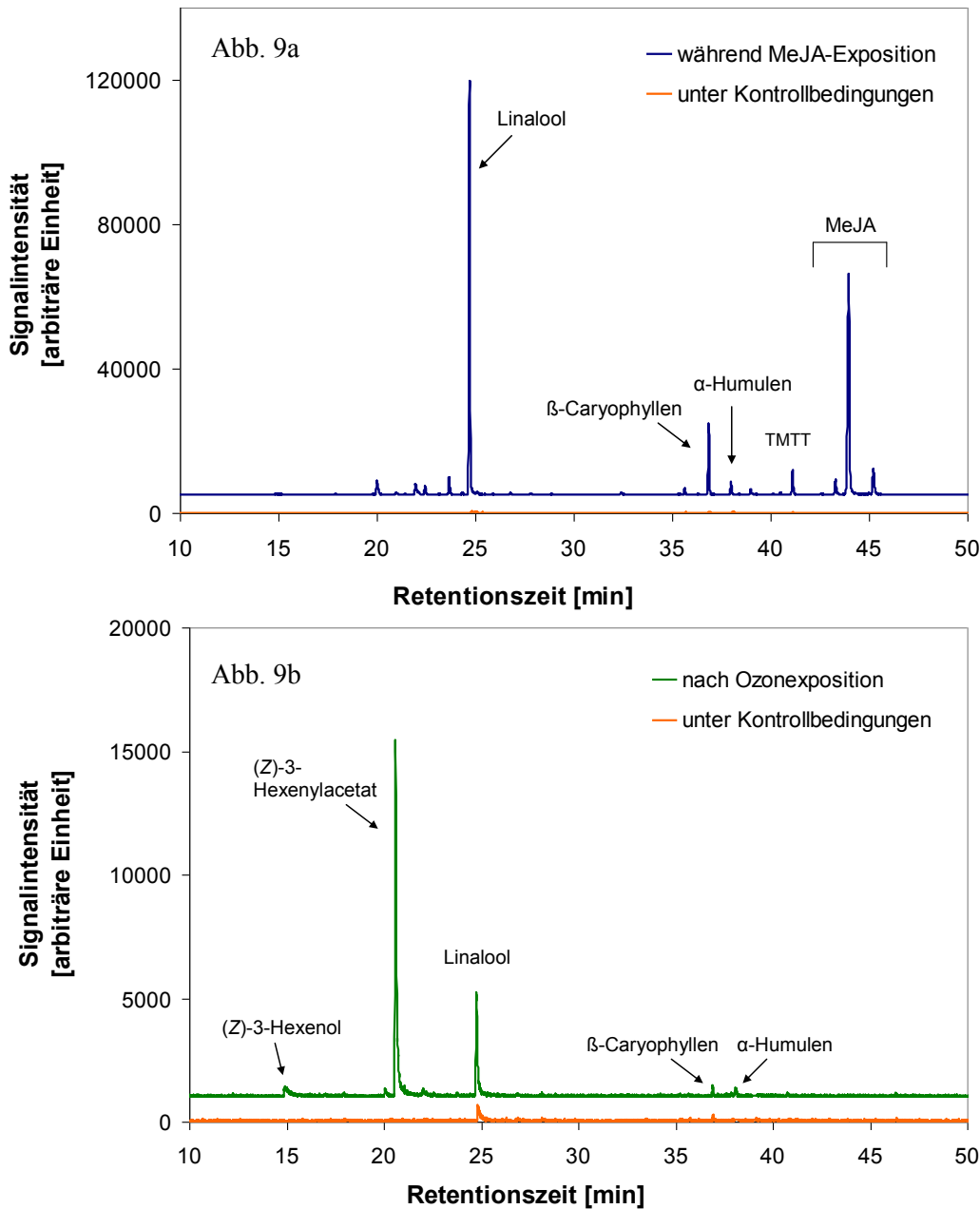


Abb. 9: Ionen-Chromatogramme von BVOCs, entnommen aus der Luft der Kammer mit Gerstenpflanzen der Sorte BCC 173 nach Exposition und unter unbehandelten Bedingungen

9a Chromatogramme der BVOC entnommen 45 Stunden nach Beginn der MeJA-Exposition (blaue Linie, Basislinie für die Übersicht an der Ordinate um 5000 parallel verschoben) und unter Kontrollbedingungen entnommen 45 Stunden nach Einbau in die Pflanzenkammer (orange Linie, Basislinie an der Ordinate um 10 parallel verschoben).

9b Chromatogramme der BVOC entnommen 3 Stunden nach der einstündigen Ozonexposition (grüne Linie, Basislinie an der Ordinate um 1000 parallel verschoben) und unter Kontrollbedingungen entnommen 3 Stunden nach Einbau in die Pflanzenkammer (orange Linie).

BVOC-Emissionen wurden auf den Ionenspuren m/z 93 (für Terpenoide) und m/z 67 (für GLVs) ausgewertet und anschließend die Summe der erhaltenen Signalintensitäten gebildet (m/z = Masse zu Ladungsverhältnis). Es wurden beispielhaft einzelne BVOC eingezeichnet. Bereiche in denen BVOC nachweisbar waren: GLVs: 11 bis 25 min., Monoterpene: 17 bis 30 min. und Sesquiterpene: 30-45 min.

Auch quantitativ rufen beide Expositionsformen bei den jeweiligen Gerstensorten immer ein sehr ähnliches Terpenoidemissionsmuster hervor (Abb. 10). Hauptemissionen sind bei beiden Expositionsformen die des Monoterpens Linalool und des Sesquiterpens β -Caryophyllen (Abb. 11a und 11b). Die anderen Terpenoidemissionen machen in Vergleich zu diesen Hauptemissionen einen geringen Anteil aus (Abb. 11a und 11b). Die kleinen Signale dieser Substanzen (siehe Chromatogramme Abb. 9) sind nahe der Nachweisgrenze und daher schwierig auszuwerten.

Es sind nur kleine Variationen des Emissionsmusters durch die beiden Expositionsformen zu erkennen. Bei Varde und BCC173 ist der Anteil der Monoterpenemissionen durch die Ozonexposition erhöht (Abb. 10). Vergleicht man die Sorten untereinander, emittierte die Sorte BCC 1479 bei beiden Expositionsformen und Varde bei MeJA-Exposition anteilig mehr Sesquiterpene (Abb. 10). Dabei ist der Anteil der Emission des Sesquiterpens β -Caryophyllen besonders erhöht (Abb. 11a). Dies ist bei beiden Expositionsformen der Fall.

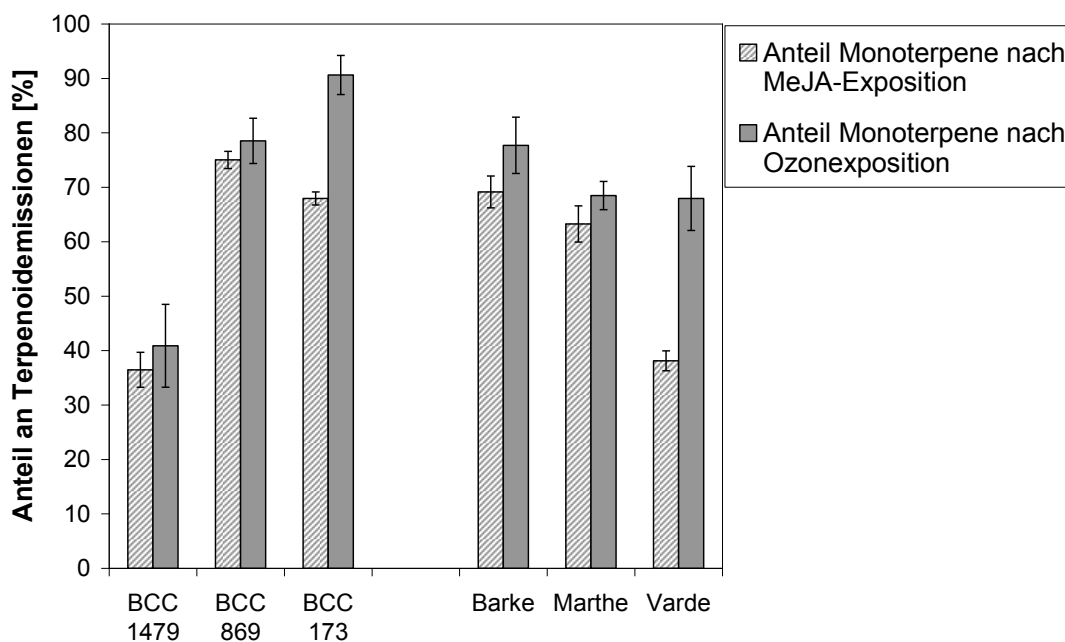


Abb. 10: Vergleich der Muster der Monoterpene an den gesamten Terpenoidemissionen nach Ozon- und MeJA-Exposition der verschiedenen Gerstensorten

Zur Berechnung der Anteile der Monoterpene an der Summe aller Terpenoidemissionen wurde zunächst für jedes Replikat die Summe der Monoterpenemissionen auf die Summe der Mono- und Sesquiterpenemissionen bezogen. Anschließend wurde der Mittelwert aus allen sechs Replikaten gebildet, welcher für jede Sorte aufgelistet ist (je Sorte $n=6 \pm SE$). Die Normierung der gesamten Terpenoidemissionen aus Mono- und Sesquiterpenen erfolgte auf 100%. TMTT-Emissionen waren nach Ozonexposition nicht nachweisbar und wurden in dieser Abbildung nicht mit einbezogen. Anhand des Monoterpenanteils kann direkt auf den Sesquiterpenanteil geschlossen werden.

3. Ergebnisse

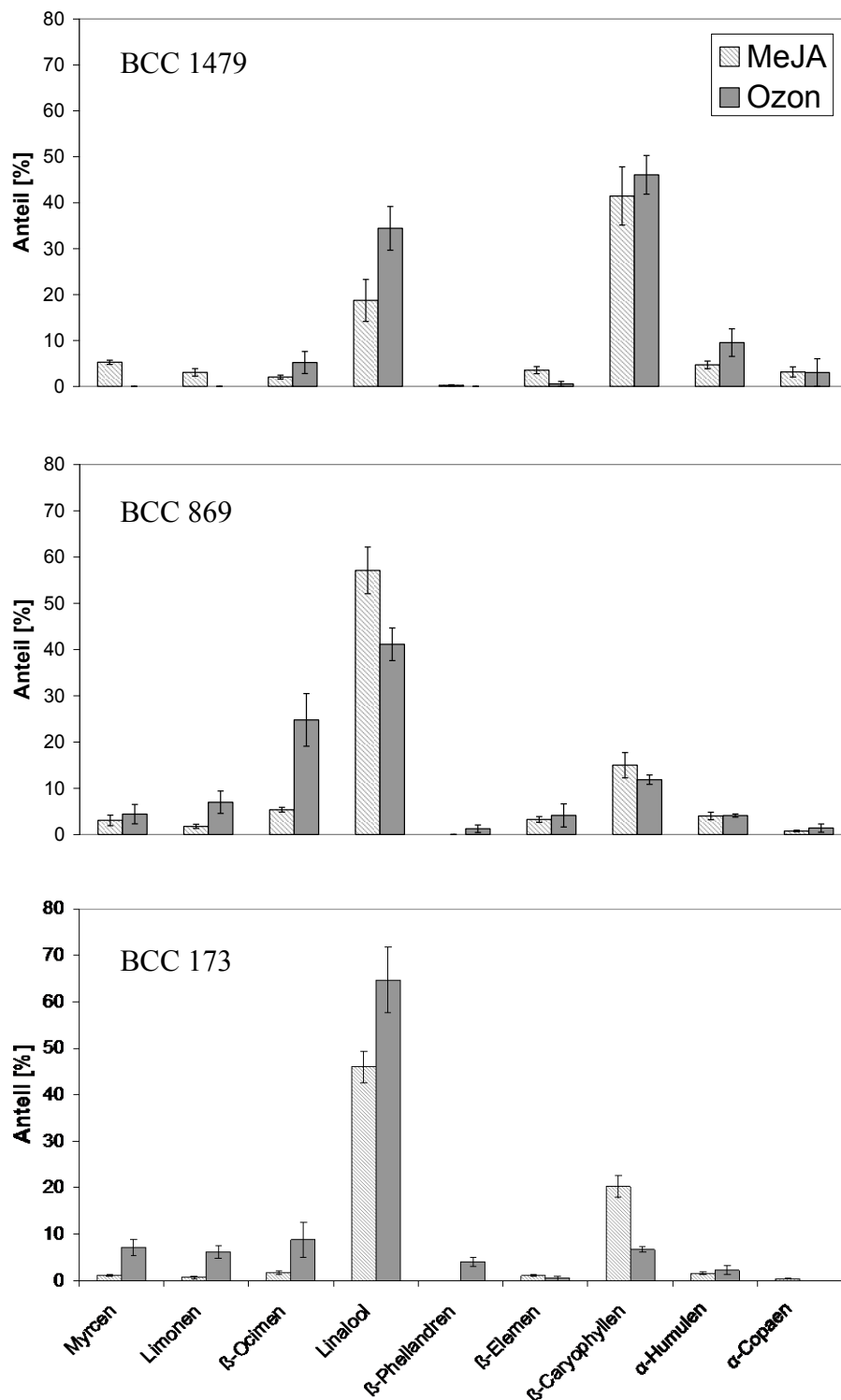


Abb. 11a: Muster einzelner Terpenoidemissionen nach MeJA- bzw. Ozon-Exposition der alten Gerstensorten

Anteile der jeweiligen Emissionen an der Summe aller Terpenoidemissionen. Zur Bildung der Summe wurden nur die BVOC herangezogen, deren Emissionsraten über der Nachweisgrenze lagen (je Sorte $n=6 \pm SE$).

3. Ergebnisse

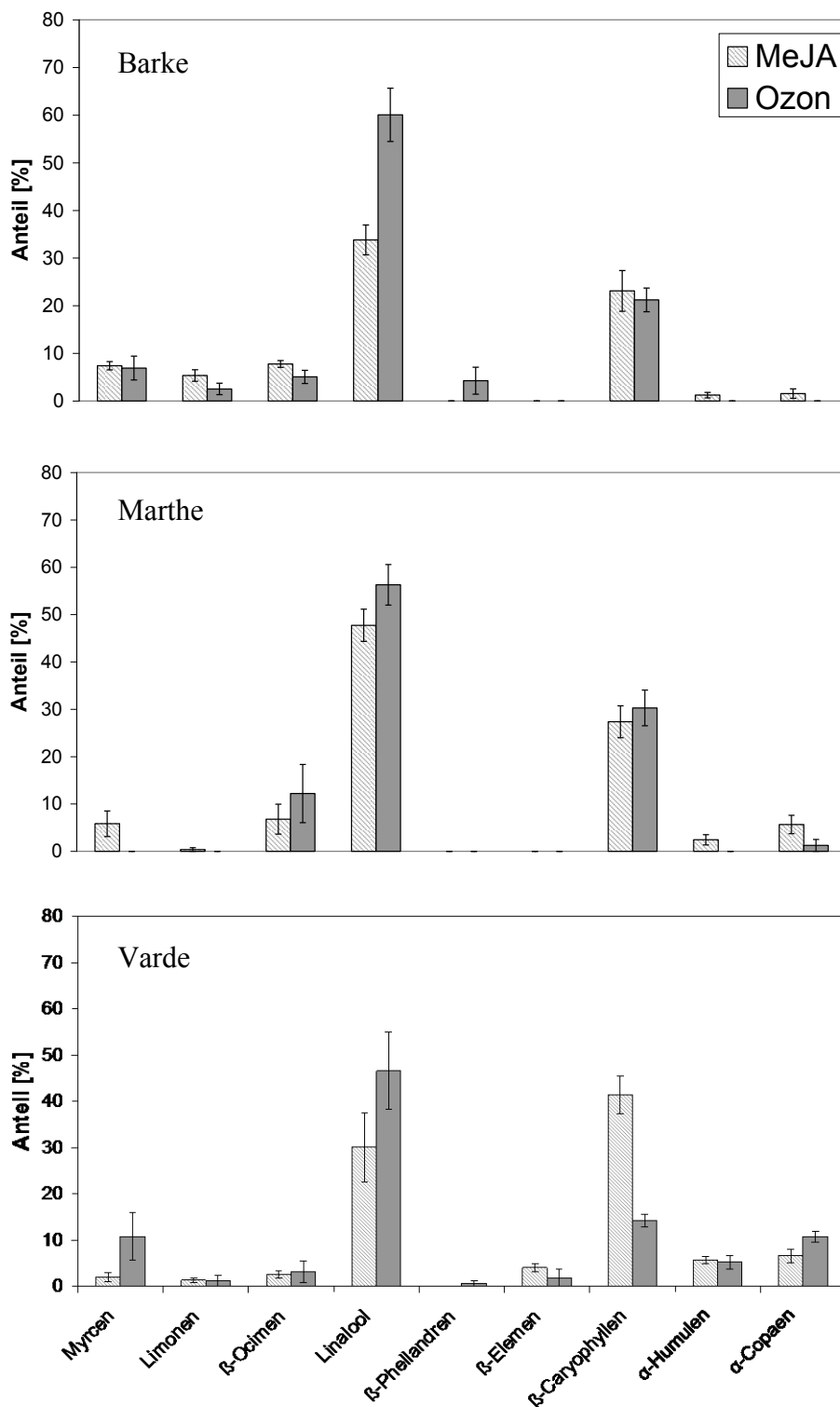


Abb. 11b: Muster einzelner Terpenoidemissionen nach MeJA- bzw. Ozon-Exposition der modernen Gerstensorten

Anteile der jeweiligen Emissionen an der Summe aller Terpenoidemissionen. Zur Bildung der Summe wurden nur die BVOC herangezogen, deren Emissionsraten über der Nachweisgrenze lagen (je Sorte $n=6 \pm SE$).

3.2 zeitlicher Verlauf der BVOC-Emissionen nach MeJA- bzw. Ozonexposition von Gerste

Wie im vorangegangenen Kapitel 3.1 beschrieben, zeigten alle untersuchten Gerstensorten ein ähnliches Emissionsmuster der Terpenoide sowohl nach MeJA- als auch nach Ozonexposition. Im Hinblick auf den zeitlichen Verlauf der BVOC-Emissionen unterschieden sich diese deutlich in Abhängigkeit von der Exposition mit MeJA oder Ozon. Zwischen den verschiedenen Arten waren die zeitlichen Verläufe jedoch vergleichbar (Abb. 12 und 13). Im Folgenden wird am Beispiel der modernen Sorte Barke der grundsätzliche zeitliche Verlauf der BVOC-Emissionen in Reaktion auf MeJA- und Ozonexposition gezeigt (Abb. 12 und 13). Während der **MeJA-Exposition** werden innerhalb eines Tages nach Beginn der Behandlung terpenoide BVOC emittiert, wobei die Emissionsstärken zunächst kontinuierlich ansteigen und nach etwa 36 Stunden näherungsweise in einen steady state Zustand gelangen (Abb. 12). Dies war für alle untersuchten Gerstensorten der Fall. Emissionen aromatischer BVOC oder von Blattalkoholen und –aldehyden (GLVs) wurden nicht beobachtet.

Aufgrund dieses prinzipiellen Verlaufs der Terpenoidemissionen nach MeJA-Exposition für alle Gerstensorten wurden die verschiedenen Sorten bei den weiteren Wiederholungen der Emissionsmessungen immer für 48 Stunden mit MeJA exponiert und die Messung der Emissionen begann nach 36 Stunden für die letzten 12 Stunden der Exposition (vgl. Abb. 7a).

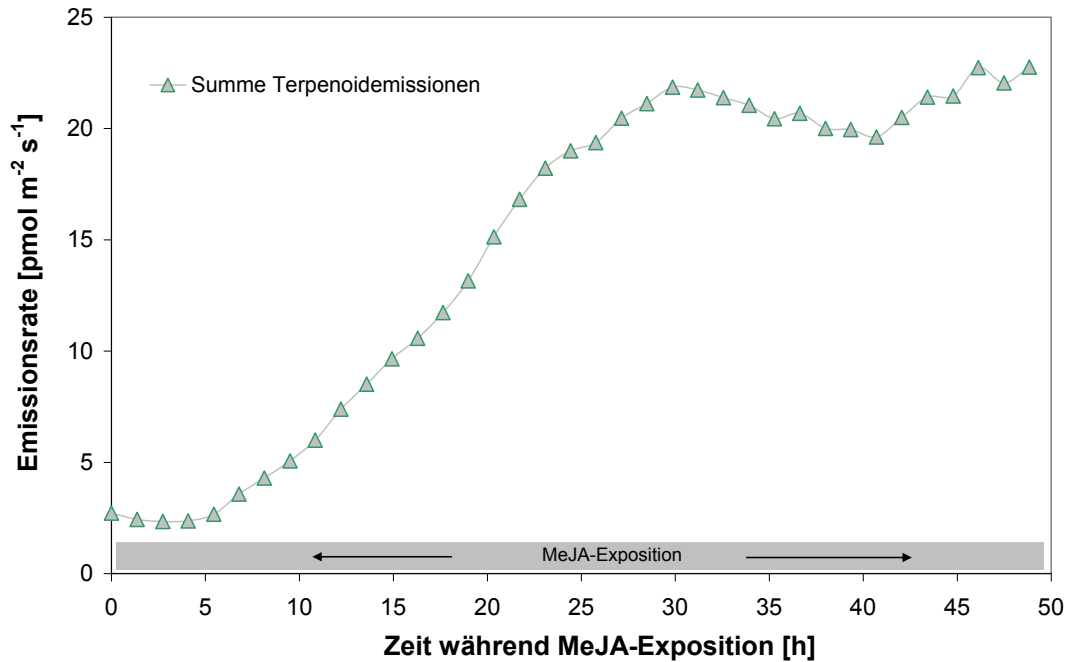


Abb. 12: Zeitverlauf der Emissionsraten der Terpene während MeJA-Exposition am Beispiel der modernen Sorte Barke (n=1)

20 μl MeJA wurde auf ein Filterpapier gegeben und in die Pflanzenkammer gehängt. Die MeJA-Exposition erfolgte über 48 Stunden. Jeder Messwert stellt die Summe aller Terpenoidemissionsraten zu dem jeweiligen Messzeitpunkt dar. Es wurden ausschließlich Terpenoidemissionen gefunden.

Nach einer gepulsten **Ozonexposition** (1 h, ~ 550 ppb) zeigten sich pulsartige Stressreaktionen der Pflanzen. Zunächst traten GLV-Emissionen auf. Dabei wurden (Z)-3-Hexenylacetat und (Z)-3-Hexenol emittiert (Abb. 13). Die Emissionsraten erreichten nach etwa 3 Stunden ein Maximum und sanken dann über einen Zeitraum von etwa 8 Stunden wieder ab. Kurz nach der Ozonexposition wurden auch die nach MeJA-Expositionen typischen Terpenoidemissionen gefunden, wobei das Maximum dieser Emissionen etwa 5 bis 10 Stunden nach Beendigung der Ozonexposition erreicht war. Es wurde kein steady state Zustand erreicht, wie für MeJA-Expositionen (Abb. 13). Die Emissionen der GLV sanken nach ca. 12 Stunden nahe an die Nachweisgrenze und machten nur noch ca. 1% der maximalen GLV-Emissionen aus (Abb. 13). Die Emissionsraten aller Terpene sanken auch, jedoch nicht so stark wie die der GLV-Emissionen. Hier betrugen die Emissionen nach ca. 18 Stunden durchschnittlich noch 20% von den maximalen Emissionen der Terpene. Für keine Pflanzen waren Indol- und MeSA-Emissionen nachweisbar. Aufgrund der pulsartigen Stressreaktion wurden die Emissionen für ca. einen Tag aufgezeichnet.

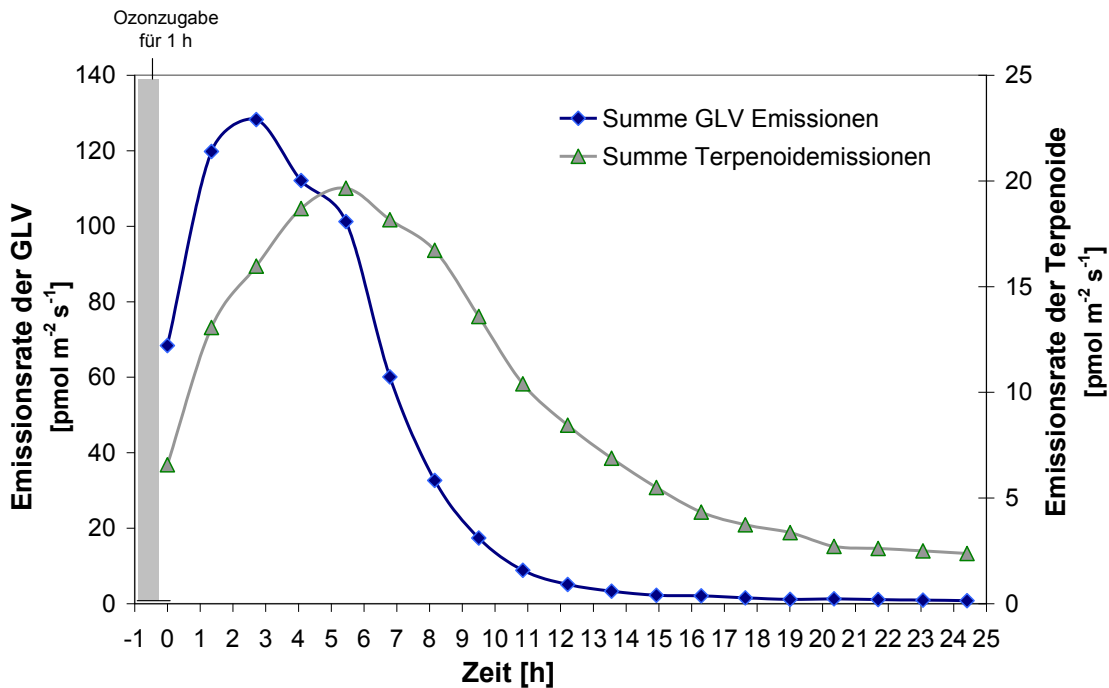


Abb. 13: Zeitverlauf der Emissionsraten der GLV und Terpeneide nach einstündiger Ozonapplikation am Beispiel der modernen Gerstensorte Barke (n=1)

Ozonzugabe erfolgte für 60 min (~ 550 ppb; Zeitpunkt -1 bis 0 h). Ab dem Zeitpunkt 0 h wurden die Emissionen gemessen. Aufgelistet sind die Emissionsraten der GLV (primäre y-Achse) und die der Terpeneide (sekundäre y-Achse). Dabei stellt jeder Messpunkt die Summe der GLV- bzw. Terpenoid-Emissionsraten zum jeweiligen Zeitpunkt dar. Die GLV-Emissionen besitzen ihr Maximum bei etwa 3 Stunden, das der Terpenoidemissionen liegt bei etwa 6 Stunden. Es wird kein steady state Zustand erreicht. Den Hauptanteil der Emissionsmenge machen GLV Emissionen aus (siehe Kapitel 3.8.1.1).

Aufgrund der puls förmigen Reaktion der Emissionsraten nach Ozonexposition von Gerste mussten integrale Emissionen zur Quantifizierung der pflanzlichen Stressantwort genutzt werden, was Messzeiten von je etwa einem Tag nach Ozonexpositionen bedingt. Hier wurden daher nicht die Emissionsraten als Maß für die Stressantwort genommen, sondern die insgesamt über den Emissionspuls abgegebene Menge an BVOC. Diese wurde durch Aufsummierung der Emissionsraten multipliziert mit der Zeitdauer der jeweiligen GC-MS Messung (72 min) bestimmt (Einheiten pmol m^{-2} Blattfläche). Als Referenz wurde die über den Zeitraum der Ozonexposition (60 min.) aufgenommene Ozonmenge genutzt, die gleichermaßen in Einheiten von pmol m^{-2} bestimmt wird. Beauchamp et al. (2005) zeigten, dass die Emissionen nicht von der Ozonkonzentration an sich, sondern von der Menge an aufgenommenem Ozon abhängen. Nach Normierung der Emissionsmenge auf diese Referenz erhält man eine dimensionslose Größe ($\text{pmol m}^{-2} / \text{pmol m}^{-2}$), die hier als Maß für die Stressantwort der Pflanzen genutzt wird. Die Tabelle 7 zeigt die verschiedenen Bezeichnungen der einzelnen Emissionsgrößen.

Tab. 7: Definitionen für verschiedene Emissionsgrößen nach MeJA- bzw. Ozonexposition

Emissionsgrößen nach MeJA-Exposition	Definition	resultierende Einheit
Emissionsrate	BVOC-Emissionsrate (Flussdichte) [pmol m ⁻² s ⁻¹]	[pmol m ⁻² s ⁻¹]
Terpenoidemissionsrate	Summe aller Terpenoidemissionsraten [pmol m ⁻² s ⁻¹]	[pmol m ⁻² s ⁻¹]
Monoterpenemissionsrate	Summe aller Monoterpenemissionsraten [pmol m ⁻² s ⁻¹]	[pmol m ⁻² s ⁻¹]
Sesquiterpenemissionsrate	Summe aller Sesquiterpenemissionsraten [pmol m ⁻² s ⁻¹]	[pmol m ⁻² s ⁻¹]
Emissionsgrößen nach Ozonexposition	Definition	resultierende Einheit
Gesamtemissionen	Summe aller GLV- und Terpenoidemissionsraten [pmol m ⁻² s ⁻¹] bezogen auf die Ozonaufnahmerate [pmol m ⁻² s ⁻¹]	dimensionslos
GLV-Emissionen	Summe aller GLV-Emissionsraten [pmol m ⁻² s ⁻¹] bezogen auf die Ozonaufnahmerate [pmol m ⁻² s ⁻¹]	dimensionslos
Terpenoidemissionen	Summe aller Terpenoidemissionsraten [pmol m ⁻² s ⁻¹] bezogen auf die Ozonaufnahmerate [pmol m ⁻² s ⁻¹]	dimensionslos
Monoterpenemissionen	Summe aller Monoterpenemissionsraten [pmol m ⁻² s ⁻¹] bezogen auf die Ozonaufnahmerate [pmol m ⁻² s ⁻¹]	dimensionslos
Sesquiterpenemissionen	Summe aller Sesquiterpenemissionsraten [pmol m ⁻² s ⁻¹] bezogen auf die Ozonaufnahmerate [pmol m ⁻² s ⁻¹]	dimensionslos

3.3 Aufbau einer Screening-Anlage

Um möglichst viele Gerstensorten mit einer ausreichend hohen Anzahl an Wiederholungen untersuchen zu können, wurde eine Screening-Anlage aufgebaut (Abb. 5). Mit dieser Anlage war es möglich, den Durchsatz der Pflanzen für die MeJA-Expositionen zu vervierfachen. Dazu wurden 4 parallel betriebene Pflanzenkammern aufgebaut. Es erfolgte eine einmalige Applikation von je 20 µl MeJA, wobei die Pflanzen kontinuierlich über zwei Tage exponiert wurden. Die Pflanzen wurden zeitversetzt etwa alle 12 Stunden eingebaut, da die einzelnen Messungen der Emissionen für jede etwa 12 Stunden pro Pflanzensatz betragen (Abb. 7a und 12).

Die Experimente zur Ozonexposition zeigten, dass zur Bestimmung der induzierten BVOC-Emissionen die Messung über einen Zeitraum von mindestens 24 Stunden erforderlich ist (Abb. 7b und 13). Entsprechend wurden die Pflanzen zunächst einen Tag an die Bedingungen

der Pflanzenkammer akklimatisiert und die Emissionen für jede Pflanze direkt nach der einstündigen Ozonexposition für ca. einen Tag gemessen. Für die Ozonexpositionsexperimente war es ausreichend eine Pflanzenkammer aufzubauen (Abb. 6). Die Pflanzen wurden mit einer hohen Ozonkonzentration von durchschnittlich 550 ppb exponiert. Durch diese höhere Ozonkonzentration traten die pflanzlichen Reaktionen schneller auf als bei niedrigen Konzentrationen (vgl. Beauchamp et al., 2005; Kapitel 2.9).

3.4 Screening-Experimente der 31 Gerstensorten nach MeJA-Exposition

Screening-Experimente waren aufgrund des zeitlichen Verlaufs der Emissionen ausschließlich nach MeJA-Exposition möglich (Kapitel 3.2 und 3.3). Es wurden die Emissionen von 31 verschiedenen Gerstensorten nach MeJA-Exposition mit je 1 Replik pro Sorte analysiert. Alle Gerstensorten emittierten die gleichen BVOC. Tabelle 8 zeigt typische Emissionen der 31 Sorten sowie die entsprechenden Photosynthese- und Transpirationsraten.

Tab. 8: Übersicht typischer Emissionen nach MeJA-Exposition der 31 verschiedenen Gerstensorten (1 Replik)

Hellgrau unterlegt sind zweizeilige Sorten. Grün dargestellt sind traditionelle Landrassen (sehr geringer Ertrag), blau verbesserte Sorten (geringer Ertrag), orange unbekannter biologischer Status und lila moderne Sorten (mittlerer Ertrag). Fett dargestellt sind die Sorten, die für eine nähere Betrachtung der Emissionen ausgewählt wurden. u. N. unterhalb der Nachweisgrenze.

Alle Emissionsraten in [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$]. NP, Netto-Photosyntheserate [$\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$]; Tr = Transpirationsrate [$\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$]

Gerstensorte	Myrcen	Linalool	β -Caryophyllen	α -Humulen	Σ Emissionen	NP	Tr
HOR 1804	5,53	50,20	70,10	1,71	128	7,8	2,04
BCC 149	0,28	0,74	3,81	0,30	5	10,47	2,85
BCC 167	0,42	0,74	1,68	0,35	3	9,29	2,87
BCC 173	2,46	11,00	3,72	0,24	17	9,8	2,93
BCC 1479	6,30	55,00	76,00	5,20	143	6,8	1,8
BCC 219	0,60	4,40	5,00	0,52	11	8,97	1,3
BCC 768	0,41	1,51	5,67	0,32	8	9,2	2,87
BCC 1497	3,70	31,00	45,00	4,30	84	5,38	1,09
HOR 930	0,23	0,77	0,13	0,05	1	7,98	2,33
HOR 8113	2,40	7,96	24,80	7,20	42	11,83	1,49
BCC 421	2,17	5,52	34,40	4,49	47	10,68	1,27
BCC 447	0,22	0,68	0,98	0,12	2	7,15	2,47
BCC 579	0,45	0,50	0,47	0,10	2	7,94	2,9
BCC 719	0,50	1,57	4,62	0,38	7	9,23	2,99
BCC 817	2,30	2,25	11,20	1,79	18	9,3	2,57
BCC 1476	u. N.	5,20	40,00	4,40	50	11,84	1,53
BCC 1471	3,84	12,60	18,20	1,90	37	11,22	2,39

3. Ergebnisse

Gerstensorte	Myrcen	Linalool	β -Caryophyllen	α -Humulen	Σ Emissionen	NP	Tr
BCC 1431	1,52	1,52	1,69	0,76	5	11,29	1,78
BCC 899	7,24	31,30	3,23	1,61	43	10,66	3,19
BCC 1444	2,10	13,00	16,00	3,40	35	7,65	1,25
BCC 1417	4,64	12,20	4,79	2,93	25	8,29	2,95
BCC 1405	0,99	5,28	0,47	0,10	7	5,8	1,13
BCC 1468	10,30	47,80	8,50	1,83	68	8,93	2,5
BCC 869	3,00	11,60	17,00	4,30	36	9,19	2,26
BCC 1458	1,55	7,73	4,03	1,48	15	11,93	2,96
BCC 1390	4,84	16,70	2,51	0,99	25	8,81	1,95
HOR 11373	0,40	1,21	0,67	0,17	2	7,51	2,29
Morex	1,82	5,66	8,90	1,92	18	10,01	2,73
Barke	2,28	10,60	7,50	0,44	21	7,2	1,8
OWB rec	0,91	2,72	7,56	1,81	13	7,82	1,98
OWB dom	1,31	3,81	35,40	4,18	45	7,75	1,99

Die Ergebnisse der Screening-Experimente sollten Hinweise auf die für weiterführende Experimente am besten geeigneten Gerstensorten liefern. Es wurden von einigen Sorten die Emissionsraten mit zwei Replikaten bestimmt. Bei diesen Sorten zeigte sich jedoch, dass die Emissionsraten einer Sorte stark variieren können (Tab. 9).

Tab. 9: Vergleich der Emissionsraten [$\text{pmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$] von Pflanzen mit je zwei Replikaten beispielhaft ausgewählter Sorten nach MeJA-Exposition

Zweizeilige Sorten grau unterlegt.

		Myrcen	Linalool	β -Caryophyllen	α -Humulen	Σ Emissionen
HOR 1804	1. Replikat	5,53	50,20	70,10	1,71	128
	2. Replikat	1,11	1,75	16,20	0,99	20
HOR 930	1. Replikat	5,50	6,7	5,6	2,3	20
	2. Replikat	0,23	0,77	0,13	0,05	1
BCC 149	1. Replikat	3,73	11,5	23,1	3,87	42
	2. Replikat	0,28	0,74	3,81	0,3	5
BCC 1431	1. Replikat	1,52	1,52	1,69	0,76	5
	2. Replikat	1,13	3,0	2,2	6,39	13

Eine einmalige Messung der Emission einer einzelnen Sorte erwies sich durch die Variabilität der Emissionsraten einer Sorte als nicht ausreichend zur Selektion von stark und schwach emittierenden Sorten. Eine notwendige Anzahl von Replikaten zur Emissionsbestimmung für alle 31 Sorten war somit nicht sinnvoll und praktikabel. Daher wurde für weiterführende Untersuchungen die detaillierte Analyse der Emissionen von Sorten durchgeführt, die weniger

anhand ihrer Emissionswerte beim Screening, als vielmehr anhand anderer Eigenschaften erfolgte. Zum einen wurden drei Hohertragssorten (Barke, Marthe, Varde) ausgewählt, die sich noch im landwirtschaftlichen Anbau befinden, sowie drei alte Landsorten (BCC 1479, BCC 869, BCC 173), die sich durch eine gute Vermehrungsmöglichkeit sowie Keimfähigkeit auszeichneten. Bei der Auswahl wurde darauf geachtet, dass sowohl zweizeilige als auch sechszeilige Sorten vertreten waren und dass diese Sorten eine unterschiedliche Mehltauanfälligkeit aufwiesen (Tab. 4). Die Pflanzen dieser Sorten wurden mit je sechs Replikaten während MeJA- bzw. nach Ozonexposition sowie mit entsprechenden Kontrollpflanzen untersucht (siehe Kapitel 2.9 und 2.11). Die Ergebnisse finden sich in den Kapiteln 3.7 und 3.8.

3.5 Emissionen der Kontrollpflanzen im Vergleich zu den nach MeJA- oder Ozonexposition

Bereits ohne Stressapplikation emittierten einige Kontrollpflanzen der Sorte BCC 869, BCC 173 sowie Varde messbare Mengen an Linalool, β -Caryophyllen sowie α -Humulen. Andere Terpenoidemissionen wurden nicht gefunden. Für die Kontrollpflanzen der weiteren untersuchten Sorten konnten keine BVOC-Emissionen nachgewiesen werden.

Für die Sorten BCC 173, BCC 869 und Varde wurde daher zur Bestimmung der Emissionsraten nach Behandlung die Differenz der Emissionsraten der behandelten und unbehandelten Pflanzen gebildet. Dadurch ist der Effekt der Expositionen auf die Emissionsstärke der Gerstensorten erkennbar und wird entsprechend um die schon vor der Exposition vorhandenen BVOC-Emissionen korrigiert. Zunächst wurden dazu die Mittelwerte aus den in den sechs Kontrollexperimenten ermittelten Emissionsraten der einzelnen BVOC für jede Gerstensorte immer von den jeweiligen Emissionsraten der einzelnen Substanzen der exponierten Pflanzen für jedes Replikat (MeJA oder Ozon exponiert) abgezogen. Danach wurden die Mittelwerte der Emissionsraten gebildet. Diese Emissionsraten sind dann auf die Exposition zurückzuführen. Anschließend wurde die Unsicherheit der Messung bezüglich der durch die Behandlung hervorgerufenen Emissionen, wie im Kapitel 2.11 beschrieben, ermittelt (Tab. 10).

MeJA-Exposition

Die Emissionen der Kontrollpflanzen der Sorten BCC 173, BCC 869 und Varde machten zwischen 5 und 15% im Vergleich zu den Emissionen durch die MeJA-Exposition aus (Tab. 10).

Ozonexposition

Emissionen der Terpeneide aus den Kontrollpflanzen betragen bei der Sorte BCC 869 durchschnittlich 20% von denen nach Ozonexposition. Bei den Sorten BCC 173 und Varde machten die Emissionen der Kontrollpflanzen einen größeren Anteil aus (bis zu 50%; Tab. 10). Emissionen von GLV waren für die Kontrollpflanzen aller Sorten nicht nachweisbar.

Tab. 10: Emissionen der Terpeneide nach MeJA- und Ozonexposition

10a: Terpenoidemissionsraten nach MeJA-Exposition (Messzeitpunkt 48 Stunden nach Beginn der Behandlung).

Dargestellt sind die Mittelwerte der Emissionsraten terpenoider BVOC nach MeJA-Exposition, wobei die Terpenoidemissionsraten (Summe aller Terpenoidemissionsraten zum Zeitpunkt 48 Stunden) von den Terpenoidemissionsraten der Kontrollpflanzen (Summe aller Terpenoidemissionsraten zum Zeitpunkt 48 Stunden) abgezogen wurden (n=6).

10b: Terpenoidemissionen nach Ozonexposition aufsummiert über 24 Stunden nach Ende der Behandlung.

Dargestellt sind die Mittelwerte der aufsummierten Emissionen terpenoider BVOC nach Ozonexposition, wobei die aufsummierten Emissionen terpenoider BVOC der Kontrollpflanzen abgezogen wurden (n=6).

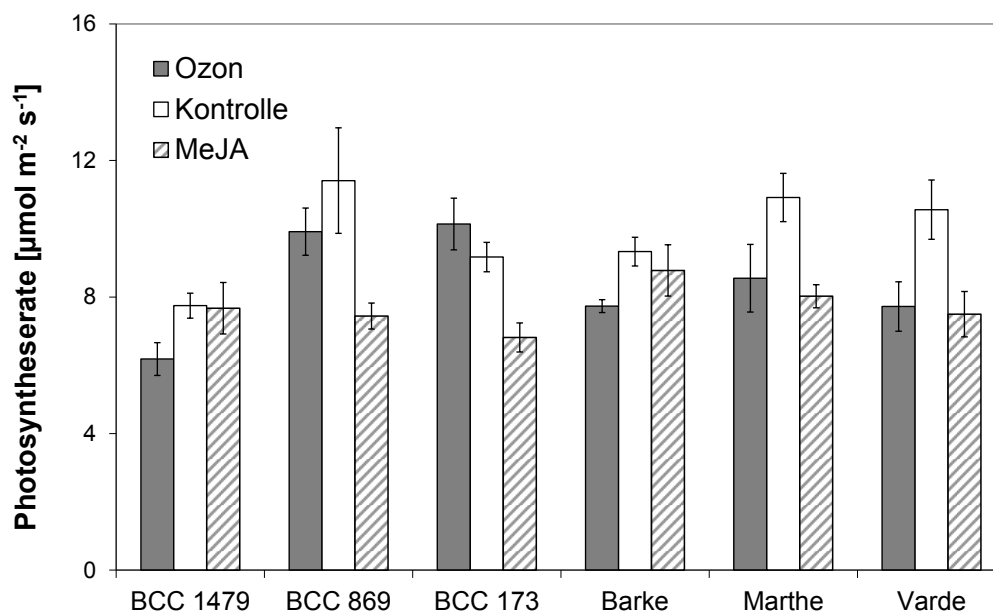
Fehlergrenzen (bedingt durch Terpenoidemissionsraten der Kontrollpflanzen) wurden nach dem Gauß'schen Fehlerfortpflanzungsgesetz berechnet (siehe Kapitel 2.11). Zusätzlich sind die ermittelten p-Werte des Student t-Tests der Emissionen zwischen unbehandelten und exponierten Pflanzen aufgelistet. Nur die Sorten BCC 869, BCC 173 und Varde wiesen Emissionen unter unbehandelten Bedingungen auf.

	Gerstensorte	BCC 869	BCC 173	Varde
10a. MeJA- Exposition	Terpenoidemissionsraten ± Fehlergrenzen (Terpenoidemissionsraten der Kontrollpflanzen)	141,5 [pmol m ⁻² s ⁻¹] ± 45,1	233,9 [pmol m ⁻² s ⁻¹] ± 87,5	35,9 [pmol m ⁻² s ⁻¹] ± 15,4
	p-Wert (unbehandelte und MeJA exponierte Bedingungen)	0,03	0,04	0,07
10b. Ozon- Exposition	Terpenoidemissionen über 24 h ± Fehlergrenzen (Terpenoidemissionsraten der Kontrollpflanzen)	1,25 [µmol m ⁻²] ± 0,3	0,97 [µmol m ⁻²] ± 0,44	0,31 [µmol m ⁻²] ± 0,16
	p-Wert (unbehandelte und Ozon exponierte Bedingungen)	0,005	0,058	0,116

3.6 Photosynthese- und Transpirationsraten der verschiedenen Gerstensorten

In den Abbildungen 14a und 14b sind die Photosynthese- und Transpirationsraten der Pflanzen nach MeJA- und Ozonexposition im Vergleich zu den Pflanzen unter unbehandelten Bedingungen dargestellt. Die einzelnen Pflanzen einer Sorte besitzen untereinander vergleichbar große Photosynthese- und Transpirationsraten. Auch die Photosynthese- und Transpirationsraten aller Sorten sind vergleichbar groß. Die Sorte BCC 1479 weist jedoch eine leicht geringere Transpirationsrate als die der anderen Sorten auf (Abb. 14b). Beide Expositionsformen haben keinen großen Effekt auf die Transpirationsrate im Vergleich zu den unbehandelten Bedingungen. Dies gilt - bis auf die Sorte BCC 869 - für alle Gerstensorten. BCC 869 reagiert mit einer erhöhten Transpiration nach Ozonexposition (Abb. 14b). Die Photosyntheserate kann bei allen Sorten durch die Exposition mit Ozon oder MeJA leicht verringert werden (Abb. 14a). Unterschiede der stomatären Öffnungsweite der Kontrollpflanzen und den mit beiden Expositionsformen behandelten Pflanzen waren nicht gegeben ($0,3 \pm 0,14 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ für alle Pflanzen nach Exposition mit MeJA / Ozon \pm Kontrollpflanzen).

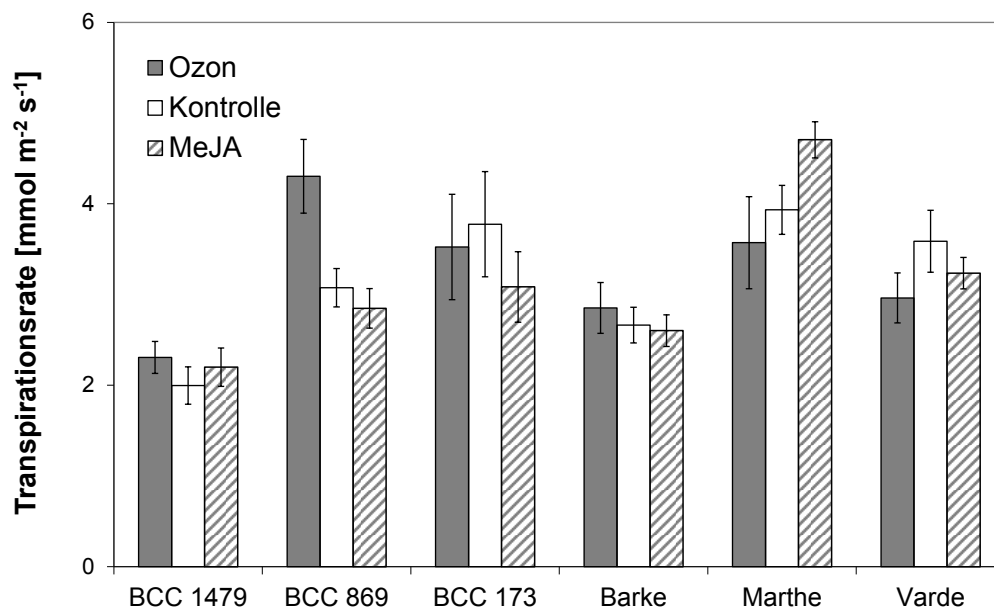
3. Ergebnisse



<i>T-Test Photosyntheserate</i>	<i>Ozon - Kontrolle Vergleich p-Werte</i>	<i>MeJA - Kontrolle Vergleich p-Werte</i>	<i>MeJA - Ozon Vergleich p-Werte</i>
BCC 1479	0,029	0,931	0,132
BCC 869	0,407	0,050	0,015
BCC 173	0,299	0,003	0,005
Barke	0,011	0,539	0,230
Marthe	0,084	0,007	0,633
Varde	0,021	0,020	0,918

Abb. 14a: Vergleich der Netto-Photosyntheseraten nach MeJA- und Ozonexposition mit denen der unbehandelten Pflanzen (Kontrolle)

Mittelwerte der Photosyntheseraten [$\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$] für $n=6 \pm$ Standardfehler (SE). Die Photosyntheseraten der Gerstensorten sind nach Ozonexposition anhand grauer Balken, die der unbehandelten Pflanzen anhand weißer Balken und die der nach MeJA-Exposition anhand grau schraffierter Balken, dargestellt. Die Tabelle zeigt die ermittelten p-Werte aus einem durchgeführten t-Test für die Photosyntheserate. Fett dargestellt sind die p-Werte mit $p < 0,05$



<i>T-Test Transpirationsrate</i>	<i>Ozon - Kontrolle Vergleich p-Werte</i>	<i>MeJA - Kontrolle Vergleich p-Werte</i>	<i>MeJA - Ozon Vergleich p-Werte</i>
BCC 1479	0,281	0,511	0,702
BCC 869	0,030	0,472	0,014
BCC 173	0,689	0,143	0,545
Barke	0,595	0,819	0,469
Marthe	0,548	0,046	0,079
Varde	0,200	0,387	0,461

Abb. 14b: Vergleich der Transpirationsraten nach MeJA- und Ozonexposition mit denen der unbehandelten Pflanzen (Kontrolle)

Mittelwerte der Transpirationsraten [$\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$] für $n=6 \pm \text{SE}$. Die Transpirationsraten der Gerstensorten sind nach Ozonexposition anhand grauer Balken, die der unbehandelten Pflanzen anhand weißer Balken und die der nach MeJA-Exposition anhand grau schraffierter Balken, dargestellt. Die Tabelle zeigt die ermittelten p-Werte aus einem durchgeführten t-Test für die Transpirationsrate. Fett dargestellt sind die p-Werte mit $p < 0,05$

3.7 Untersuchungen nach MeJA-Exposition

3.7.1 Emissionen nach MeJA-Exposition

MeJA-Exposition soll bei Pflanzen Terpenoidemissionen triggern (z.B. Rodriguez-Saona et al., 2001). Das Emissionsmuster soll dabei dem nach einem Herbivorenbefall ähneln (Hopke et al., 1994; Dicke et al., 1999). Daher wurden in der vorliegenden Arbeit zunächst die Emissionsraten der gesamten BVOC und anschließend die der einzelnen BVOC der verschiedenen Gerstensorten verglichen.

3.7.1.1 Vergleich der Emissionen nach MeJA-Exposition

Nach MeJA-Exposition wurden ausschließlich Terpene nachgewiesen (siehe Kapitel 3.1). Alle Gerstensorten emittierten dabei immer die gleichen terpenoiden BVOC (Tab. 11; siehe Kapitel 3.7.1.2). Die Menge aller aufsummierten Terpenoidemissionen unterschied sich aber eindeutig zwischen den einzelnen Sorten (Abb. 15).

Tab. 11: Liste der von den sechs Gerstensorten nach MeJA-Exposition emittierten BVOC

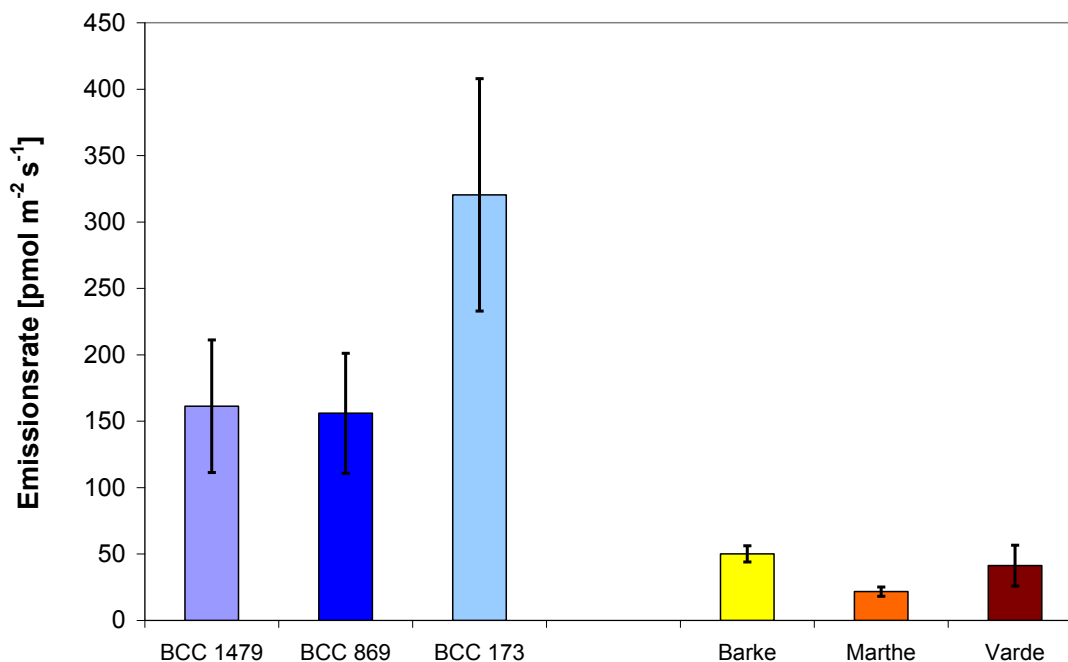
*¹ Emissionen nahe der Identifikationsgrenze

*² Emissionen, die den Hauptanteil der Emissionsraten ausmachen

Monoterpene:	Sesquiterpene:	Homoterpene:
Myrcen	β -Elemen	TMTT
α -Phellandren * ¹	β -Caryophyllen * ²	
β -Phellandren * ¹	α -Humulen	
Limonen	α -Copaen	
β -Ocimen		
Linalool * ²		
Linaloloxid		

Auch im Hinblick auf die Emissionen der Monoterpene, Sesquiterpene und Homoterpene im Einzelnen konnten eindeutige Unterschiede zwischen den Sorten detektiert werden (Abb. 16). (n=6). Die Mittelwerte der Emissionsraten der Monoterpene sind bei den alten Sorten deutlich höher als bei den modernen Sorten (Abb. 16). Allerdings weisen die Emissionsraten der Monoterpene innerhalb der alten Sorten eine sehr hohe Variabilität auf, so dass die Unterschiede als nicht signifikant eingestuft werden müssen. Auch die Emissionsraten der Sesquiterpene sind bei den alten Sorten generell signifikant höher als die der modernen Sorten (Abb. 16) und zeigen im Vergleich zu denen der Monoterpene keine starke Variabilität. Die alte Sorte BCC 173 hat darüber hinaus im Vergleich zu den anderen Sorten deutlich höhere TMTT Emissionsraten.

3. Ergebnisse

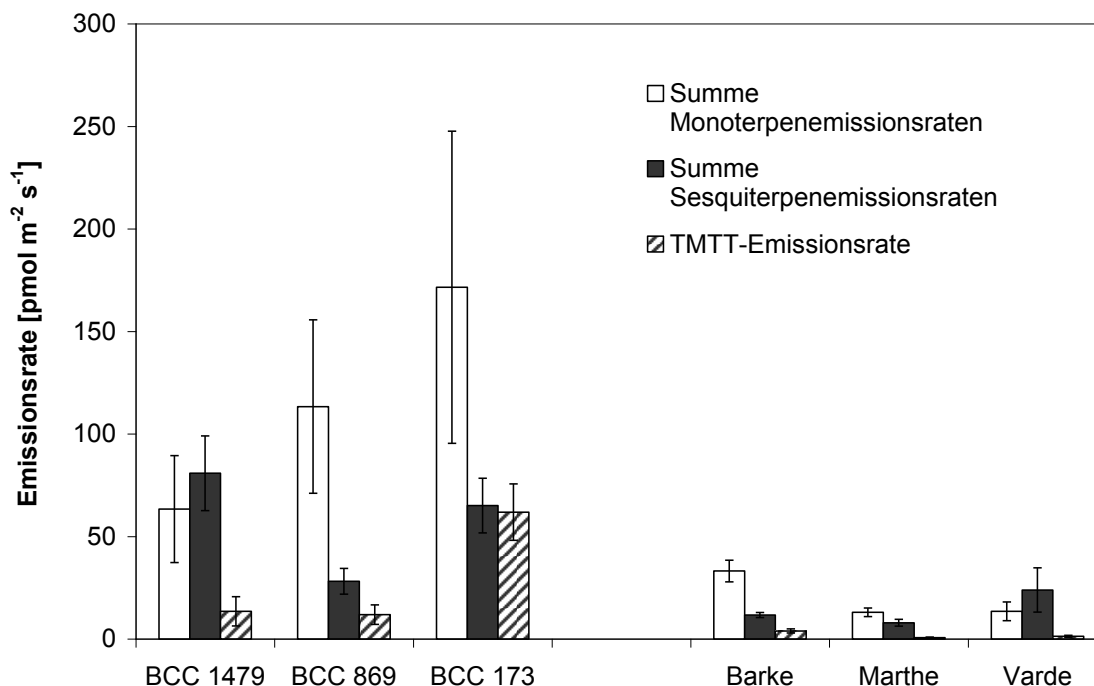


<i>T-Test Kontrolle - MeJA Vergleich</i>	<i>p-Werte</i>	<i>p < 0,05</i>	<i>p < 0,1</i>
BCC 869	0,03	*	*
BCC 173	0,04	*	*
Varde	0,07	n.s.	*
<i>T-Test alte Sorten Vergleich</i>			
BCC 1479 - BCC 869	0,941	n.s.	n.s.
BCC 1479 - BCC 173	0,218	n.s.	n.s.
BCC 869 - BCC 173	0,205	n.s.	n.s.
<i>T-Test moderne Sorten Vergleich</i>			
Barke - Marthe	0,004	*	*
Barke - Varde	0,637	n.s.	n.s.
Marthe - Varde	0,302	n.s.	n.s.
<i>T-Test moderne - alte Sorten Vergleich</i>			
Barke - BCC 1479	0,08	n.s.	*
Barke - BCC 869	0,09	n.s.	*
Barke - BCC 173	0,052	n.s.	*
Marthe - BCC 1479	0,04	*	*
Marthe - BCC 869	0,04	*	*
Marthe - BCC 173	0,04	*	*
Varde - BCC 1479	0,06	n.s.	*
Varde - BCC 869	0,07	n.s.	*
Varde - BCC173	0,047	*	*

Abb. 15: Vergleich der Emissionsraten terpenoider BVOC der verschiedenen Gerstensorten nach MeJA-Exposition (48-stündige Exposition)

Aufgetragen sind die Mittelwerte der Gesamtemissionen (je Replik wurde zunächst die Summe aller Emissionen und daraus schließlich der Mittelwert für $n=6 \pm SE$ gebildet). Die Tabelle zeigt die ermittelten p-Werte aus einem durchgeführten t-Test mit zwei unterschiedlichen p-Werten ($p < 0,05$; $p < 0,1$). Ein signifikanter Unterschied ist mit einem * und ein nicht-signifikanter Unterschied mit n.s. gekennzeichnet.

3. Ergebnisse



<i>T-Test Sortenvergleich</i>	<i>p-Werte Monoterpene</i>	<i>p-Werte Sesquiterpene</i>	<i>p-Werte TMTT</i>
<i>alte Sorten untereinander</i>			
BCC 1479 - BCC869	0,260	0,033	0,855
BCC 1479 - BCC173	0,194	0,504	0,015
BCC 869 - BCC 173	0,523	0,040	0,013
<i>moderne Sorten untereinander</i>			
Barke - Marthe	0,013	0,100	0,022
Barke - Varde	0,034	0,313	0,055
Marthe - Varde	0,939	0,202	0,296
<i>moderne - alte Sorten</i>			
Barke - BCC 1479	0,286	0,013	0,239
Barke - BCC 869	0,103	0,047	0,159
Barke - BCC 173	0,120	0,010	0,008
Marthe - BCC 1479	0,110	0,010	0,132
Marthe - BCC 869	0,064	0,022	0,065
Marthe - BCC 173	0,092	0,007	0,007
Varde - BCC 1479	0,114	0,028	0,149
Varde - BCC 869	0,064	0,745	0,078
Varde - BCC 173	0,092	0,038	0,007

Abb. 16: Vergleich der Monoterpen-, Sesquiterpen- sowie TMTT-Emissionsraten der verschiedenen Gerstensorten nach MeJA-Exposition (48-stündige Exposition)

Aufgetragen ist die Summe der Monoterpenemissionsraten (weiße Balken), der Sesquiterpenemissionsraten (schwarze Balken) und die TMTT-Emissionsraten (schraffierte Balken). Je Sorte wurde für jedes Replikat die Summe aller Monoterpene und der Mittelwert für $n=6 \pm SE$ gebildet. Entsprechend wurde auch mit den Sesquiterpenen verfahren. Für die TMTT-Emissionen wurden je Sorte für jedes Replikat die einzelnen TMTT Emissionen genommen und daraus der Mittelwert gebildet. Es wurden immer die Emissionen der Kontrollpflanzen abgezogen ($n=6$). Es wurde ein t-Test zur Bestimmung des Unterschiedes der Mono-, Sesquiterpene und TMTT-Emissionen innerhalb einer Sorte sowie der Sorten untereinander durchgeführt. Die unterhalb der Abbildung stehende Tabelle zeigt die ermittelten p-Werte aus diesem t-Test. P-Werte $< 0,05$ sind fett dargestellt.

3.7.1.2 Vergleich des Musters der BVOC-Emissionen nach MeJA-Exposition

Wie schon anhand der Tabelle 11 ersichtlich emittieren alle Sorten immer die gleichen Substanzen. Betrachtet man den Anteil der Emissionen einzelner Monoterpene an der Summe aller Monoterpenemissionen, zeigt sich, dass für alle Gerstensorten die Emission von Linalool als dominierende Monoterpenemission (Abb. 17a) nachweisbar war. Hauptemission der Sesquiterpenemissionen stellt die von β -Caryophyllen dar (Abb. 17b). Die höhere Sesquiterpenemissionsrate der alten Gerstensorten (vgl. Abb. 16) ist - neben β -Caryophyllen - auch durch weitere Sesquiterpene zu begründen. Hier ergibt sich jedoch das Problem, dass β -Caryophyllen den Hauptanteil der Sesquiterpenemissionen ausmacht und die anderen Sesquiterpenemissionen dagegen sehr klein sind. Unterschiede dieser Sesquiterpenemissionen zwischen den Sorten sind schwierig zu bestimmen, da Fehler bei der Auswertung dieser kleinen Signale unvermeidbar sind. Die Signale dieser Sesquiterpenemissionen waren nahe der Nachweisgrenze. Dieses Problem besteht bei allen Emissionen, die nicht den Hauptanteil der Emissionsraten ausmachen (vgl. Tab. 11).

Vergleicht man den Anteil an Linalool und β -Caryophyllen, so weist die alte Gerstensorte BCC 1479 im Gegensatz zu den anderen Sorten einen höheren Anteil an β -Caryophyllen als an Linalool auf (Abb. 18).

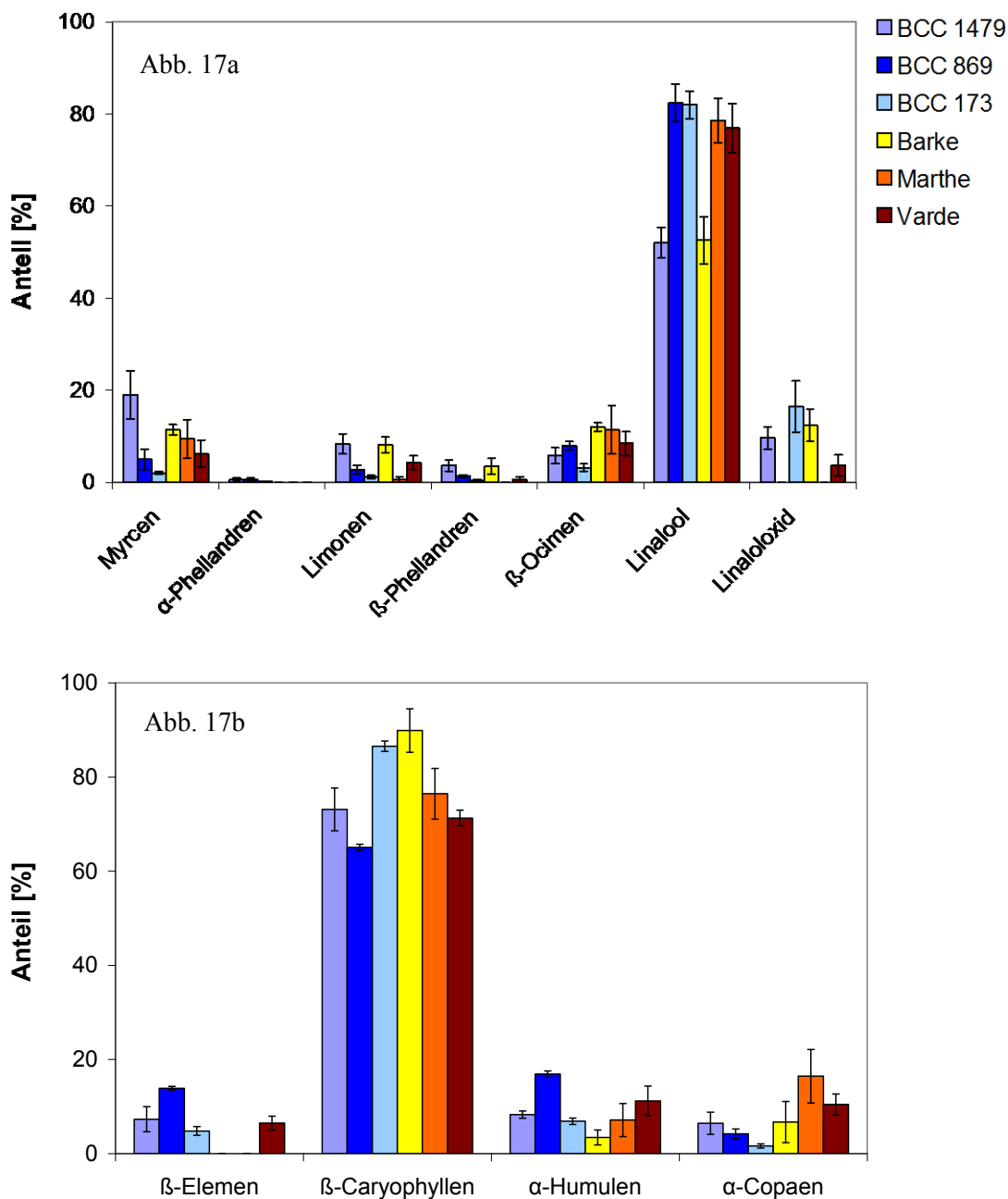


Abb. 17: Muster terpenoider BVOC-Emissionen nach 48-stündiger MeJA-Exposition der verschiedenen Gerstensorten

17a: Anteile der jeweiligen Monoterpenemissionen an der Summe aller Monoterpenemissionen

17b: Anteile der jeweiligen Sesquiterpenemissionen an der Summe aller Sesquiterpenemissionen

Zur Bildung der Summe wurden nur die BVOC herangezogen, deren Emissionsraten über der Nachweisgrenze lagen ($n=6 \pm SE$).

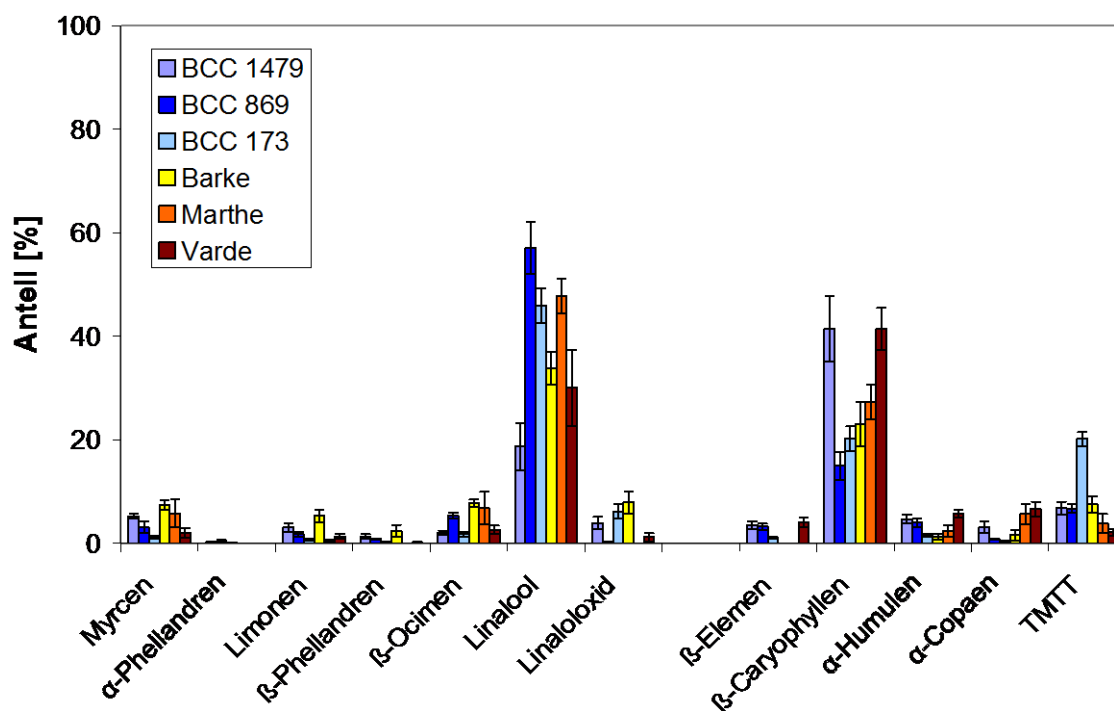


Abb. 18: Anteil der jeweiligen Emissionen an der Summe aller Terpenoidemissionen nach 48-stündiger MeJA-Exposition der verschiedenen Gerstensorten

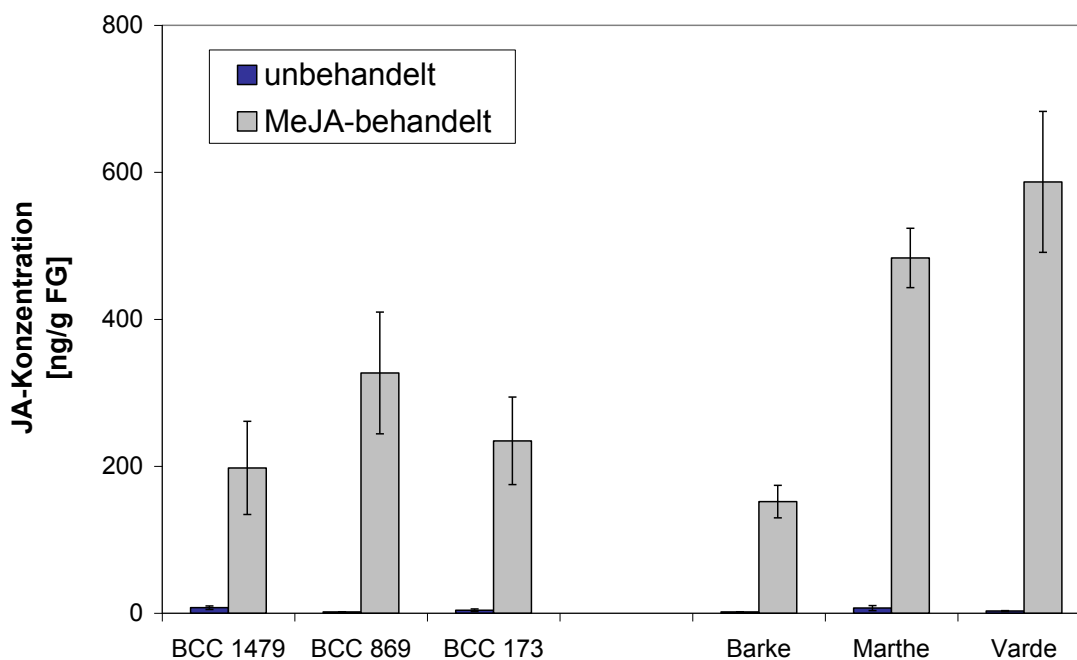
Zur Bildung der Summe wurden nur die BVOC herangezogen, deren Emissionsraten über der Nachweisgrenze lagen ($n=6 \pm SE$).

3.7.2 Endogene JA- und SAG-Gehalte nach MeJA-Exposition

3.7.2.1 Endogener JA-Gehalt nach MeJA-Exposition

Von allen Gerstenpflanzen wurde der endogene JA-Gehalt 48 Stunden nach Beginn der MeJA-Exposition sowie für die Kontrollpflanzen, welche 72 Stunden (inklusive einem Tag Akklimation) ohne exogenen Stress innerhalb der Pflanzenkammer standen, bestimmt (siehe Tab. 5). Unter Kontrollbedingungen machten die JA-Gehalte durchschnittlich 5% von denen unter MeJA-Exposition aus (Abb. 19; p-Werte). Insgesamt war die Tendenz vorhanden, dass die alten Sorten nach MeJA-Exposition geringere JA-Gehalte aufwiesen als die modernen Sorten. Eine Ausnahme bildet Barke. Diese moderne Sorte wies von allen untersuchten Sorten die geringste Menge an JA auf (Abb. 19). Die beiden anderen modernen Sorten Marthe und Varde besaßen dagegen die höchsten und etwa vergleichbar hohe JA-Gehalte.

3. Ergebnisse



<i>T-Test Kontrolle - MeJA Vergleich</i>	<i>p-Werte</i>	<i>p < 0,05</i>	<i>p < 0,1</i>
BCC 1479	0,026	*	*
BCC 869	0,011	*	*
BCC 173	0,011	*	*
Barke	0,001	*	*
Marthe	0,0001	*	*
Varde	0,002	*	*
<i>T-Test alte Sorten Vergleich (MeJA)</i>			
BCC 1479 - BCC 869	0,25	n.s.	n.s.
BCC 1479 - BCC 173	0,68	n.s.	n.s.
BCC 869 - BCC 173	0,39	n.s.	n.s.
<i>T-Test moderne Sorten Vergleich (MeJA)</i>			
Barke - Marthe	0,0001	*	*
Barke - Varde	0,006	*	*
Marthe - Varde	0,36	n.s.	n.s.
<i>T-Test moderne - alte Sorten Vergleich (MeJA)</i>			
Barke - BCC 1479	0,52	n.s.	*
Barke - BCC 869	0,09	n.s.	*
Barke - BCC 173	0,24	n.s.	n.s.
Marthe - BCC 1479	0,005	*	*
Marthe - BCC 869	0,13	n.s.	n.s.
Marthe - BCC 173	0,007	*	*
Varde - BCC 1479	0,01	*	*
Varde - BCC 869	0,07	n.s.	*
Varde - BCC 173	0,01	*	*

Abb. 19: endogener JA-Gehalt [ng/g Frischgewicht, FG] der Kontrollpflanzen („unbehandelt“, blaue Balken) und nach 48-stündiger MeJA-Applikation („MeJA-behandelt“, graue Balken) für $n=6 \pm SE$

Die unterhalb der Abbildung stehende Tabelle zeigt die ermittelten p-Werte aus einem durchgeführten t-Test mit zwei unterschiedlichen p-Werten ($p < 0,05$; $p < 0,1$). Ein signifikanter Unterschied ist mit einem * und ein nicht-signifikanter Unterschied mit n.s. gekennzeichnet. Es wurden die p-Werte der Kontrollpflanzen (Kontrolle) mit denen nach MeJA-Exposition (MeJA) sowie die p-Werte der verschiedenen Sorten nach MeJA-Exposition verglichen.

Aufgrund der diskutierten Rolle der JA als Trigger für die Biosynthese und Emission von Mono- und Sesquiterpenen könnte der endogene JA-Gehalt mit der Emissionsrate der Mono- und Sesquiterpene korreliert sein. Abbildung 20 zeigt, dass keine generelle Korrelation des JA-Gehaltes zu der Emissionsrate der Terpenoide aus Mono- und Sesquiterpenen vorhanden ist. Daneben wird die oft hohe Varianz der Emissionsraten sowie der JA-Gehalte innerhalb einer Sorte deutlich.

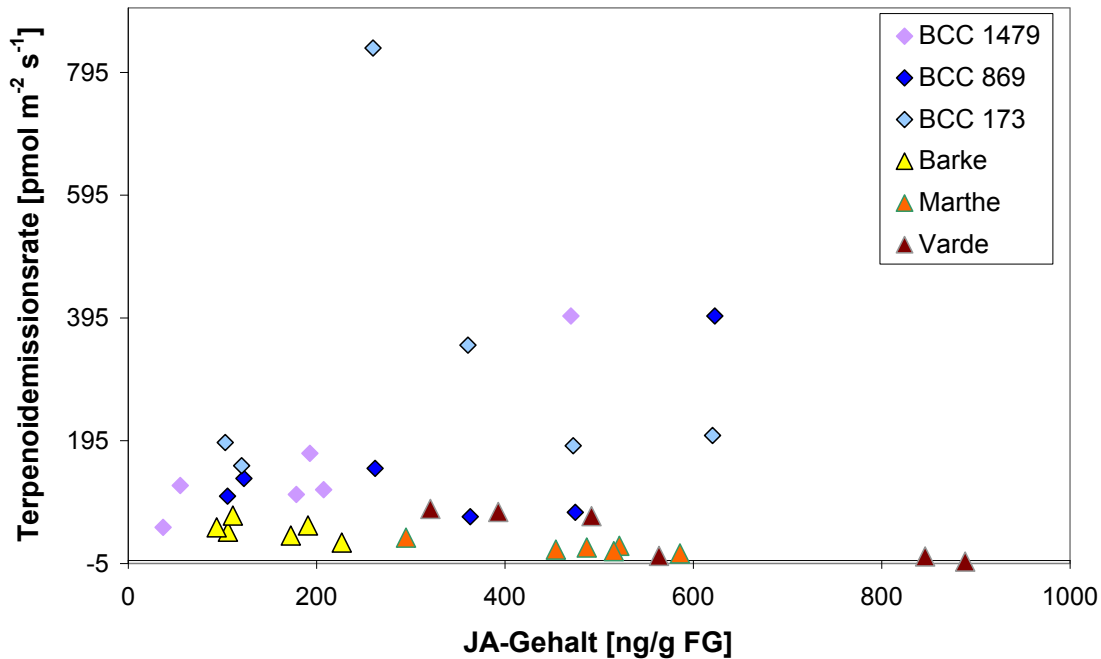
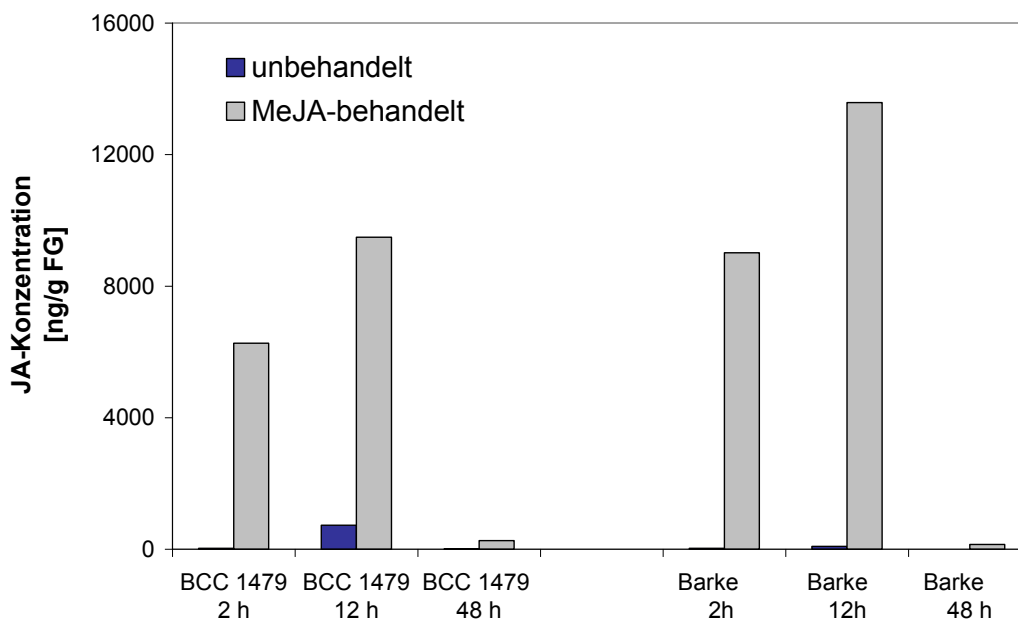


Abb. 20: Diagramm der endogenen JA-Gehalte nach MeJA-Exposition im Vergleich zu der Emissionsrate aller BVOC

Korrelation der Gesamtemissionsrate aller Terpenoide in den jeweils letzten Chromatogrammen vor der Beprobung der Pflanzen zur Bestimmung der endogenen JA-Konzentrationen (Y-Achse) zu den endogenen JA-Gehalte (X-Achse) der einzelnen Replikate der verschiedenen Gerstensorten nach MeJA-Exposition (je Sorte n = 6). Wenn unter Kontrollbedingungen JA bzw. Terpenoidemissionen nachweisbar waren, wurden diese immer von den nach MeJA-Exposition gefundenen Werten abgezogen.

Neben der Bestimmung der JA-Gehalte nach 48 Stunden der MeJA-Exposition wurden zusätzlich die JA-Gehalte der alten Sorte BCC 1479 und der modernen Sorte Barke nach 2 und 12 Stunden der MeJA-Exposition mit je zwei Wiederholungen untersucht (Abb. 21). Diese frühen Zeitpunkte der MeJA-Exposition wurden bestimmt, um eventuelle deutliche Unterschiede in der Reaktionsgeschwindigkeit oder Akkumulation in dieser frühen Phase zu detektieren oder auszuschließen. Aufgrund von zwei Replikaten je Sorte wurde auf eine Angabe des Standardfehlers sowie von einer Durchführung eines t-Tests abgesehen. Um auf die Variabilität der Ergebnisse schließen zu können, wurde unterhalb der Abbildung 21 eine

Tabelle mit den einzelnen Werten je Replikate eingefügt. Die JA-Gehalte sind nach 2 und besonders nach 12 Stunden der MeJA-Exposition im Vergleich zu den JA-Gehalten nach 48 Stunden der MeJA-Exposition deutlich erhöht. Dies ist für beide Sorten der Fall. Nach 12 Stunden der MeJA-Exposition besitzt Barke im Vergleich zu BCC 1479 sogar leicht höhere JA-Gehalte (Abb. 21). Eine Korrelation der höheren Terpenoidemissionen der Sorte BCC 1479 ist demnach auch zu früheren Messzeitpunkten des JA-Gehaltes nicht zu erkennen.



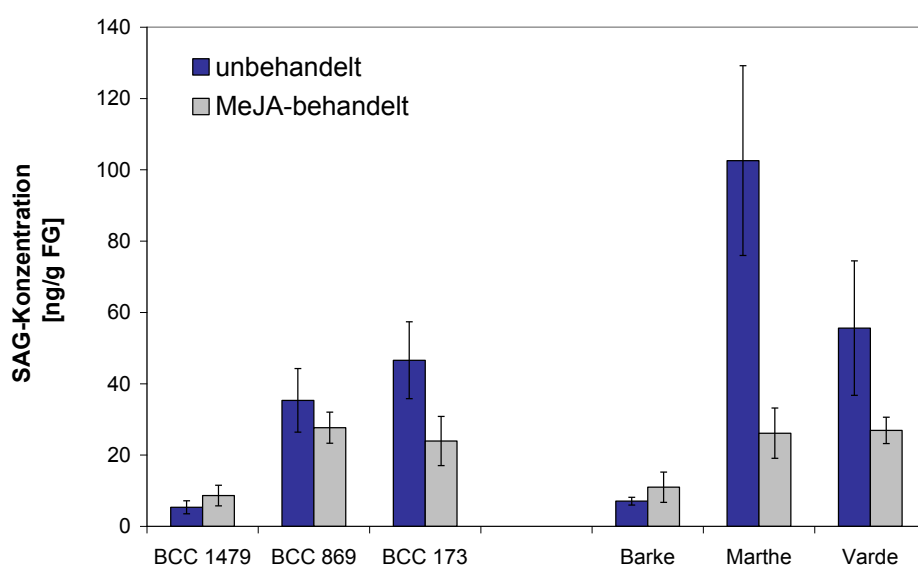
JA-Gehalte	unbehandelt		MeJA-behandelt	
	1. Replikat	2. Replikat	1. Replikat	2. Replikat
BCC 1479: 2 h	2	46	8117	4414
BCC 1479: 12 h	23	1435	10592	8379
BCC 1479: 48 h	2,6	3,31	477	45
Barke: 2h	20	35	10679	7344
Barke: 12h	61	109	12965	14194
Barke: 48 h	1,8	1,55	108	174

Abb. 21: Endogene JA-Gehalte [nmol/g FG] nach 2, 12 und 24 Stunden der Sorten BCC 1479 und Barke unter unbehandelten Bedingungen und nach MeJA-Applikation

In der Abbildung sind die gemittelten JA-Gehalte nach 2, 12 und 48 Stunden (h) der Sorte BCC 1479 und Barke unter unbehandelten Bedingungen („unbehandelt“, blaue Balken) und nach MeJA-Exposition („MeJA-behandelt“, graue Balken) untersucht (n=2). Aufgrund von zwei Replikaten je Sorte wurde auf eine Angabe des SE sowie von einer Durchführung eines t-Tests abgesehen. Daher wurden in der unterhalb der Abbildung stehenden Tabelle die jeweiligen JA-Gehalte je Replikat aufgelistet.

3.7.2.2 Endogener SA- und SAG-Gehalt nach MeJA-Exposition

Um den Effekt der MeJA-Exposition auf andere Signalkaskaden zu untersuchen (vgl. Abb. 3) wurde der endogene Gehalt freier SA und der gebundenen Form SAG 48 Stunden nach Beginn der MeJA-Exposition mit den Gehalten der Kontrollpflanzen (siehe Tab. 5) verglichen. Freie SA war in keiner Pflanze nachweisbar (vgl. Kapitel 2.12). SAG konnte bei allen Sorten nachgewiesen werden (Abb. 22). Bis auf die Sorte Marthe ist kein Unterschied der SAG-Gehalte zwischen den Kontrollpflanzen und den mit MeJA exponierten Pflanzen zu erkennen. Bei der Sorte Marthe wurde der SAG-Gehalt durch die 48-stündige MeJA-Exposition erniedrigt (Abb. 22).



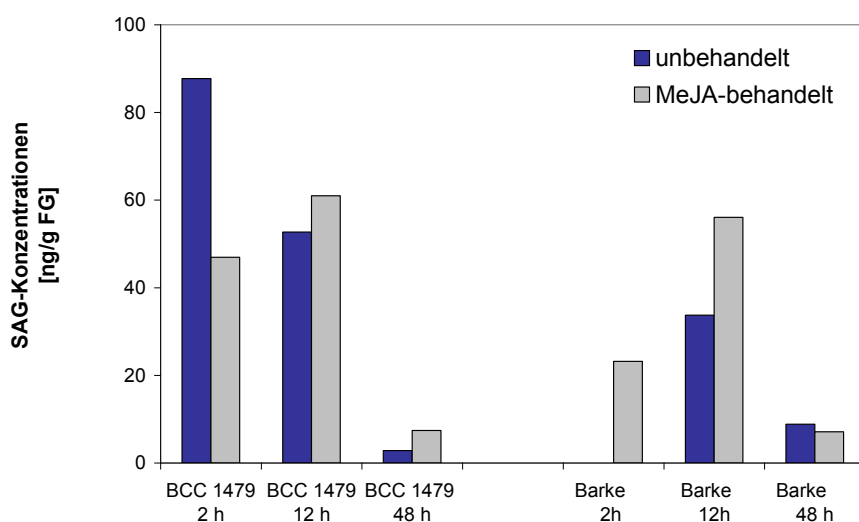
<i>T-Test Kontrolle - MeJA Vergleich</i>	<i>p-Werte</i>	<i>p < 0,05</i>	<i>p < 0,1</i>
BCC 1479	0,36	n.s.	n.s.
BCC 869	0,47	n.s.	n.s.
BCC 173	0,11	n.s.	n.s.
Barke	0,41	n.s.	n.s.
Marthe	0,034	*	*
Varde	0,19	n.s.	n.s.

Abb. 22: endogener SAG-Gehalt [ng/g FG] unter unbehandelten Bedingungen und nach 48-stündiger MeJA-Applikation der verschiedenen Gerstensorten

Dargestellt sind die Mittelwerte der SAG-Gehalte der Kontrollpflanzen („unbehandelt“, blaue Balken) und der MeJA-behandelten Pflanzen („MeJA-behandelt“, graue Balken) für $n=6 \pm SE$. Die Tabelle zeigt die ermittelten p-Werte aus diesem t-Test mit zwei unterschiedlichen p-Werten ($p < 0,05$; $p < 0,1$). Ein signifikanter Unterschied ist mit einem * und ein nicht-signifikanter Unterschied mit n.s. gekennzeichnet.

3. Ergebnisse

Wie auch für die JA-Gehalte wurden die SAG-Gehalte der Sorten BCC 1479 und Barke zusätzlich nach 2 und 12 Stunden der MeJA-Exposition mit je zwei Wiederholungen bestimmt (Abb. 23). Freie SA war auch zu früheren Messzeitpunkten nicht nachweisbar (Nachweisgrenze SA > 7ng/g FG). Unterschiede der SAG-Gehalte der Pflanzen nach MeJA-Exposition im Vergleich zu den SAG-Gehalten der Kontrollpflanzen sind aufgrund der Schwankungen der SAG-Gehalte zwischen den Replikaten nicht gegeben. Für Barke ist z.B. zu beachten, dass nach zwei Stunden der MeJA-Exposition für das erste Replikat kein SAG nachgewiesen wurde (siehe Tabelle unterhalb der Abb. 23). Durch diese Variabilität müssten mehr Wiederholungen (n>2) durchgeführt werden. Nach 12 Stunden ist der SAG-Gehalt beider Sorten im Vergleich zu den SAG-Gehalten nach 48 Stunden erhöht (Abb. 23). Jedoch müsste dies mit weiteren Wiederholungen bestätigt werden.



SAG-Gehalte	unbehandelt		MeJA-behandelt	
	1. Replikat	2. Replikat	1. Replikat	2. Replikat
BCC 1479: 2 h	65	111	23	71
BCC 1479: 12 h	54	51	65	57
BCC 1479: 48 h	0	6	8	15
Barke: 2h	0	0	0	46
Barke: 12h	18	50	50	62
Barke: 48 h	6	12	8	6

Abb. 23: Verschiedene Messzeitpunkte des endogenen SAG-Gehaltes [ng/g FG] der Kontrollpflanzen und der Pflanzen nach MeJA-Applikation der Sorten BCC 1479 und Barke. Es wurden die SAG-Gehalte nach 2, 12 und 48 Stunden (h) der Sorte BCC 1479 und Barke unter unbehandelten Bedingungen („unbehandelt“, blaue Balken) und nach MeJA-Exposition („MeJA-behandelt“, graue Balken) untersucht (n=2). Daher wurden in der unterhalb der Abbildung stehenden Tabelle die jeweiligen SAG-Gehalte je Replikat aufgelistet.

3.7.3 Einfluss der MeJA-Applikation auf Genexpression

Der Einfluss der MeJA-Applikation auf die Pflanzen wurde auch anhand der Expression verschiedener Gene untersucht (Kapitel 2.13.1). Es wurden dabei die Expression der Gene der LOX-100, der AOS2 sowie der AOC untersucht, welche u. a. in der Biosynthese von JA involviert sind (Abb. 1). Die Biosynthese der Monoterpene wurde anhand der DXR-Expression untersucht. Neben diesen emissionsrelevanten Genen wurde zudem die Expression einiger PR-Proteine (PR-1b, LTP, TH) analysiert.

Die Tabelle 11b zeigt die Induktion der untersuchten Gene durch die MeJA-Exposition im Vergleich zu den unbehandelten Bedingungen. Die fett dargestellten Werte sind signifikant durch die MeJA-Exposition gegenüber den Kontrollbedingungen erhöht.

Die LOX-100 wurde 2 bis 3-fach bei allen Gerstensorten nach 48-stündiger MeJA-Exposition im Vergleich zu den Kontrollbedingungen induziert (Tab. 12b). Auch die AOS2 sowie die AOC Expression wurden bei allen Gerstensorten durch die MeJA-Exposition induziert. Die AOS2 Expression der alten Sorten war dabei stärker induziert als die der modernen Sorten (Faktor zwei). Die Basalexpression der AOS2 ist zwischen den Sorten vergleichbar (Tab. 12a). Die AOC wurde durch die MeJA-Exposition nicht so stark wie die AOS2 induziert und es sind keine deutlichen Unterschiede der AOC-Expressionsstärke zwischen alten und modernen Sorten erkennbar (Tab. 12b).

Für die Biosynthese der Monoterpene über den MEP-Weg wurde das zweite Enzym, die DXR untersucht. Die Expression der DXR wurde schwach durch die MeJA-Exposition erhöht und es sind keine Unterschiede in der Expressionsstärke zwischen alten und modernen Sorten sichtbar (Tab. 12b).

Die PR-1b-Genexpression zeigt im Vergleich zu den Kontrollpflanzen eine schwache Induktion bzw. eine Erniedrigung der Expressionsstärke nach der MeJA-Applikation (Tab. 12b).

Die blattspezifischen TH zeigen eine sehr starke Induktion durch die MeJA-Exposition, wobei eine sehr starke Varianz der TH-Induktion zwischen den Sorten zu beobachten ist. Das LTP4 ist im Vergleich zu den TH schwach induziert (Tab. 12b).

Auch die Expression von JRG5 und JIP23 wurde durch die MeJA-Applikation erhöht. Wie bei den TH besteht eine hohe Variabilität der Expressionsstärken von JRG5 und JIP23 zwischen den Sorten (Tab. 12b). Bei der Sorte Varde ist zu beachten, dass schon eine sehr hohe basale Expression von JIP23 im Vergleich zu der Basalexpression von Barke gegeben ist. Varde zeigt demnach für JIP23 eine sehr hohe Expression im Vergleich zu der Expression der anderen Sorten.

3. Ergebnisse

Tab. 12a: Basalexpression der Gene normiert auf die der Kontrollpflanze Barke

Vergleich der basalen Expression der verschiedenen Gene der Kontrollpflanzen bezogen auf die der Kontrollpflanze Barke (je drei biologische und drei methodische Replikate). Grau unterlegt sind die alten Landsorten, gelb unterlegt die modernen Hohertragsorten. Fett dargestellte Werte signifikant unterschiedlich zu der Kontrollpflanze Barke induziert bzw. erniedrigt. Analysiert mit qRT-PCR; Auswertung mit REST2009 Software und mit GAPDH und Tubulin als Referenzgene.

	LOX-100	AOS2	AOC	DXR	PR-1b	LTP4	TH	JRG5	JIP23
BCC 1497	0,7	0,2	0,7	1	0,1	1,4	0,4	0,8	0,9
BCC 869	0,6	0,3	1,2	0,8	0,1	1,4	1,7	1,1	0,136
BCC 173	0,7	0,4	1	1,3	0,4	0,02	4	1,3	3
Barke	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Marthe	0,6	0,7	0,6	1	1,5	0,8	24	4	2
Varde	0,7	0,6	1,3	1	0,8	0,8	31	6	118

Tab. 12b: x-fache Induktion der Gene nach 48-stündiger MeJA-Exposition bezogen auf die Werte der Kontrollpflanzen (je drei biologische und drei methodische Replikate).

Grau unterlegt sind die alten Landsorten, gelb unterlegt die modernen Hohertragsorten. Fett dargestellt sind die Werte, die signifikant zu den Kontrollbedingungen induziert wurden. Analysiert mit qRT-PCR; Auswertung mit REST2009 Software und mit GAPDH und Tubulin als Referenzgene.

	LOX-100	AOS2	AOC	DXR	PR-1b	LTP4	TH	JRG5	JIP23
BCC 1497	3	58	10	1	1	1	2080	176	403
BCC 869	3	36	4	0,5	1,5	1	831	1097	106
BCC 173	3	44	16	0,5	0,05	4	262	1001	9
Barke	2	21	8,5	0,9	1	1	1280	926	160
Marthe	2	15	9	0,7	0,5	1	158	301	315
Varde	3	24	8	1	0,5	2	54	133	111

Um auszuschließen, dass die Genexpressionen zu dem betrachteten Zeitpunkt von 48 Stunden nach Beginn der MeJA-Exposition nicht schon gesunken sind und somit ihre Expression nachgelassen hat, wurden die Expressionsstärke dieser Gene auch zu früheren Zeitpunkten gemessen. Dazu wurden die Gene nach 2 und 12 Stunden der MeJA-Exposition für die moderne Sorte Barke und der alten Landsorte BCC 1497 (je Sorte zwei biologische Replikate) analysiert (Tab. 13).

Bei der Sorte Barke ist die Expression der LOX-100 und der AOS2 schon nach zwei Stunden der MeJA-Exposition im Vergleich zu den Kontrollbedingungen stark induziert, wobei die Induktion bis 48 Stunden abfällt (Tab. 13). Ein ähnliches Verhalten ist für die Expression von AOS2 der Sorte BCC 1479 gegeben. Die LOX-100 zeigt jedoch bei der Sorte BCC 1479 kein eindeutiges zeitliches Expressionsmuster.

Die AOC-Expression ist bei beiden Sorten nach sechs Stunden am höchsten und sinkt anschließend (Tab. 13). Aufgrund der frühen Induktion und dem anschließendem Abfall der Expressionsstärke LOX-100, AOS2 und der AOC könnten bei der ausschließlichen Betrachtung der 48 Stunden Werte mögliche Unterschiede zwischen den einzelnen Sorten nicht mehr feststellbar sein.

Bei der DXR ist bei früheren Zeitpunkten keine deutliche Induktion zu erkennen (Tab. 13). Die PR-1b-Genexpression zeigt bei beiden Sorten kein eindeutiges Induktionsmuster (Tab. 13).

Die Expressionsstärke von TH, JRG5 und JIP23 wurde bei beiden Sorten 12 Stunden nach Beginn der MeJA-Exposition erhöht, wobei die Expression bis 48 Stunden nach Beginn der MeJA-Exposition ansteigt (Tab. 13). Diese Gene werden demnach später hoch reguliert. Es könnten bei diesen Genen die vorhandenen Daten der 48-stündigen Exposition mit n=6 herangezogen werden. Ein Vergleich der Expressionsstärke dieser Gene nach 48 Stunden kann demnach zwischen den Gerstensorten erfolgen.

Tab. 13: x-fache Induktion der Gene nach 2, 12 und 48 Stunden (h) der MeJA-Exposition der Gerstensorten Barke und BCC 1479 bezogen auf die jeweilige zeitliche Kontrolle

Zwei biologische Replikate mit drei technischen Replikaten. Fehlergrenzen sind daher nicht sinnvoll. Analysiert mit qRT-PCR. Auswertung mit REST2009 Software und mit GAPDH und Tubulin als Referenzgene. Bei den 48 Stunden Werte handelt es sich um die Werte aus Tab. 12b.

BCC 1479	LOX-100	AOS2	AOC	DXR	PR-1b	LTP4	TH	JRG5	JIP23
2 h	4	96	17	1	2	1	3	8	2
12 h	8	328	37	1	1	2	304	59	235
48 h	3	58	10	1	1	1	2080	176	403

Barke	LOX-100	AOS2	AOC	DXR	PR-1b	LTP4	TH	JRG5	JIP23
2 h	13	152	19	1	2	1	18	9	1
12 h	9	121	15	1	3	1	137	62	6
48 h	2	21	9	1	1	1	1280	926	160

3.8 Untersuchungen nach Ozonexposition

Ozon soll allgemein bei Pflanzen ähnliche Abwehrreaktionen wie nach einem Pathogenbefall auslösen (Sandermann et al., 1998; Rao et al., 2000). Dabei sollen u. a. auch BVOC-Emissionen getriggert werden (Kangasjärvi et al., 1994). Daher wurden ebenso wie bei der MeJA-Exposition auch für die Ozonexposition die Emissionen und die Gehalte der verschiedenen Pflanzenhormone in den sechs Gerstensorten untersucht. Im Gegensatz zu der MeJA-Exposition führte die Ozonexposition bei den Blättern aller Gerstensorten zu nekrotische Flecken, die weniger als 20% der gesamten Blattfläche ausmachten.

3.8.1 Emissionen nach Ozonexposition

3.8.1.1 Vergleich der Emissionen nach Ozonexposition

Nach Ozonexposition traten Terpenoid- sowie GLV-Emissionen auf. Diese sind in der Tabelle 14 aufgelistet.

Tab. 14: Liste der von den sechs Gerstensorten nach Ozonexposition emittierten BVOC

*¹ Emissionen nahe der Identifikationsgrenze

*² Emissionen, die den Hauptanteil der Emissionsraten ausmachen

Monoterpene:	Sesquiterpene:	GLVs:
Myrcen	β -Elemen	(Z)-3-Hexenol
β -Phellandren* ¹	β -Caryophyllen* ²	(Z)-3-Hexenylacetat* ²
Limonen	α -Humulen	
β -Ocimen	α -Copaen	
Linalool* ²		

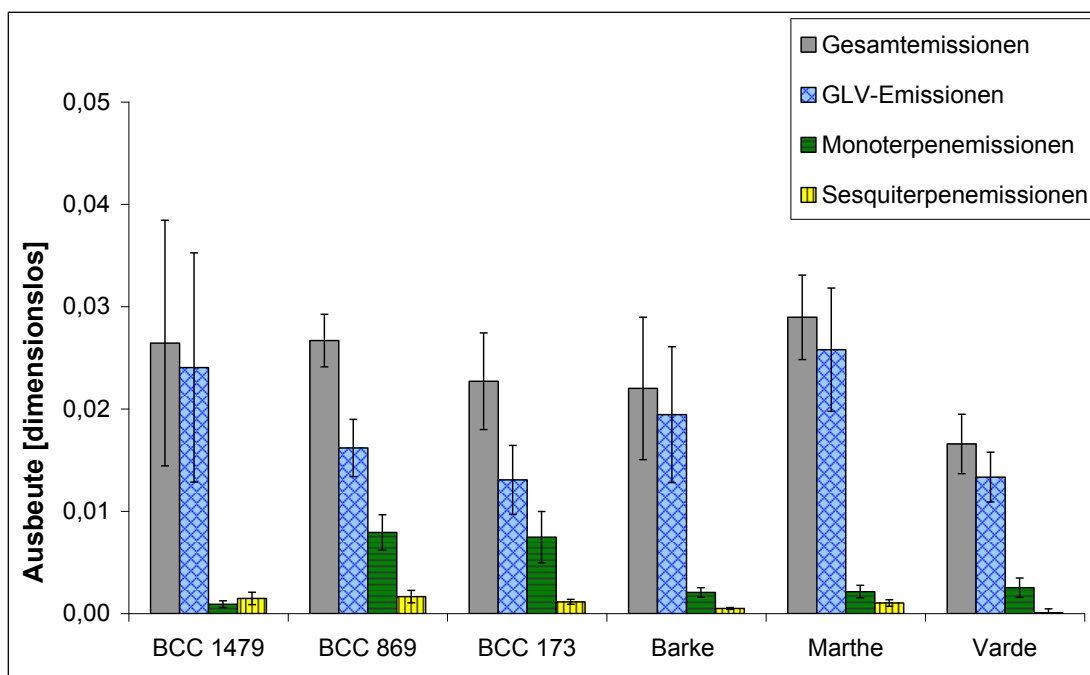
Unterschiede der Gesamtemissionen (d.h. die Summe aus Terpenoiden und GLVs bezogen auf die Ozonaufnahmemenge, vgl. Kapitel 3.2, Tab. 7) sind dabei zwischen den Sorten nicht signifikant (Abb. 24). Hauptanteil an den Gesamtemissionen machen die Emissionen der GLVs aus. Für die Substanzgruppe der GLV-Emissionen waren für alle Gerstensorten ausschließlich Emissionen von (Z)-3-Hexenol- und (Z)-3-Hexenylacetat nachweisbar, wobei alle Sorten hauptsächlich (Z)-3-Hexenylacetat emittierten [Anteil (Z)-3-Hexenylacetat an der Summe der GLVs = 70% \pm 20%]. Für die Kontrollpflanzen waren keine GLV-Emissionen nachweisbar. Signifikante Unterschiede in der Stärke der GLV-Emissionen sind zwischen den Sorten nicht gegeben (Abb. 24).

Wie auch nach MeJA-Exposition wurde durch die Ozonexposition die Emission der Terpenoide getriggert. Dabei emittierten alle Sorten dieselben Terpenoidverbindungen (Monoterpene und Sesquiterpene), wie auch nach MeJA-Exposition. Allerdings waren für keine der untersuchten Pflanzen TMTT-Emissionen nach Ozonexposition nachweisbar (vgl. Kapitel 3.1, Abb. 9).

Die alten Sorten BCC 869 und BCC 173 zeigten im Vergleich zu den anderen Sorten erhöhte Monoterpenemissionen. Die ermittelten p-Werte zeigen, dass die Monoterpene der Sorte BCC 173 ausschließlich im Vergleich zu der Sorte BCC 1479 signifikant erhöht sind. Für die anderen Sorten sind keine signifikanten Unterschiede der Monoterpenemissionen im Vergleich zu der Sorte BCC 173 zu erkennen (Abb. 24). Allerdings wies die Sorte BCC 173 auch hohe Streuungen bei den gesamten Monoterpenemissionen auf.

Unterschiede bei den Sesquiterpenemissionen zwischen den Sorten sind, wie für die GLV-Emissionen, nicht feststellbar (Abb. 24).

3. Ergebnisse



<i>T-Test</i> Kontrolle – Ozon	<i>p-Werte</i> Terpenoidemissionen			
BCC 869	0,005			
BCC 173	0,058			
Varde	0,116			
<i>T-Test</i> Sortenvergleich	<i>p-Werte</i> Gesamtmissionen	<i>p-Werte</i> GLVs	<i>p-Werte</i> Monoterpene	<i>p-Werte</i> Sesquiterpene
Barke - Marthe	0,488	0,422	0,389	0,851
Barke - Varde	0,496	0,784	0,475	0,651
Barke - BCC 1479	0,758	0,732	0,074	0,168
Barke - BCC 869	0,549	0,668	0,018	0,118
Barke - BCC 173	0,936	0,418	0,084	0,038
Marthe - Varde	0,135	0,344	0,204	0,619
Marthe - BCC 1479	0,859	0,379	0,649	0,211
Marthe - BCC 869	0,764	0,527	0,010	0,148
Marthe - BCC 173	0,465	0,939	0,057	0,143
Varde - BCC 1479	0,457	0,915	0,076	0,137
Varde - BCC 869	0,026	0,513	0,030	0,096
Varde - BCC 173	0,300	0,344	0,125	0,082
BCC 1479 - BCC 869	0,983	0,524	0,009	0,843
BCC 1479 - BCC 173	0,781	0,385	0,047	0,628
BCC 869 - BCC 173	0,479	0,489	0,883	0,468

Abb. 24: Vergleich der integralen Emissionsmengen bezogen auf die jeweilige Ozonaufnahmemenge („Ausbeute“) der verschiedenen Gerstensorten nach Ozonexposition. Emissionen induziert durch die Zugabe von ~550 ppb für 60 Minuten. Aufgetragen sind die Gesamt-, GLV-, Monoterpen- sowie Sesquiterpenemissionen bezogen auf die Ozonaufnahmemenge („Ausbeute“). Die Mittelwerte der integralen Emissionen einzelner terpenoider Substanzen der Kontrollpflanzen wurden jeweils von den integralen Emissionen der terpenoiden Substanzen nach Ozonexposition abgezogen ($n=6 \pm SE$). Für Kontrollpflanzen waren nie GLV-Emissionen nachweisbar. Bei Varde besteht auch mit einem p -Wert $p < 0,1$ kein signifikanter Unterschied der Terpenoidemissionen zu den Emissionen unter unbehandelten Bedingungen (vgl. Kapitel 3.5). Dies ist auf die Varianz der Daten innerhalb einer Sorte zurückzuführen. Die Tabelle zeigt die ermittelten p -Werte aus diesem t-Test. Fett unterlegt sind signifikante Unterschiede mit $p < 0,05$.

3.8.1.2 Vergleich der Muster der Mono- und Sesquiterpenemissionen nach Ozonexposition

Betrachtet man statt der Summe der Mono- bzw. Sesquiterpene den Anteil der einzelnen Mono- bzw. Sesquiterpenverbindungen an den gesamten Mono- bzw. Sesquiterpenen so zeigt sich, dass - wie nach MeJA-Exposition - bei den Monoterpenen Linalool und bei den Sesquiterpenen β -Caryophyllen dominiert (Abb. 25a und 25b).

Für die von allen Sorten eher gering emittierten Terpenoide wird deutlich, dass zum Teil bei den modernen Sorten diese Emissionen nicht mehr nachweisbar waren (Abb. 25).

Für die Monoterpene war auffällig, dass bei der modernen Sorte Marthe neben Linalool und β -Ocimen keine weiteren Monoterpene gefunden wurden. Alle anderen untersuchten Sorten emittierten dagegen auch noch andere Monoterpene, wenn auch nur in geringen Mengen. Die Sorte BCC 869 emittierte anteilig eine höhere Menge β -Ocimen als die anderen Sorten (Abb. 25a).

Bei der Sorte Barke war bei den Emissionen der Sesquiterpene ausschließlich β -Caryophyllenemissionen nachweisbar. Auch die moderne Sorte Marthe emittierte neben β -Caryophyllen, nur noch eine geringe Mengen von α -Copaen (Abb. 25b). Der Anteil von β -Elemen der alten Sorte BCC 869 war im Vergleich zu den anderen Sorten deutlich größer. Wie auch nach der MeJA-Exposition hat die Sorte BCC 1479 im Vergleich zu den anderen Sorten einen höheren Anteil an β -Caryophyllen als an Linalool (Abb. 26).

3. Ergebnisse

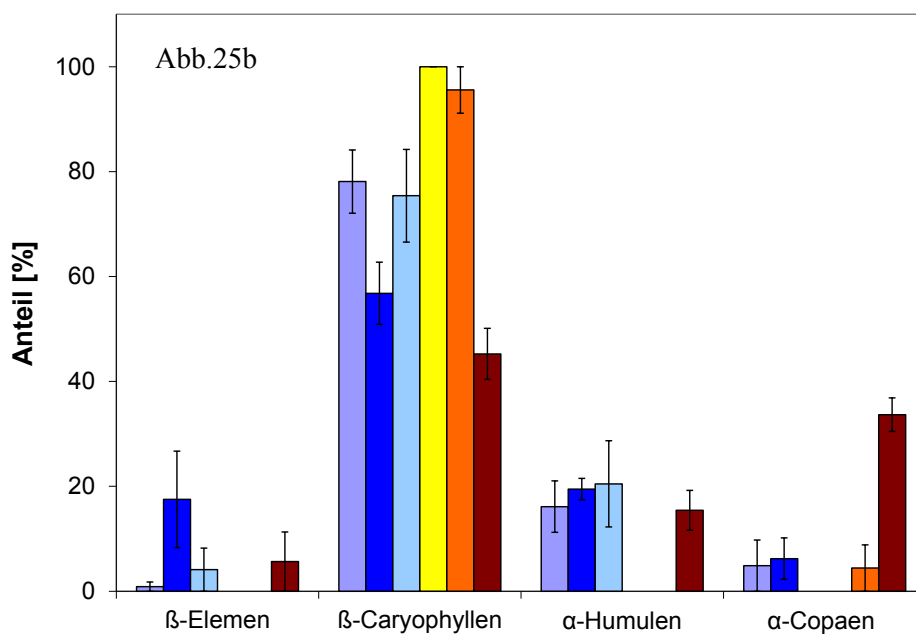
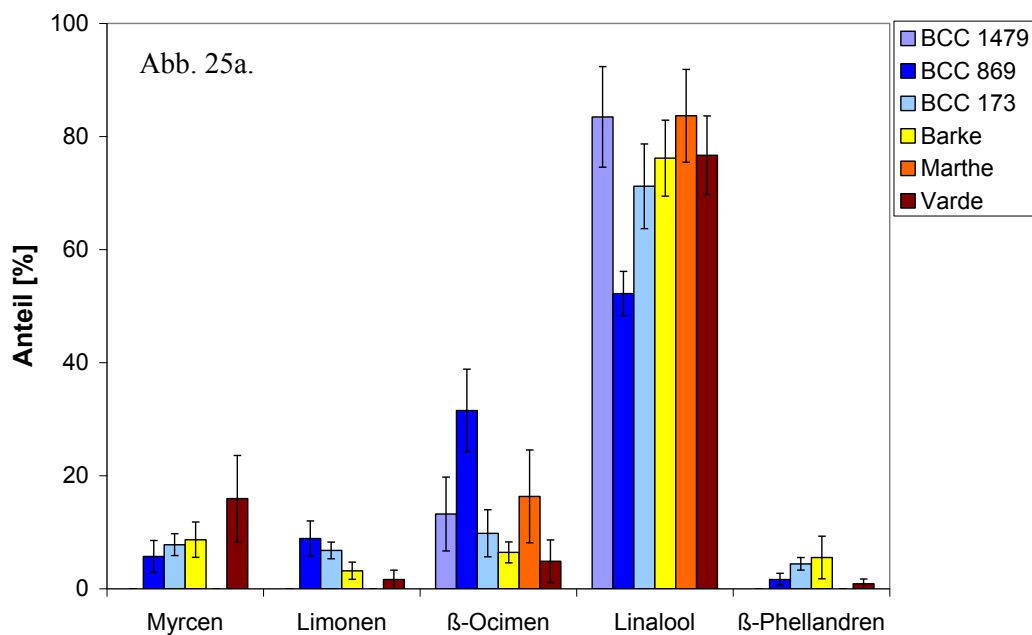


Abb. 25: Muster der ermittelten terpenoiden BVOC nach Ozonexposition

25a: Anteile der jeweiligen Monoterpenemissionen an der Summe aller Monoterpenemissionen

25b: Anteile der jeweiligen Sesquiterpenemissionen an der Summe aller Sesquiterpenemissionen

Zur Bildung der Summe wurden nur die BVOC herangezogen, deren Emissionsraten über der Nachweisgrenze lagen (je Sorte $n=6 \pm SE$).

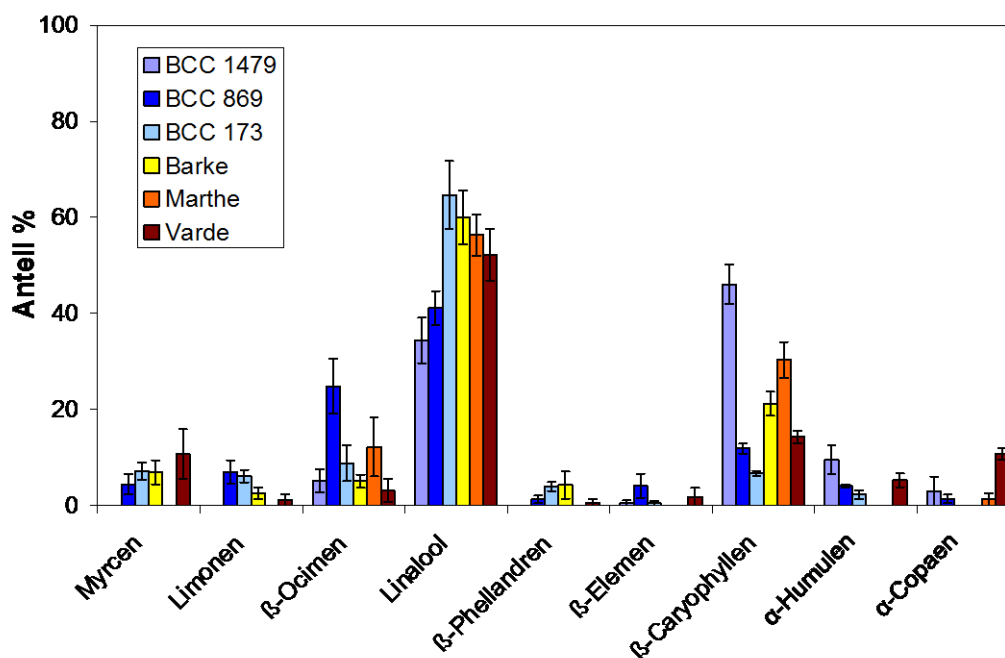


Abb. 26: Anteile der jeweiligen Emissionen an der Summe aller Terpenoidemissionen der verschiedenen Gerstensorten nach Ozonexposition

Zur Bildung der Summe wurden nur die BVOC herangezogen, deren Emissionsraten über der Nachweisgrenze lagen (je Sorte $n=6 \pm SE$).

3.8.2 Vergleich der BVOC-Emissionen nach Ozonexposition mit denen nach einem Pathogenbefall mit *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*

Ozonexposition soll vergleichbare Reaktionen wie nach einem Pathogenbefall auslösen (Sandermann et al., 1998). Eine typische Reaktion bei den meisten Pflanzen ist die Emission von MeSA (z.B. Heiden et al., 1999b). Die untersuchten Gerstensorten zeigten nach Ozonexposition jedoch keine MeSA-Emissionen. Um zu überprüfen, ob eine Simulation eines Pathogenbefalls über Ozonexposition bei Gerste möglich ist, wurde daher ein Pathogenbefall mit dem Bakterium *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* für die Sorten Barke und BCC 173 durchgeführt. Nach Morrissey (2007) verursacht *P. syringae* pv. *syringae* starke Nekrosen sowie eine hohe Induktion von pathogenspezifischen Genen bei Gerste.

Nach der Infiltration mit *P. syringae* pv. *syringae* traten bei beiden Sorten neben Emissionen der GLV und der Terpeneide auch Emissionen an MeSA auf. Diese waren schon sehr früh nach der Infiltration nachweisbar (Abb. 27). Die Emissionen an MeSA machten dabei 15 bis 20% der gesamten Emissionen aus. Auch die Kontrollpflanzen zeigten durch die Infiltration mit $MgCl_2$ MeSA-Emissionen, jedoch waren diese geringer als bei Infiltration mit *P. syringae* pv. *syringae* (Abb. 27). Die MeSA-Emissionen der Kontrollpflanzen machten weniger als 25 % der MeSA-Emissionen nach der Infiltration mit *P. syringae* pv. *syringae* aus.

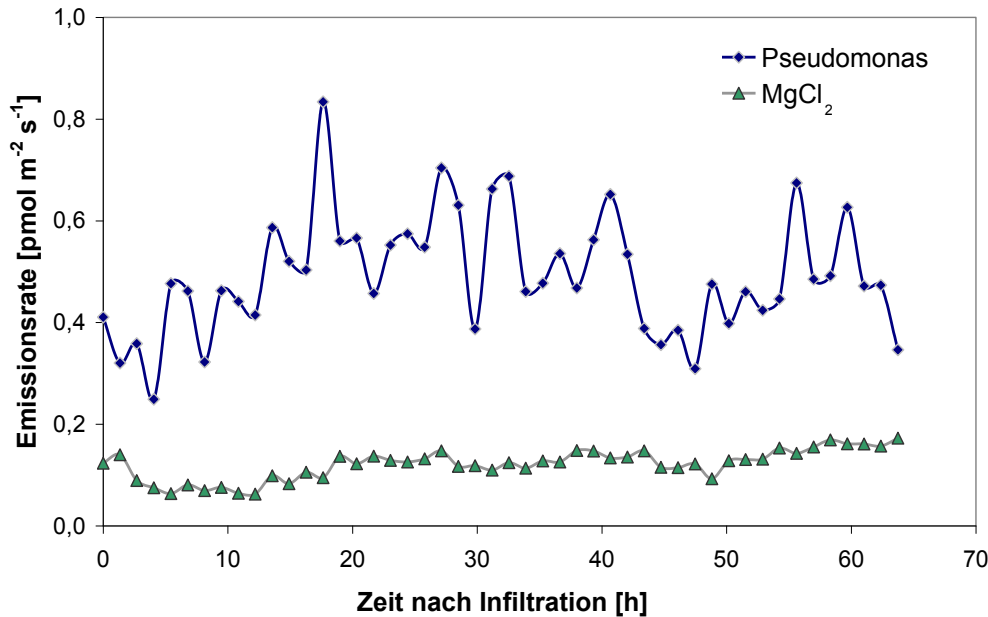


Abb. 27: Vergleich der MeSA-Emissionsraten der modernen Sorte Barke nach Infiltration mit *P. syringae* pv. *syringae* bzw. mit MgCl₂ als Kontrolle (n=1)

Emission an MeSA nach Infiltration mit etwa 1×10^6 cfu/ml *P. syringae* pv. *syringae* („Pseudomonas“, blaue Linie) oder mit 100 mM MgCl₂ („MgCl₂“, grüne Dreiecke, Kontrollpflanze). Auch durch die Infiltration kommt es zur Induktion von MeSA-Emissionen. Die MeSA-Emissionsrate ist durch Infiltration mit *P. syringae* pv. *syringae* im Vergleich zur Infiltration mit MgCl₂ deutlich erhöht.

Nach Ozonexposition wurden die gleichen Terpenoidemissionen gemessen wie nach MeJA-Exposition, jedoch blieben die in anderen Pflanzen beobachteten MeSA-Emissionen aus. Emissionen von MeSA sind jedoch prinzipiell möglich, wie in dieser Arbeit durch Pathogenbefall gezeigt werden konnte (Abb. 27). Zur Überprüfung der Wirkung von MeJA auf die Emissionen wurde ein entsprechender Versuch zur Interaktion der Signalkaskaden von MeSA und MeJA durchgeführt. Hierzu wurden Blätter der Sorte Barke mit *P. syringae* pv. *syringae* infiziert. Nachdem MeSA-Emissionen deutlich zu sehen waren, wurde nach fünf Tagen der Infiltration mit *P. syringae* pv. *syringae* zusätzlich MeJA über die Gasphase appliziert. Die resultierenden Emissionen wurden 24 Stunden lang gemessen. Durch die Zugabe von MeJA stiegen alle Emissionen an BVOC, wie MeSA, Linalool, β -Caryophyllen und (*Z*)-3-Hexenylacetat deutlich an (Abb. 28). Eine MeSA unterdrückende Wirkung von MeJA kann daher ausgeschlossen werden.

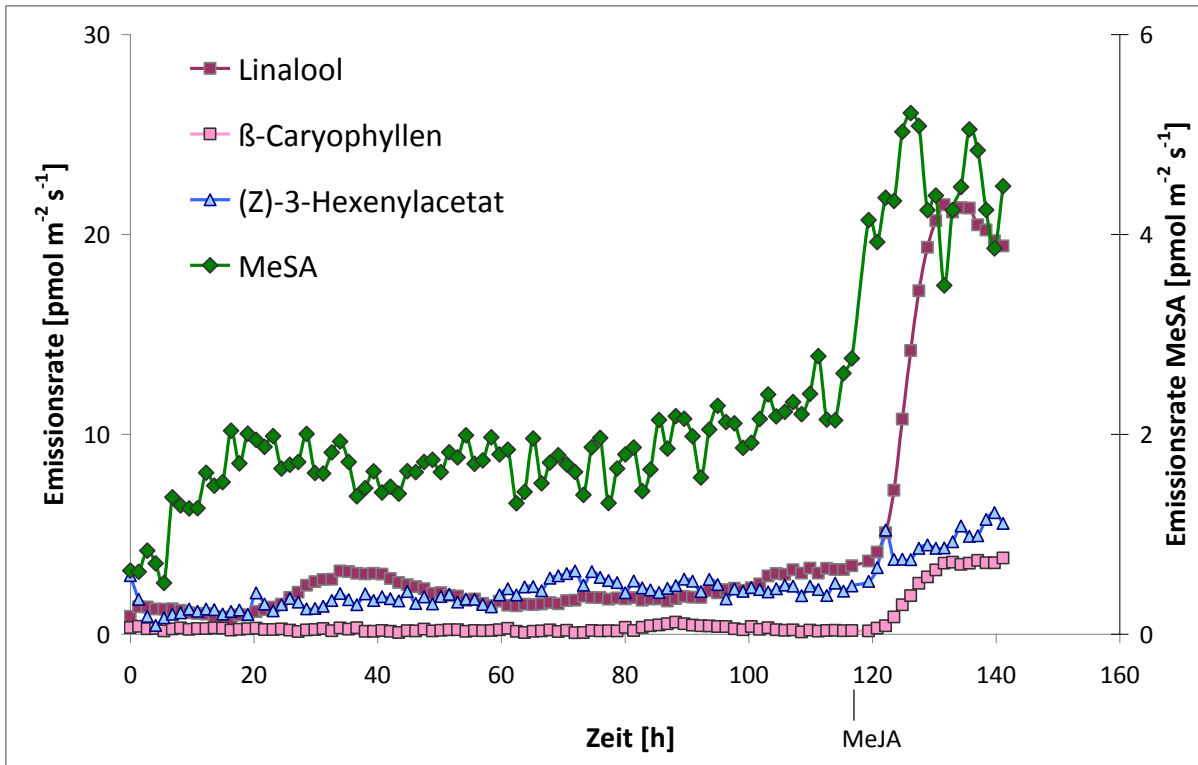


Abb. 28: Einfluss von MeJA auf typische Emissionsraten der modernen Sorte Barke nach Infiltration mit *P. syringae* pv. *syringae*

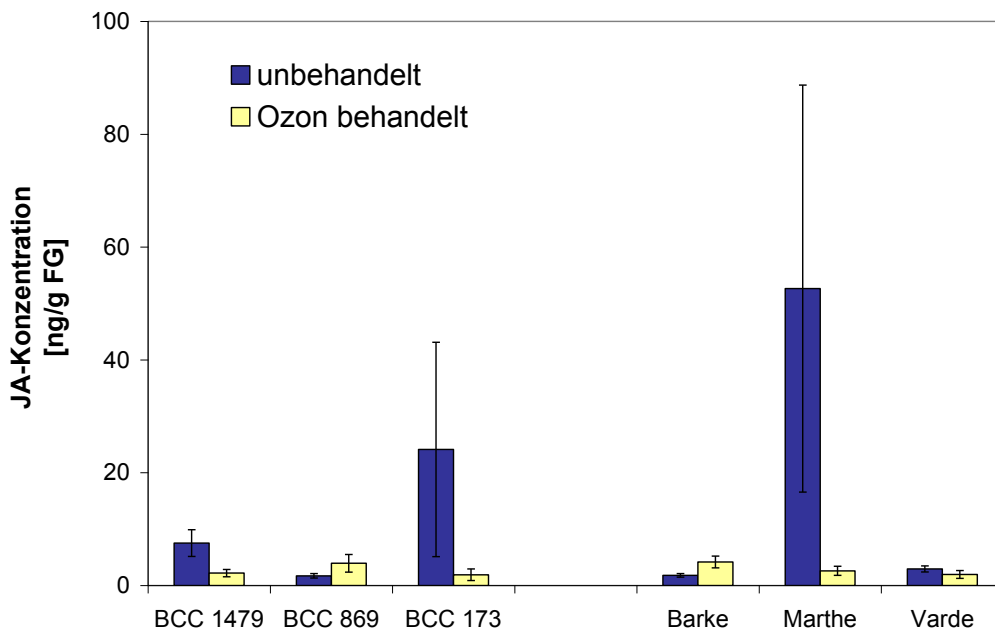
Auf der primären y-Achse sind die Emissionsraten von Linalool, β -Caryophyllen und Hexenylacetat; auf der sekundären y-Achse ist die MeSA-Emissionsrate aufgelistet. Blätter der modernen Sorte Barke wurden ab dem Zeitpunkt $t = 0$ h mit *P. syringae* pv. *syringae* infiltriert und die Emissionen über fünf Tage gemessen. Anschließend ab $t = 119$ h wurde MeJA über die Gasphase appliziert, indem $20 \mu\text{l}$ MeJA auf ein Filterpapier gegeben und in die Pflanzenkammer gehängt wurde.

3.8.3 Endogene Gehalte von JA, SA und SAG nach Ozonexposition

24 Stunden nach der einstündigen Ozonexposition wurden im Blattmaterial der Pflanzen die endogenen JA-, SA- und SAG-Gehalte bestimmt. Als Kontrollpflanzen wurden dieselben Pflanzen genutzt, welche auch als Kontrollpflanzen für die MeJA-Exposition dienten. Dies bedeutet, dass es sich bei den Kontrollpflanzen, um die Pflanzen handelt, die nach einer eintägigen Akklimation an die Pflanzenkammerbedingungen für weitere 48 Stunden ohne Exposition in der Pflanzenkammer standen (siehe Tab. 5). Es wurden aus zeitlichen Gründen keine Versuche mit Kontrollpflanzen aller Sorten durchgeführt, die für 24 Stunden in der Kammer standen. Voraussetzung dafür war, dass die JA- und SAG-Gehalte der Kontrollpflanzen nach 24 und 48 Stunden keine großen Unterschiede zueinander aufwiesen (vgl. Abb. 29 und 30).

3.8.3.1 Endogener JA-Gehalt drei und 24 Stunden nach Ozonexposition

Der JA-Gehalt wurde 24 Stunden nach der einstündigen Ozonexposition im Vergleich zu den Kontrollpflanzen nicht beeinflusst (Abb. 29).



<i>T-Test Kontrolle - Ozon Vergleich</i>	<i>p-Werte</i>	<i>p < 0,05</i>
BCC 1479	0,076	n.s.
BCC 869	0,223	n.s.
BCC 173	0,296	n.s.
Barke	0,073	n.s.
Marthe	0,224	n.s.
Varde	0,289	n.s.

Abb. 29: endogener JA-Gehalt [ng/g FG] unter unbehandelten Bedingungen (blaue Balken) sowie 24 Stunden nach einer einstündigen Ozonexposition (gelbe Balken) für $n=6 \pm SE$

Alle Pflanzen wurden zunächst für einen Tag an die Pflanzenkammerbedingungen akklimatisiert. Die Kontrollpflanzen wurden anschließend nach weiteren 48 Stunden und die ozonexponierten Pflanzen 24 Stunden nach der einstündigen Ozonexposition geerntet. Die Tabelle zeigt die aus einem durchgeführten t-Test ermittelten p-Werte aus dem Vergleich der JA-Gehalte unter unbehandelten Bedingungen (Kontrolle) sowie nach Ozonexposition (Ozon). P-Werte $> 0,05$ sind nicht signifikant (n.s.).

Dies ist gegensätzlich zu dem Effekt der MeJA-Exposition auf die JA-Gehalte. Nach MeJA-Exposition wurden die JA-Gehalte stark erhöht (vgl. Abb. 19). Da es sich bei der Ozonexposition im Gegensatz zur MeJA-Applikation um eine Pulsapplikation handelt, ist hier der Messzeitpunkt für die Bestimmung von Signalmolekülen von großer Bedeutung. Der Messzeitpunkt von 24 Stunden könnte demnach für die Bestimmung der endogenen Signalstoffe zu spät sein. Daher wurden weitere Ozonexpositionsversuche mit allen Pflanzen

durchgeführt, wobei die Pflanzen drei Stunden nach der einstündigen Ozonexposition geerntet wurden. Tabelle 15 zeigt den Vergleich der JA-Gehalte drei und 24 Stunden nach der einstündigen Ozonexposition. Die JA-Gehalte drei Stunden nach der einstündigen Ozonexposition wurden für jede Sorte mit $n=1$ und die JA-Gehalte 24 Stunden nach der einstündigen Ozonexposition mit $n=6$ bestimmt. Bis auf die Sorte Barke sind für alle Sorten drei Stunden nach der Ozonexposition die JA-Gehalte höher als die der Kontrollpflanzen (Tab. 15). Trotz $n=1$ können diese Werte daher als gesichert angenommen werden. Jedoch sind die JA-Gehalte nach Ozonexposition allgemein sehr gering. Um dies zu verdeutlichen wurden in der Tabelle 15 die JA-Gehalte nach 48-stündiger MeJA-Exposition ergänzt.

Die JA-Gehalte, 48 Stunden nach Einbau der Kontrollpflanzen in die Pflanzenkammer, scheinen auf die, 24 Stunden nach der Ozonexposition, übertragbar zu sein. Die JA-Gehalte der Kontrollpflanzen zu früheren Messzeitpunkten (nach 28 Stunden) waren vergleichbar groß wie die der Kontrollpflanzen zum späteren Messzeitpunkt (nach 72 Stunden) (siehe Tab. 15). Demnach sind die endogenen JA-Gehalte allgemein so gering, dass der verursachte Fehler durch die JA-Gehalte der Kontrollpflanzen, welche 48 Stunden nach dem Einbau in die Pflanzenkammer und nicht nach 24 Stunden geerntet wurden, vernachlässigbar klein ist.

Tab. 15: endogene JA-Gehalte [ng/g FG] drei und 24 Stunden (h) nach der einstündigen Ozonexposition

Nachdem die Pflanzen für einen Tag an die Pflanzenkammerbedingungen akklimatisiert waren, erfolgte die Ernte der Kontrollpflanzen nach weiteren vier (entspricht der Zeit drei Stunden nach der einstündigen Ozonexposition) bzw. 48 Stunden und die der ozonexponierten Pflanzen drei bzw. 24 Stunden nach der einstündigen Ozonexposition. Die Bestimmung der JA-Gehalte zum früheren Messzeitpunkt (3h) erfolgte für jede Sorte einmalig ($n=1$). Die JA-Gehalte zum späteren Messzeitpunkt (24h) wurden mit $n=6$ für jede Sorte bestimmt. Es wurden die JA-Gehalte nach 48-stündiger MeJA-Exposition ergänzt ($n=6$; siehe Abb. 19).

	JA-Gehalte				
	3 h nach Ende der Ozonexposition ($n=1$)	4 h Kontroll- pflanzen ($n=1$)	24 h nach Ende der Ozonexposition ($n=6$)	48 h Kontroll- pflanzen ($n=6$)	48 h nach der MeJA- Exposition ($n=6$)
BCC 1479	15,63	0,67	2,21	7,52	198
BCC 869	24,09	0,62	3,94	1,72	327
BCC 173	16,65	0,35	1,91	24,12	235
Barke	5,65	1,40	4,17	1,80	152
Marthe	14,66	0,38	2,60	52,63	483
Varde	26,83	1,17	1,95	2,94	587

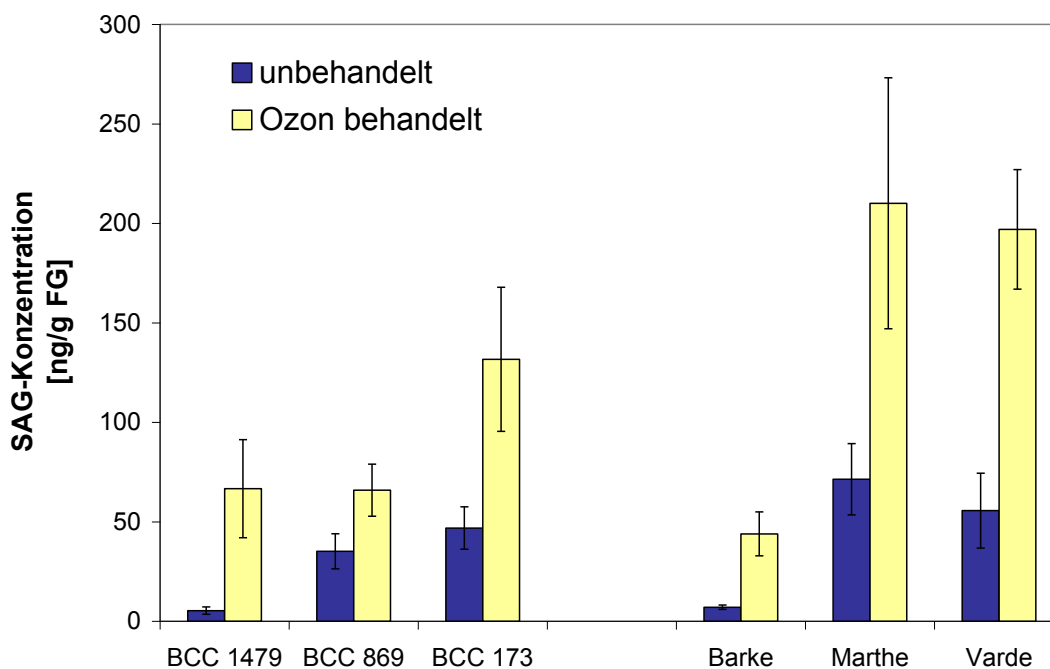
3.8.3.2 Endogene SA- und SAG-Gehalte drei und 24 Stunden nach Ozonexposition

Neben dem endogenen JA-Gehalt wurde nach der Ozonapplikation der freie SA- und SAG-Gehalt untersucht. Freie SA konnte bei keiner Gerstensorte weder nach 3 Stunden noch nach 24 Stunden detektiert werden. Um auszuschließen, dass freie SA nicht schon gebunden als SAG vorliegt, wurde auch dieser Gehalt bestimmt (Abb. 30 und Tab. 16). SAG konnte bei allen Sorten nachgewiesen werden, wobei die SAG-Gehalte durch die Ozonexposition erhöht wurden (Abb. 30 und Tab. 16). Die SAG-Gehalte der Kontrollpflanzen, welche 48 Stunden nach einer vorangegangenen Akklimation von einem Tag geerntet wurden machten durchschnittlich 30% zu den SAG-Gehalten der Pflanzen aus, welche 24 Stunden nach der einstündigen Ozonexposition geerntet wurden. Bei der Sorte Marthe hat die Ozonexposition keinen signifikanten Effekt auf die endogene SAG-Konzentration. Die Sorte Varde besitzt einen höheren SAG-Gehalt als die Sorten Barke, BCC 1479 und BCC 869 (Abb. 30).

Die Untersuchung der SAG-Gehalte zu einem früheren Messzeitpunkt zeigt ausschließlich für die Sorte Barke einen deutlich höheren SAG-Gehalt drei Stunden nach der Ozonexposition als 24 Stunden nach der Ozonexposition (Tab. 16). Für BCC 1479 ist kein Unterschied der SAG-Gehalte durch die verschiedenen Messzeitpunkte gegeben. Die anderen Sorten zeigen eine Erhöhung der SAG-Gehalte zu dem späteren Messzeitpunkt nach der Ozonexposition (Tab. 16). Es ist wiederum zu beachten, dass die SAG-Gehalte drei Stunden nach der einstündigen Ozonexposition einmal je Sorte gemessen wurden. Um jedoch die Erhöhung der SAG-Gehalte besonders 24 Stunden nach der Ozonexposition (n=6) zu verdeutlichen, wurden in der Tabelle 16 die SAG-Gehalte nach 48-stündiger MeJA-Exposition ergänzt.

Auch die Bestimmung der SAG-Gehalte der Kontrollpflanzen für die Pflanzen, welche 24 Stunden nach der einstündigen Ozonexposition geerntet wurden, erfolgte mit den Kontrollpflanzen, die 48 Stunden ohne exogen applizierten Stress in der Pflanzenkammer standen (zuvor immer für einen Tag an Bedingungen der Pflanzenkammer akklimatisiert). Die SAG-Gehalte dieser Kontrollpflanzen liegen in einem ähnlichen Bereich wie die SAG-Gehalte der Kontrollpflanzen, welche zu einem früheren Zeitpunkt (4h) bestimmt wurden (Tab. 16). Es ist daher anzunehmen, dass sich die SAG-Gehalte der Kontrollpflanzen nicht deutlich unterscheiden. Daher konnten auch für die Bestimmung der SAG-Gehalte Kontrollpflanzen verwendet werden, die für 48 Stunden (nach einer eintägigen Adaptation an die Pflanzenkammerbedingungen) in der Pflanzenkammer standen.

3. Ergebnisse



<i>T-Test Kontrolle – Ozon Vergleich</i>	<i>p-Werte</i>	<i>p < 0,05</i>	<i>p < 0,1</i>
BCC 1479	0,06	n.s.	*
BCC 869	0,07	n.s.	*
BCC 173	0,07	n.s.	*
Barke	0,02	*	*
Marthe	0,08	n.s.	*
Varde	0,004	*	*
<i>T-Test alte Sorten Vergleich (Ozon)</i>			
BCC 1479 - BCC 869	0,87	n.s.	n.s.
BCC 1479 - BCC 173	0,17	n.s.	n.s.
BCC 869 - BCC 173	0,12	n.s.	n.s.
<i>T-Test moderne Sorten Vergleich (Ozon)</i>			
Barke - Marthe	0,45	n.s.	n.s.
Barke - Varde	0,003	*	*
Marthe - Varde	0,86	n.s.	n.s.
<i>T-Test moderne - alte Sorten Vergleich (Ozon)</i>			
Barke - BCC 1479	0,43	n.s.	n.s.
Barke - BCC 869	0,24	n.s.	n.s.
Barke - BCC 173	0,06	n.s.	*
Marthe - BCC 1479	0,08	n.s.	*
Marthe - BCC 869	0,07	n.s.	*
Marthe - BCC 173	0,31	n.s.	n.s.
Varde - BCC 1479	0,008	*	*
Varde - BCC 869	0,005	*	*
Varde - BCC 173	0,20	n.s.	n.s.

Abb. 30: endogener SAG-Gehalt unter unbehandelten Bedingungen (blaue Balken) sowie 24 Stunden nach einer einstündigen Ozonexposition (gelbe Balken) mit $n=6 \pm SE$

Nachdem die Pflanzen für einen Tag an die Pflanzenkammerbedingungen akklimatisiert waren, wurden die Kontrollpflanzen nach weiteren 48 Stunden und die ozonexponierten Pflanzen wurden 24 Stunden nach einer einstündigen Ozonexposition geerntet. Die Tabelle zeigt die ermittelten p-Werte aus einem durchgeführten t-Test mit zwei p-Werten ($p < 0,05$; $p < 0,1$). Ein signifikanter Unterschied ist mit einem * und ein nicht-signifikanter Unterschied mit n.s. gekennzeichnet.

Tab. 16: endogene SAG-Gehalte drei und 24 Stunden (h) nach der einstündigen Ozonexposition

Nachdem die Pflanzen für einen Tag an die Pflanzenkammerbedingungen akklimatisiert waren, erfolgte die Ernte der Kontrollpflanzen nach weiteren 4 (entspricht der Zeit drei Stunden nach der einstündigen Ozonexposition) bzw. 48 Stunden und die der ozonexponierten Pflanzen 3 bzw. 24 Stunden nach der einstündigen Ozonexposition. Die Bestimmung der SAG-Gehalte zum früheren Messzeitpunkt (3h) erfolgte für jede Sorte einmalig (n=1). Die SAG-Gehalte zum späteren Messzeitpunkt (24h) wurden mit n=6 für jede Sorte bestimmt. Es wurden die SAG-Gehalte nach 48-stündiger MeJA-Exposition ergänzt (n=6; siehe Abb. 22).

	SAG-Gehalte				
	3 h nach Ende der Ozonexposition (n=1)	4 h Kontroll- pflanzen (n=1)	24 h nach Ende der Ozonexposition (n=6)	48 h Kontroll- pflanzen (n=6)	48 h nach der MeJA- Exposition (n=6)
BCC 1479	95	56	67	5	7
BCC 869	51	32	66	35	28
BCC 173	48	71	132	47	24
Barke	179	64	44	7	11
Marthe	54	18	210	71	26
Varde	71	96	197	56	27

3.8.4 Endogene Gehalte von JA, SA und SAG nach einem Pathogenbefall am Beispiel der Sorte BCC 173

Zum Vergleich mit den Ergebnissen nach Ozonexposition wurden am Beispiel der Sorte BCC 173 die endogenen JA-, SA- und SAG-Gehalte aus Blattproben untersucht, welche mit *P. syringae* pv. *syringae* infiltriert wurden (n=1). Die Bestimmung der endogenen Signalstoffe erfolgte fünf Tage nach der Pathogeninfiltration.

Der JA-Gehalt lag durch die Infiltration im Bereich von 6 ng/g FG (2,4 ng/g FG nach Infiltration mit MgCl₂, Kontrolle). Im Vergleich zu den JA-Gehalten 24 Stunden nach der Ozonexposition bestehen demnach keine großen Unterschiede (vgl. Abb. 29 und Tab. 15).

Auch nach der Infiltration mit *P. syringae* pv. *syringae* konnte für die Sorte BCC 173 keine freie SA nachgewiesen werden. Der SAG-Gehalt wurde deutlich um mehr als das Zehnfache im Vergleich zu dem SAG-Gehalt der Kontrollpflanze erhöht (6133 ng/g FG; 495 ng/g FG nach Infiltration mit MgCl₂, Kontrolle). Auch im Vergleich zu den SAG-Gehalten der Pflanzen nach Ozonexposition ist ein deutlich höherer SAG-Gehalt nach dem Pathogenbefall zu erkennen (vgl. Abb. 30).

3.8.5 Einfluss der Ozonexposition auf die Genexpression

Es wurden Genexpressionsanalysen von Pflanzen durchgeführt, die drei und 24 Stunden nach der einstündigen Ozonexposition geerntet wurden (Tab. 17). Drei Stunden nach Ende der Ozonexposition wurde jede Sorte mit $n=1$ bestimmt. Die Bestimmung der Genexpression 24 Stunden nach Ende der Ozonexposition erfolgte ausschließlich für die Sorten BCC 1479 und Barke mit je zwei Wiederholungen ($n=2$). Die Kontrollpflanzen dieser Sorten standen nachdem sie für einen Tag an die Kammerbedingungen akklimatisiert waren für weitere 25 Stunden in der Pflanzenkammer (siehe Tab. 5).

Für alle Pflanzen war drei Stunden nach der einstündigen Ozonexposition die AOS2- und AOC-Expression durch die Ozonexposition erhöht (Tab. 17b) und sank 24 Stunden nach der Ozonexposition ab (Tab. 18b). Es sind jedoch aufgrund der Variabilität der Ergebnisse drei Stunden nach der Ozonexposition keine Unterschiede zwischen alten und modernen Sorten erkennbar (Tab. 17b). Die LOX-100 und DXR wurden durch die Ozonexposition bei beiden Messzeitpunkten kaum bis nicht induziert (Tab. 17b und 18b). Bei dem PR-1b Protein zeigten die alten Sorten eine höhere Induktion durch die Ozonexposition als die modernen Sorten (Tab. 17b; Tab. 18b). Die Expression von LTP4, TH, JRG5, JIP23 wurde durch die Ozonexposition sowohl drei als auch 24 Stunden nach der Ozonexposition gering induziert (Tab. 17b und 18b). Für die Sorte Barke ist jedoch zum späteren Messzeitpunkt nach Ende der Ozonexposition eine deutlich erhöhte TH-Expression zu erkennen (Tab. 18b).

Bei der Sorte Varde wurde drei Stunden nach der Ozonexposition die JIP23-Expression im Gegensatz zu den anderen Sorten erhöht (Tab. 17b). Jedoch erfolgte die Expressionsmessung nur einmal und die Ergebnisse können daher nicht als signifikant eingestuft werden.

Alle untersuchten Gene wiesen eine geringe basale Expression auf. Diese war bei allen Gerstensorten vergleichbar groß (Tab. 17a und 18a).

Zusätzlich wurden in der Tabelle 18b die Ergebnisse der Expressionsanalyse von Blattmaterial der Sorte BCC 173 aufgetragen, welches mit *P. syringae* pv. *syringae* infiltriert worden war. Als Kontrolle dienten Pflanzen, die mit $MgCl_2$ infiltriert wurden. Die Pflanzen wurden fünf Tage nach der Infiltration geerntet. Die Genexpression von LTP4, TH und JRG5 der Sorte BCC 173 zeigte durch die Infiltration mit *P. syringae* pv. *syringae* eine Induktion. Auffällig ist, dass PR1-b-Genexpression sehr gering ist (Tab. 18b). Es wurde von einem Vergleich der Basalexpression der Gene verschiedener Sorten mit der Basalexpression der Gene der Sorte BCC 173 „Pseudomonas“ abgesehen, da ausschließlich die Genexpressionen von dieser Sorte nach Infiltration mit *P. syringae* pv. *syringae* untersucht wurden.

3. Ergebnisse

Tab. 17a: Basalexpression der Gene normiert auf die der Kontrollpflanze Barke (Kontrollpflanzen für Versuche drei Stunden nach Ozonexposition)

Vergleich der basalen Expression der verschiedenen Gene der Kontrollpflanzen bezogen auf die der Kontrollpflanze Barke (je ein biologisches und drei methodische Replikate). Fehlergrenzen sind daher nicht sinnvoll. Grau unterlegt sind die Landsorten, gelb die modernen Hohertragssorten. Analysiert mit qRT-PCR. Auswertung mit REST2009 Software und mit GAPDH und Tubulin als Referenzgene.

	LOX-100	AOS2	AOC	DXR	PR1-b	LTP4	TH	JRG5	JIP23
BCC 1497	3	1	1	1	0,07	2	0,33	1	1
BCC 869	1	1	1	1	0,13	1	5	2	1
BCC 173	3	1	2	1	0,04	0,02	1	1	2
Barke	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Marthe	1	1	1	1	0,33	1	8	2	1
Varde	1	1	1	1	0,24	1	1	2	1

Tab. 17b: x-fache Induktion der Gene bezogen auf Kontrollpflanzen drei Stunden nach der einstündigen Ozonexposition

Grau unterlegt sind die Landsorten, gelb die modernen Hohertragssorten. Je Sorte ein biologisches und drei methodische Replikate. Fehlergrenzen sind daher nicht sinnvoll. Analysiert mit qRT-PCR. Auswertung mit REST2009 Software und mit GAPDH und Tubulin als Referenzgene.

	LOX-100	AOS2	AOC	DXR	PR1-b	LTP4	TH	JRG5	JIP23
BCC 1497	1	16	49	1	25	1	13	2	4
BCC 869	2	27	104	1	15	1	2	1	2
BCC 173	1	6	33	1	114	33	3	1	1
Barke	2	12	74	1	0,03	0,02	1	1	2
Marthe	1	11	72	1	4	1	2	0,38	2
Varde	2	23	84	1	11	0,03	2	1	14

Tab. 18a: Basalexpression der Gene normiert auf die der Kontrollpflanzen Barke (Kontrollpflanzen für Versuche 24 Stunden nach Ozonexposition)

Vergleich der basalen Expression der verschiedenen Gene der Kontrollpflanzen BCC 1479 (grau unterlegt) bezogen auf die der Kontrollpflanzen Barke (gelb unterlegt) (je zwei biologisches und drei methodische Replikate). Fehlergrenzen sind daher nicht sinnvoll. Kontrollpflanzen standen 25 Stunden ohne Exposition in der Pflanzenkammer (entspricht 24 Stunden nach einer einstündigen Ozonexposition). Analysiert mit qRT-PCR. Auswertung mit REST2009 Software und mit GAPDH und Tubulin als Referenzgene.

Basal-expression	LOX-100	AOS2	AOC	DXR	PR1-b	LTP4	TH	JRG5	JIP23
BCC 1497	2,9	0,8	0,8	1,2	0,1	1	1,2	1,9	1,1
Barke	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Tab. 18b: x-fache Induktion der Gene bezogen auf die Kontrollpflanzen 24 Stunden nach der einstündigen Ozonexposition

Grau unterlegt ist die Landsorte BCC 1479, gelb die moderne Hohertragsorte Barke. Je Sorte zwei biologische und drei methodische Replikate. Fehlergrenzen sind daher nicht sinnvoll. Kontrollpflanzen standen 25 Stunden ohne Exposition in der Pflanzenkammer (entspricht 24 Stunden nach einer einstündigen Ozonexposition).

Kursiv aufgetragen ist die Expressionsstärke der Gene der Sorte BCC 173, die mit *P. syringae* pv. *syringae* infiziert wurde (n=1; Erntezeitpunkt fünf Tage nach Infiltration; Kontrollpflanze mit MgCl₂ infiziert).

Analysiert mit qRT-PCR. Auswertung mit REST2009 Software und mit GAPDH und Tubulin als Referenzgene.

x-fache Induktion	LOX-100	AOS2	AOC	DXR	PR1-b	LTP4	TH	JRG5	JIP23
BCC 1497	2	4	3	1	9	1	0,2	0,03	2
Barke	2	5	3	1	5	1	22	5	2
<i>BCC 173 Pseudo-monas</i>	<i>1</i>	<i>1</i>	<i>1</i>	<i>1</i>	<i>0,03</i>	<i>37</i>	<i>16</i>	<i>7</i>	<i>1</i>

4. Diskussion

Ein zentrales Ziel bei der Domestizierung von Kulturpflanzen ist die Steigerung des Ertrages, also die verstärkte Investition des pflanzlichen, fixierten Kohlenstoffs in Biomasse, Früchte und Samen. Diese Optimierung des Kohlenstoffflusses hat jedoch möglicherweise eine Reduzierung sowohl der konstitutiven als auch insbesondere der induzierbaren Abwehrmechanismen zur Folge (Benrey et al., 1998; Gols et al., 2008). Ein wesentlicher Bestandteil der Abwehrmechanismen ist die Induktion der Synthese spezifischer sekundärer Inhaltstoffe, die etwa als Bitterstoffe und Toxine gegen Herbivore und Pathogene oder als Lockstoffe für Prädatoren und Parasitoide dienen können. In dieser Arbeit sollte daher ein möglicher Effekt der Domestizierung insbesondere auf die für die pflanzlichen Abwehrmechanismen wichtigen Elemente des Sekundärstoffwechsels untersucht werden.

Für einen Vergleich der pflanzlichen Abwehrmechanismen wurden drei alte Landsorten und drei moderne Hohertragsorten von Gerste ausgewählt (Tab. 4), da zwischen diesen Sorten eine Rückkreuzung der Abwehreigenschaften zur Verbesserung der Resistenz moderner Hohertragsorten möglich ist (Kapitel 1.6). Die pflanzlichen Abwehrmechanismen wurden im Wesentlichen anhand der BVOC-Emissionen untersucht, welche sich im Hinblick auf ihre Biosynthese aus unterschiedlichen Wegen des Sekundärstoffwechsels ableiten (Kapitel 1.4). In Untersuchungen von Loughrin et al. (1995) konnte gezeigt werden, dass Pflanzen der Wildform von Baumwolle wesentlich mehr BVOC emittieren als die Kulturpflanzen und dass die Wildpflanzen weniger von den Schädlingen befallen werden. Inwieweit diese biotische Interaktion mit den Baumwollpflanzen durch die vermehrt emittierten BVOC-Mengen oder durch andere Sekundärmetabolite der Wildformen bedingt ist, konnte in den Untersuchungen von Loughrin et al. (1995) nicht beantwortet werden.

Die Untersuchung der BVOC-Emissionen hat den Vorteil, dass es sich um eine nicht-invasive Methode handelt und dass die pflanzlichen Abwehrmechanismen über einen längeren Zeitraum verfolgt werden können. BVOC-Emissionen wurden mittels der abiotischen Stressoren MeJA und Ozon induziert, da die Applikationen dieser Stressoren im Vergleich zu biotischen Stressoren deutlich reproduzierbarer sind, was eine wesentliche Voraussetzung für den quantitativen Vergleich des Einflusses von Stress auf die verschiedenen Gerstensorten ist (Kapitel 1.3). Anhand systematischer Unterschiede der Emissionen kann auf eine möglicherweise reduzierte Pflanzenabwehr der modernen Sorten geschlossen werden. Anschließend können weitergehende Versuche zur Aufklärung möglicher Ursachen hierfür in den betroffenen Stoffwechselwegen erfolgen.

4.1 Reaktionen der verschiedenen Gerstensorten auf MeJA-Exposition

4.1.1 Untersuchung der Emissionen der 31 Gerstensorten (Screening-Experiment)

In dieser Arbeit wurden zunächst die Emissionen von 31 verschiedenen Gerstensorten (Tab. 3) analysiert. Es zeigte sich, dass alle 31 Gerstensorten die gleichen BVOC emittierten. Die Emissionen des Monoterpens Linalool sowie des Sesquiterpens β -Caryophyllen sind bei allen 31 Gerstensorten die Hauptemissionen (Tab. 8 und 9). Die anderen Substanzen werden in sehr geringen Mengen emittiert (Tab. 8 und 9) und die Signale liegen nahe an der Nachweisgrenze. Daher sind Unterschiede im Muster für diese Emissionen zwischen den einzelnen Gerstensorten nur schwer zu bestimmen.

Trotz konstanter äußerer Bedingungen (wie Licht, Temperatur, Anzuchtbedingungen) bestand eine hohe Variabilität der Emissionsstärke zwischen zwei Wiederholungen mit einer Gerstensorte (Tab. 9). So zeigten die Sorten HOR 1804 und HOR 930 in einem Versuch eine vergleichbare Gesamtemissionsmenge, in einem anderen Versuch konnten sich die emittierten BVOC-Mengen aber um den Faktor 128 unterscheiden (Tab. 9). Um statistisch belastbare Aussagen möglich zu machen war also eine deutlich höhere Anzahl an Wiederholungen mit Pflanzen derselben Sorte nötig.

4.1.2 Detaillierte Untersuchung der Reaktion von alten und modernen Gerstensorten auf MeJA-Exposition (6 Sorten mit je 6 Wiederholungen)

Aufgrund der hohen Variabilität der Emissionen und der dadurch erforderlichen hohen Anzahl an Wiederholungen musste die Auswahl der zu analysierenden Gerstensorten auf insgesamt sechs eingeschränkt werden. Es wurden drei Hohertragsorten (Barke, Marthe, Varde) ausgewählt, die heute noch angebaut werden (Bundessortenamt, 2011). Diese modernen Sorten wurden mit drei alten Landsorten (BCC 1479, BCC 869, BCC 173) verglichen, die eine gute Vermehrungsmöglichkeit sowie Keimfähigkeit aufwiesen. Alle Sorten, welche sowohl zwei- als auch sechszeilige Sorten umfassten, besitzen eine unterschiedliche Anfälligkeit für Mehltau. Diese sechs Sorten wurden mit jeweils sechs Wiederholungen auf ihre Emissionen nach MeJA- bzw. Ozonexposition untersucht.

Die in dieser Arbeit angewendete MeJA-Exposition führte bei allen Gerstensorten ausschließlich zu Terpenoidemissionen (Abb. 9a und 15). Emissionen von GLVs und aromatischen Verbindungen waren nicht nachweisbar (Abb. 9a).

4.1.2.1 Nachweis von Terpenoidemissionen während MeJA-Exposition

Alle sechs Sorten emittierten nach MeJA-Exposition die gleichen BVOC, wobei ausschließlich Terpene nachweisbar waren (Kapitel 3.7.1.1; Tab. 11; Abb. 15). Dabei wurden von allen Sorten die gleichen Monoterpene, Sesquiterpene sowie das C₁₆ Homoterpene TMTT emittiert (Abb. 16).

Die Züchtung in Richtung Hohertrag hat sich demnach nicht auf die Emissionsmuster der Gerste ausgewirkt. Allerdings war ein Effekt auf die Emissionsstärke zu erkennen. Alle untersuchten alten Landsorten zeigten nach MeJA-Exposition höhere Emissionsraten als die modernen Hohertragsorten (Abb. 15). Dies konnte sowohl für die Monoterpene- als auch für die Sesquiterpenemissionen nachgewiesen werden (Abb. 16). Vergleichbare Studien in Mais zeigten ebenfalls keinen züchterischen Einfluss auf das Emissionsmuster. Jedoch zeigen die Pflanzen der Wildform der Gattung *Zea* keine Veränderung der stressinduzierten Emissionsstärke gegenüber den Kultursorten (Gouinguéné et al., 2001). Offensichtlich sind bei der Züchtung von Mais und Gerste also unterschiedliche Biosynthese- und Regulationselemente von der Optimierung der Kohlenstofffixierung in Biomasse und Ertrag betroffen.

Aufgrund vergleichbar großer Netto-Photosyntheseraten sowie stomatärer Öffnungsweiten bei allen hier untersuchten Gerstensorten nach 48-stündiger MeJA-Exposition (Abb. 14a; Kapitel 3.6), kann daraus ausgeschlossen werden, dass die unterschiedlichen Emissionsmengen nicht durch unterschiedlich stark geöffnete Stomata ausgelöst werden. Vielmehr ist davon auszugehen, dass die Unterschiede der Emissionsstärken zwischen den Sorten auf einer unterschiedlich starken Induktion dieser Emissionen beruhen. Die in allen drei untersuchten alten Gerstensorten gefundenen erhöhten Terpenoidemissionen als Reaktion auf MeJA-Exposition sind daher erste Hinweise darauf, dass die Induktion des Sekundärstoffwechsels als Reaktion auf biotischen Stress in modernen Sorten reduziert ist.

In dieser Arbeit wurden die Photosyntheseraten immer unter bestimmten Bedingungen (Temperatur 22 °C, Lichtintensität: Höhe des Bodens 700 / Mitte Pflanze 900 / Oberkante der Pflanzenkammer 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) verglichen. Unter diesen Bedingungen machen die Emissionen bei Gerste nur einen geringen Anteil zu den Photosyntheseraten aus [pmol (Emissionsrate) zu μmol (Photosyntheserate); Abb. 15 und Abb. 14a]. Demnach kann davon ausgegangen werden, dass der Ertrag der modernen Sorten auch nach Rückzüchtung stärkerer Terpenoidemissionsantworten nur gering beeinträchtigt würde.

4.1.2.1.a) Muster und mögliche abwehrrrelevante Wirkung der Terpenoidemissionen

Wie anhand der Abbildung 17 zu erkennen, emittieren alle Gerstensorten hauptsächlich das Monoterpen Linalool und das Sesquiterpen β -Caryophyllen. Auch Piesik et al. (2011) konnten für Gerste nach einer Infektion mit drei verschiedenen *Fusarium* Arten für die Terpenoidemissionen besonders erhöhte Linalool- und β -Caryophyllen-Emissionen nachweisen.

Für Linaloolemissionen ist bekannt, dass sie typischerweise nach einem Herbivorenbefall auftreten (Holopainen, 2004; Kessler und Baldwin, 2001). Für β -Caryophyllen wurde gezeigt, dass es bei Mais als Reaktion auf Herbivorenbefall emittiert wird und so oberirdische wie auch unterirdische Prädatoren angelockt werden (Köllner et al., 2008). Darüber hinaus konnte in meiner Arbeit für die alte Landsorte BCC 173 eine besonders erhöhte Emission des C₁₆ Homoterpens TMTT beobachtet werden (Abb. 16), welche auch eine typisch stressinduzierte Emission darstellt (Vuorinen et al., 2004).

4.1.2.1.b) Mögliche Ursachen für erhöhte Monoterpen- bzw. Sesquiterpenemissionen:

Analyse der DXR-Expression

Die erhöhten Monoterpenemissionen der alten Gerstensorten (vgl. Abb. 16) könnten durch eine erhöhte Expression der DXR, dem zweiten Enzym des MEP-Weges (z. B. Dubey et al., 2003) erklärt werden. Eine erhöhte DXR-Expression soll bei vielen Pflanzenarten geschwindigkeitsbestimmend für die Synthese von IPP und DMAPP sein, den Grundbausteinen der Terpene (Mahmoud und Croteau, 2001; Botella-Pavía et al., 2004; Carretero-Paulet et al., 2006). Allerdings konnte in der vorliegenden Arbeit für keine Sorte eine erhöhte Induktion der DXR-Expression durch MeJA-Exposition beobachtet werden (Tab. 12b und 13). Da im Rahmen dieser Arbeit nur die Expression der DXR und nicht deren Aktivität gemessen wurde, kann eine posttranskriptionale Regulation der DXR an dieser Stelle jedoch nicht ausgeschlossen werden (Übersicht in Cordoba et al., 2009).

Da die alte Gerstensorte BCC 1479 anteilig mehr β -Caryophyllen als Linalool im Vergleich zu den anderen Sorten emittiert (Abb. 18), wären Unterschiede in der Expressionsstärke der DXR zu erwarten gewesen. Geht man davon aus, dass Sesquiterpene über den Acetat-Mevalonat-Weg (Kleinig, 1989) und Monoterpene über den MEP-Weg (Lichtenthaler, 1999; Eisenreich et al., 2001) gebildet werden, so hätte man für die Sorte BCC 1479 eine regulierende Reduktion der DXR-Expression erwarten können. Dies war wie bereits erwähnt nicht der Fall (Tab. 12b und 13). Die DXR-Expression ist also für die stärkeren Linaloolemissionen der anderen Gerstensorten vermutlich nicht verantwortlich. Neben der

DXR wird auch die DXS- sowie die HDR-Aktivität für viele Pflanzenarten als geschwindigkeitsbestimmender Schritt in der Bildung von IPP und DMAPP angenommen (Abb. 2), wobei diese Enzyme vor allem posttranskriptional reguliert werden (Übersicht in Cordoba et al., 2009) und im Rahmen dieser Arbeit nicht analysiert wurden. Welcher Schritt also geschwindigkeitsbestimmend für die vermehrte Bildung der Terpene in den alten Landsorten führt, muss in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden.

4.1.2.1.c) Rolle von JA in der Induktion von Terpenoidemissionen

▪ Bildung von JA

Durch die in dieser Arbeit angewendete MeJA-Applikation wurde der endogene JA-Gehalt bei allen sechs Sorten erhöht (Abb. 19). Die Bildung von JA kann über zwei mögliche Wege erfolgen. JA kann über 13-(S)-Hydroperoxy-Linolensäuren gebildet werden (Abb. 1). Dafür muss diese Fettsäure aus den plastidären Membranen, vermutlich über eine wund-induzierte Lipase, freigesetzt werden (Narváez-Vásquez et al., 1999; vgl. Kapitel 1.4.1). Ein alternativer Weg für die JA-Bildung ist eine Hydrolyse von MeJA über die Methyljasmonatesterase in JA (z.B. Tamogami et al., 2008; Abb. 1).

Da durch die fehlende GLV-Emission (Abb. 9) eine Verwundung des Pflanzengewebes ausgeschlossen werden kann (siehe Fall et al., 1999), ist eine *de novo* Synthese von JA mit durch Verwundung freigesetzten Membranlipiden als Substrat unwahrscheinlich. Eher wahrscheinlich ist eine Hydrolyse von MeJA zu JA durch die Methyljasmonatesterase (Abb. 1; Farmer und Ryan, 1990 und 1992; Stuhlfelder et al., 2004; Tamogami et al., 2008). Diese Hydrolyse von MeJA zu JA könnte den erhöhten JA-Gehalt nach der MeJA-Exposition im Vergleich zu den JA-Gehalten der Pflanzen unter unbehandelten Bedingungen erklären.

Allerdings konnte auch klar die Induktion der Expression von LOX-100, AOS2 und AOC nachgewiesen werden (Tab. 12b und 13), welche an der *de novo* Biosynthese von JA beteiligt sind (z.B. Wasternack, 2007). Für die LOX-100 ist zu beachten, dass sie am geringsten durch die MeJA-Applikation induziert wurde (Tab. 12b und 13). Eine Induktion dieser Gene auf Transkriptebene nach MeJA-Exposition ist in der Literatur beschrieben (LOX-100: Vörös et al., 1998; Weichert et al., 1999; AOS: Laudert und Weiler, 1998; Maucher et al., 2000; AOC: Maucher et al., 2004). Innerhalb der ersten 12 Stunden war ihre Expression am höchsten (Tab. 13). Dies ist konsistent zu der höchsten JA-Akkumulation nach 12 Stunden der MeJA-Exposition (Abb. 21).

Eine Substrat-getriggerte Induktion der Expression dieser Gene durch eine Bereitstellung von freien Fettsäuren infolge von Verwundung ist eher unwahrscheinlich, da wie bereits erwähnt

eine Verwundung des Pflanzengewebes auszuschließen ist. Vielmehr scheint es eine positive Rückkopplung von JA auf die Transkription der davor gelegenen Enzyme zu geben. In der Literatur wird diese transkriptionale Induktion der LOX, der AOS und der AOC durch solch eine positive Rückkopplung der JA-Akkumulation erklärt (Stenzel et al. 2003). JA soll die Expression der LOX, AOS und AOC induzieren (Feussner et al., 1995; Wasternack, 2006; Framer, 2007), wobei dies über die Metabolisierung von JA in das JA-Aminosäure-Konjugat JA-Isoleucin (JA-Ile) stattfinden soll (z.B. Farmer, 2007). Durch die Aktivierung der eigenen Synthese von JA wird eine schnelle Amplifizierung des JA-Signals ermöglicht (Maucher et al., 2004). Diese Aktivierung der Expression der LOX, AOS und AOC könnte für die Pflanze sinnvoll sein, um so schnell auf einen Herbivorenbefall antworten zu können.

Inwieweit die induzierte Expression der LOX-100, AOS2 und AOC auch zu einer gesteigerten Enzymaktivität geführt hat, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr geklärt werden. Interessant ist hier aber die Tatsache, dass keine GLV-Emissionen nachgewiesen werden konnten. Für die Bildung der GLV-Emissionen werden u. a. dieselben Substrate benötigt wie für die JA-Biosynthese (siehe Abb. 1). Die möglicherweise von der LOX-100 gebildeten Hydroperoxide sind offensichtlich nicht für die Bildung der GLV-Emissionen genutzt worden. Entweder standen also tatsächlich keine Substrate zur Verfügung, so dass die gesteigerte Expression der JA-Synthese-Enzyme ohne Funktion für die JA-Akkumulation blieb. Oder die Synthese der GLVs durch den primären Schritt, die HPL, wurde völlig unterdrückt bzw. durch fehlende Expression und/oder Aktivität der HPL verhindert. Interessant wäre hier die HPL-Aktivität zu bestimmen, die unmittelbar die GLV-Emissionen bildet (Abb. 1). Wegen versuchstechnischer Probleme konnte die Expression der HPL jedoch nicht analysiert werden (Kapitel 2.13.1).

▪ *zeitlicher Verlauf der JA-Akkumulation*

Wenn die endogenen JA-Gehalte ausschließlich aus der Hydrolyse von exogen appliziertem MeJA resultierten, ist zu erwarten, dass auch ein konstant hoher JA-Gehalt in den Pflanzen zu finden ist. Dies war jedoch nicht der Fall. Der JA-Gehalt stieg innerhalb der ersten 12 Stunden an und nahm danach deutlich ab (Abb. 21). Diese vorübergehende/transiente JA-Akkumulation könnte mehrere Gründe haben.

Eine Möglichkeit wäre, dass die MeJA-Applikation nicht kontinuierlich war. Eine nachlassende Wirkung der applizierten MeJA-Menge ist jedoch unwahrscheinlich, da die MeJA-Gehalte innerhalb der Pflanzenkammer über den gesamten Messzeitraum vergleichbar hoch waren. Daher ist anzunehmen, dass auch die Wirkung der applizierten MeJA-Menge

über die 48 Stunden angehalten hat. Möglich wäre, dass die Pflanzen anfangs mehr MeJA aufgenommen haben. Da sich aber die Messbedingungen, wie Lichtintensität oder Temperatur sowie die stomatäre Öffnungsweite der Pflanzen sich nicht unterschieden, kann eine durch die MeJA-Behandlung verursachte Schließung der Stomata (Beltrano et al., 1998) somit ausgeschlossen werden. Demnach ist es unwahrscheinlich, dass sich die Aufnahmemenge an MeJA über den Messzeitraum verändert hat.

Ein transienter Anstieg des JA-Gehaltes innerhalb der ersten Stunden wird häufig nach einen Insektenbefall (Heil et al., 2001) oder nach einer mechanischen Verwundung (Reymond et al., 2000) beschrieben. Da durch die in dieser Arbeit gewählte Applikationsmethode wahrscheinlich keine Verwundung des Pflanzengewebes ausgelöst wurde, spricht dies für eine aktive Reduktion der endogenen JA-Gehalte nach exogener MeJA-Applikation. Auch Tamogami et al. (2008) zeigten für das chinesische Heilkraut *Achyranthes bidentata* nach MeJA-Exposition unabhängig einer Verwundung des Pflanzengewebes einen transienten JA-Anstieg. Eine konstante exogene MeJA-Konzentration führt dort auch zu einer transienten JA-Akkumulation, da JA weiter metabolisiert wird und so die Transkription von JA-responsiven Genen induziert (siehe nächster Abschnitt).

▪ *JA als Trigger für Terpenoidemissionen*

Da für die Biosynthese und Emission von Terpenoiden angenommen wird, dass sie von JA getriggert werden (Boland et al., 1995; Paré und Tumlinson, 1998), könnte die JA-Akkumulation mit der Stärke der Terpenoidemissionen korrelieren.

In der vorliegenden Arbeit konnten jedoch keine quantitativen Zusammenhänge zwischen den Emissionen der Terpenoide während MeJA-Exposition und der Konzentration des Signalmoleküls JA nachgewiesen werden. Der endogene JA-Gehalt wurde zwar bei allen Gerstensorten durch die MeJA-Exposition signifikant erhöht (Abb. 19 und 21), die erhöhten Gehalte korrelierten jedoch nicht mit der Menge der emittierten Terpenoide (Abb. 20). Die endogene JA-Konzentration scheint daher bei allen untersuchten Gerstensorten nicht direkt limitierend für die Synthese und Emission der Terpenoide zu sein. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit Daten von Tamogami et al. (2008). Auch in dieser Arbeit ist für das chinesische Heilkraut *Achyranthes bidentata* keine direkte Korrelation des jeweils aktuellen JA-Gehaltes mit den Terpenoidemissionen nachgewiesen worden. Vielmehr wurden Hinweise darauf gefunden, dass nicht die JA-Konzentration, sondern die Konzentration von JA-Isoleucin (JA-Ile) die Biosynthese von Terpenoidemissionen triggert. Expositionen mit deuteriertem MeJA zeigen für *Achyranthes bidentata*, dass appliziertes d_2 MeJA hauptsächlich

in d₂JA und anschließend in d₂JA-Ile umgewandelt wird. Dies zeigt, dass zwar auch eine *de novo* Synthese von JA stattfindet, jedoch ist diese im Verhältnis zu dem direkt aus MeJA metabolisierten JA sehr gering (Tamogami et al., 2008). Während der Applikation wird MeJA demnach in der Pflanze zunächst zu JA hydrolysiert und schließlich u. a. zu JA-Ile weiter metabolisiert. Durch eine Interaktion von JA-Ile mit COI1 (CORONATIN INSENSITIVE 1) und mit JAZ-Proteinen (JASMONATE-ZIM-DOMÄNE-Proteine) werden Transkriptionsfaktoren freigesetzt, welche die Expression von abwehrrelevanten Proteinen ermöglichen (Thines et al., 2007; Chini et al., 2007; Übersicht in Farmer, 2007). Auch eine Expression von Genen, welche eine Rolle in der Biosynthese von abwehrrelevanten Terpenoidemissionen spielen ist über diesen Signalmechanismus wahrscheinlich (siehe Tamogami et al., 2008).

Auch die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse passen zu den Ergebnissen von Tamogami et al. (2008). In der vorliegenden Arbeit stiegen die Terpenoidemissionen mit der Zeit an und gelangten nach ca. 36 Stunden in einen steady state Zustand (Abb. 12), während die JA-Konzentration in den Blättern bereits nach 12 Stunden ihr Maximum erreichte und danach deutlich abnahm (Abb. 21). Denkbar wäre, dass ein gewisser Schwellenwert an endogener JA-Menge überschritten werden muss, um z.B. in JA-Ile weiter metabolisiert zu werden. JA würde daher eher als An- bzw. Ausschalter für die Terpenoidemissionen dienen.

Die abnehmende JA-Akkumulation könnte demnach durch eine erhöhte Umsatzrate von JA in JA-Aminosäure-Konjugate, wie JA-Ile erklärt werden, welche wiederum als Signal für die Bildung der Terpenoidemissionen dienen.

Neben der Menge an aufgenommenem MeJA und der entsprechenden Metabolisierung zu aktiven Derivaten, könnten sich die Sorten auch in der Signalperzeption und Weiterleitung unterscheiden, sodass dies letztendlich zu Unterschieden in den Emissionsstärken führen könnte. Um zu überprüfen, ob diese Signalkaskaden, also die Reaktion auf JA bei allen Sorten gleich stark funktioniert, wurde die Expression von MeJA-induzierten Genen (JIP23 und JRG5) analysiert (Kramell et al., 2000). Die Expression von JRG5 und JIP23 wurde bei allen Gerstensorten spät nach Beginn der MeJA-Exposition ähnlich stark hoch reguliert (Tab. 12b und 13). Diese späte Induktion ist konsistent mit der Literatur. Kramell et al. (2000) beschrieben eine höchste mRNA-Akkumulation dieser Gene nach 24 Stunden der MeJA-Exposition.

Dies zeigt, dass die pflanzliche Reaktion auf JA und ihre Signaltransduktion in allen Sorten gleich stark funktioniert. Demnach sind Unterschiede in der Metabolisierung von JA in z.B.

JA-Ile zwischen den Sorten eher unwahrscheinlich und die verschieden stark induzierten Terpenoidemissionen zwischen alten und modernen Sorten müssen nach der Reaktion auf JA begründet sein.

Die erhöhte Expression von JRG5 bei allen Gerstensorten (Tab. 12b) könnte ein Hinweis auf eine verstärkte Ligninsynthese sein. JRG5 codiert für eine Kaffeesäure *O*-Methyltransferase und ist somit über den Phenylpropanoidweg in der Ligninsynthese beteiligt (Abb. 3; Lee et al., 1997a und 1997b). Inwieweit eine erhöhte JRG5-Expression auch eine erhöhte Aktivität bedeutet wäre in nachfolgenden Arbeiten weiter zu verfolgen.

Für die Sorte Varde ist zu beachten, dass sie schon eine hohe basale JIP23-Expression im Vergleich zu der basalen Expression von Barke aufwies (Tab. 12a). Die JIP23-Expression ist demnach bei Varde auch ohne MeJA-Exposition deutlich im Vergleich zu den anderen Sorten erhöht. JIP23 kann durch endogene und exogene Jasmonate induziert werden (Löbner und Lee, 1998). Daher könnte der intrazelluläre JA-Gehalt die JIP23-Expression beeinflussen. Allerdings war der endogene JA-Gehalt der Kontrollpflanzen zwischen Barke und Varde vergleichbar groß (Abb. 19) und ein Einfluss der endogenen JA-Konzentration ist unwahrscheinlich. Jedoch kann auch hier eine stärkere Signalwirkung von JA für die Sorte Varde nicht ausgeschlossen werden.

Eine andere Erklärung könnte sein, dass Varde besonders auf die Messbedingungen, wie z.B. das Dauerlicht mit einer JIP23 Induktion reagiert. Die Pflanzen der Sorte Varde zeigten auch unter unbehandelten Bedingungen Terpenoidemissionen (siehe Kapitel 3.5). Die erhöhte JIP23-Expression sowie die Emissionen unter unbehandelten Bedingungen könnten Anzeichen für eine höhere Stressanfälligkeit sein. Es ist z.B. möglich, dass der Einbau der Pflanzen kurzfristig zu einer Erhöhung der JA-Gehalte geführt hat, diese zum Zeitpunkt der JA-Gehaltsbestimmung (48 h nach Einbau) aber bereits wieder auf dem Ausgangsniveau waren.

4.1.2.2 Kein Nachweis von GLV-Emissionen während MeJA-Exposition

In dieser Arbeit waren während MeJA-Exposition für keine Gerstenpflanze GLV-Emissionen nachweisbar (Abb. 9). In der Literatur ist der Nachweis von GLV-Emissionen nach MeJA-Exposition nicht einheitlich beschrieben. Bei Tomatenpflanzen werden durch MeJA-Exposition ausschließlich Emissionen der Terpenoide, jedoch nicht die der GLVs induziert (Farag und Paré, 2002), was im Einklang mit den Daten dieser Arbeit ist. In anderen Studien werden bei anderen Pflanzenarten (Limabohne, Baumwolle, Tabak) sowohl Emissionen der

Terpenoide als auch die der GLVs nach MeJA-Exposition gefunden (z.B. Dicke et al., 1999; Rodriguez-Saona et al., 2001; Kessler und Baldwin, 2001).

Diese gegensätzlichen Ergebnisse der GLV-Emissionen könnten durch die verschiedenen Applikationsmethoden bedingt sein. Eine Übersicht zu den Methoden der MeJA-Applikationen ist in Rohwer und Erwin (2008) aufgelistet. Bei allen Arbeiten, bei denen Emissionen von GLVs nach MeJA-Applikation gefunden wurden, wurde MeJA entweder mit Lanolin (Wollwachs) gemischt und dann auf das Pflanzengewebe gestrichen (z.B. Kessler und Baldwin, 2001) oder direkt auf das Pflanzengewebe gesprüht (z.B. Semiz et al., 2011). Dazu muss es zuvor in Aceton oder Methanol gelöst werden, dem meist zusätzlich Tenside (z.B. Triton X-100[®]) als Lösungsvermittler zugegeben werden. Bei diesen Applikationsformen könnten durch das direkte Bestreichen oder Besprühen der Blätter die Membranen der Pflanzen angegriffen werden. Es ist bekannt, dass GLV-Emissionen nur nach einer Zerstörung der pflanzlichen Membranen zu finden sind (Hatanaka, 1993). Eine weitere Möglichkeit wäre, dass durch das direkte Bestreichen oder Besprühen lokal die MeJA-Konzentrationen höher sind als durch eine gasförmige Applikationsmethode. Auch ein pflanzenspezifischer Unterschied bei der GLV-Emission nach MeJA-Exposition kann nicht ganz ausgeschlossen werden (Farag und Paré, 2002).

Farag und Paré (2002) haben im Gegensatz zu den anderen vorgestellten Studien MeJA gasförmig appliziert. Die gasförmige Applikation von Farag und Paré (2002) ist vergleichbar mit der in meiner Arbeit angewendeten Methode. Das Fehlen der GLV-Emission ist daher wahrscheinlich auf die unterschiedlichen Applikationsmethoden von MeJA zurückzuführen.

4.1.2.3 Kein Nachweis aromatischer BVOC- Emissionen während MeJA-Exposition

Auffällig ist auch, dass Gerste während MeJA-Exposition keine aromatischen Verbindungen, wie **Indol** emittiert hat.

Indolemissionen werden für viele Pflanzenarten nach einem Insektenbefall nachgewiesen und werden dabei u. a. durch Elicitoren im Speichel von Herbivoren getriggert (Baumwollpflanzen: Paré und Tumlinson, 1996 und 1997; Mais: Frey et al., 2000; Reis: Zhuang et al., 2012).

Aber auch die exogene Applikation von MeJA, welches in der Pflanze zu JA, dem zentralen Signalmolekül der Herbivorie-Reaktion umgewandelt wird, kann direkt Indolemissionen auslösen (Rodriguez-Saona et al., 2001; Frey et al., 2004; Zhuang et al., 2012). Frey et al. (2004) und Zhuang et al. (2012) applizierten zudem MeJA in Kombination mit einer kurzen mechanischen Verwundung des Pflanzengewebes. Eine alleinige kurze mechanische

Verwundung des Pflanzengewebes ohne MeJA-Applikation führt bei Reispflanzen nicht zu Indolemissionen (Zhuang et al., 2012).

In Limabohnen konnten jedoch auch ohne exogene JA-Zugabe Indolemissionen durch eine kontinuierliche mechanische Verwundung mit einem Roboter („MecWurm“) induziert werden (Bricchi et al., 2010). Diese kontinuierliche mechanische Verwundung des Pflanzengewebes löst ein ähnliches Emissionsmuster der BVOC aus wie nach Herbivorie (Mithöfer et al., 2005). Eine Wirkung von JA ist aber auch durch eine kontinuierliche Verwundung wahrscheinlich, da über eine kontinuierliche Verwundung des Pflanzengewebes möglicherweise eine Schwelle überschritten wird, wodurch der Oktadecanoidweg und so auch die endogene JA-Bildung induziert wird (siehe Abb. 1). Wahrscheinlich müssen für die Indolemission also die Verwundung und die JA-Wirkung gemeinsam auftreten. Rodriguez-Saona et al. (2001) applizierten MeJA auch ohne äußerliche Verwundung des Pflanzengewebes, indem sie ein Wattestäbchen mit MeJA behandelten und unterhalb von Blättern der Baumwollpflanzen ohne direkten Kontakt platzierten. Diese rein gasförmige Applikation führte auch ohne offensichtliche Verwundung zu Indolemissionen. Neben Indolemissionen wurde aber auch die GLV-Emission, (*Z*)-3-Hexenylacetat nachgewiesen. Letztere ist ein guter Marker dafür, dass dennoch eine Gewebeverletzung stattgefunden hat, da diese Voraussetzung für die GLV-Emission ist (Fall et al., 1999; Holopainen, 2004). Demnach könnte trotz der gasförmigen Applikationsmethode das Pflanzengewebe der Baumwolle angegriffen worden sein. Im Gegensatz dazu wurde in dieser Arbeit durch die gasförmige Applikation die Verletzung des pflanzlichen Gewebes vermieden, sodass die wahrscheinlich ebenfalls für die Indolemissionen nötige Verwundung fehlte. Dass bei dieser Applikationsform keine Verwundung der Pflanzenmembranen erfolgte, ist durch die fehlenden GLV-Emissionen zu belegen. Letztlich können aber auch pflanzenspezifische Unterschiede in der Fähigkeit Indol zu emittieren nicht ausgeschlossen werden.

Entscheidend könnten hier Konzentrationen von Vorläufermetaboliten des Phenylpropanoidweges sein (Abb. 3; Tzin und Galili, 2010). Rodriguez-Saona et al. (2001) konnten nach MeJA-Exposition, die auch GLV-Emissionen induzierte, sowohl wie bereits beschrieben Indolemissionen, aber auch weitere Produkte des Phenylpropanoidweges, wie MeSA-Emissionen nachweisen. Durch die in der vorliegenden Arbeit angewendete MeJA-Expositionsmethode könnte bei Gerste der Phenylpropanoidweg nicht stark genug induziert worden sein, um genügend Vorläufermetabolite und so entsprechende Indolemissionen zu bilden. Dies spiegelt sich auch darin wider, dass in der vorliegenden Arbeit auch von keiner Gerstenpflanze nach MeJA-Exposition **MeSA** emittiert wurde. Dies ist konsistent dazu, dass

in keiner Gerstensorte freie SA nachweisbar war (Kapitel 3.7.2.2). Für eine Bildung von MeSA wird SA benötigt (Chen et al., 2003), somit fehlte das Substrat, um MeSA zu bilden.

4.1.2.4 Vergleich MeJA – Herbivorie Reaktionen

In der Literatur wird MeJA-Exposition häufig als Induktor typischer Herbivorie-assoziierter Stressreaktionen eingesetzt (z.B. Koch et al., 1999, van Poecke und Dicke, 2004). Um dies für Gerste zu prüfen wurde analysiert, ob auch typische Pathogen-induzierte Proteine durch die MeJA-Exposition beeinflusst wurden. Wenn durch die MeJA-Exposition die Genexpression von Pathogen-assozierten Proteinen induziert wird, könnte dies ein indirekter Hinweis auf Unterschiede zu einem Herbivorenbefall sein.

Dazu wurden u. a. die PR-Proteine TH und LTP untersucht, welche das Wachstum von Pflanzenpathogenen inhibieren sollen (Bohlmann et al., 1988; Carrasco et al., 1981; Diaz et al., 1992; Molina und Garcia-Olmedo, 1993; Molina et al., 1993).

Für beide Gene wurde in der vorliegenden Arbeit eine Induktion ihrer Expression durch MeJA beobachtet (Tab. 12b). Die Expression des PR-Proteins TH wurde bei allen Gerstensorten durch die MeJA-Exposition stark induziert. Unterschiede zwischen modernen und alten Sorten sind jedoch nicht festzumachen, da die Expressionsdaten für dieses TH eine hohe Variabilität zeigen (Tab. 12b).

Für die Untersuchung der LTPs wurde die vierte LTP-Isoform aus drei verschiedenen LTP4-Isoformen von Gerste abgeleitet (siehe Tab. 6). Durch die MeJA-Applikation wurde die Expression der LTP4-Isoformen im Vergleich zu den TH nur schwach induziert (Tab. 12b). Diese Reaktion von LTP und TH nach MeJA-Exposition ist konsistent mit den Ergebnissen der Versuche von Garcia-Olmedo et al. (1996). Gerstenpflanzen reagieren dort nach MeJA-Applikation mit einer höheren Expression der TH als die der LTP. Inwieweit diese Reaktion eine Rolle in Abwehrmechanismen gegen Herbivoren spielt ist unbekannt. Versuche von Garcia-Olmedo et al. (1995 und 1996) zeigten für die Genprodukte von LTP und TH für Gerste eine direkt inhibierende Wirkung auf das Wachstum gegenüber bakteriellen und pilzlichen Pathogenen. Die LTP weisen dabei eine über 20 Mal höhere inhibierende Wirkung gegenüber dem Bakterium *Clavibacter michiganensis* als die der TH auf. Die TH zeigen dagegen eine höhere inhibierende Wirkung gegenüber dem Pilz *Fusarium solani* als die der LTP. Diese gegenseitige ergänzende Wirkung der LTP und TH könnte eine generelle Barriere gegenüber Pathogenen darstellen (Molina und Garcia-Olmedo, 1993; Molina et al., 1993; Garcia-Olmedo et al., 1995 und 1996). Die Induktion der Expression dieser Gene durch MeJA

in Gerste zeigt daher, dass Pathogen-assoziierte Gene durch die angewendete MeJA-Exposition beeinflusst werden.

Die Untersuchung der PR-1b-Genexpression zeigte im Gegensatz dazu, dass klassische PR-Proteine, wie das basische PR-1b-Protein bei allen Gerstensorten kaum bis gar nicht durch die MeJA-Exposition induziert wurde (Tab. 12b und 13). Muradov et al. (1993) zeigten, dass die Expression des PR-1b-Proteins bei Gerste durch Pathogene induziert wird. Demnach triggert MeJA in Gerste einige Gene deren Produkte bei der Pathogenabwehr eine Rolle spielen (TH und LTP), während andere Pathogen-Abwehrgene, wie PR-1b unbeeinflusst bleiben. Es ist davon auszugehen, dass die Induktion dieser verschiedenen PR-Proteine in Gerste auch der Kontrolle unterschiedlicher Signalkaskaden unterliegt. Inwieweit sich die Reaktionen nach MeJA-Exposition mit denen nach einem Herbivorenbefall und Pathogenbefall ähneln, benötigt daher weitere Untersuchungen.

4.2 Reaktionen der Gerstensorten auf die Ozonexposition

Die in dieser Arbeit angewendete Ozonexposition triggerte bei allen sechs untersuchten Gerstensorten (mit je sechs Wiederholungen) BVOC-Emissionen, die sich zwischen den verschiedenen Sorten qualitativ nicht unterschieden (Kapitel 3.8.1). Im Vergleich zu der MeJA-Exposition emittierten alle Pflanzen nach Ozonexposition neben den Terpenoiden zusätzlich GLVs (Tab. 14; Abb. 24). Die GLV-Emissionen machten bei allen Sorten den Hauptanteil an den Gesamtemissionen aus (Abb. 24).

Die hier angewendete Stärke der Ozonexposition induzierte direkt die Emission der Terpene und GLVs. Das Maximum der GLV-Emissionen wurde ca. 3 Stunden und das der Terpenoidemissionen ca. 5 Stunden nach der einstündigen Ozonexposition erreicht (Abb. 13). Dieses direkte Auftreten der BVOC-Emissionen ist konsistent zur Literatur. Fall et al. (1999) haben für Pappel, Buche und Weiß-Klee gezeigt, dass GLVs unverzüglich nach einer Verwundung des Pflanzengewebes emittiert werden. Auch bei Maispflanzen werden nach einem Raupenbefall GLV- und Terpenoidemissionen unmittelbar nach Beginn des Raupenfraßes beobachtet (Turlings et al., 1990).

4.2.1 Nachweis von GLV-Emissionen nach Ozonexposition

Die Stärke der GLV-Emissionen war nach gleich hoher applizierter Ozonkonzentration zwischen den Gerstensorten nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 24). Wahrscheinlich weist die Stärke der GLV-Emissionen der verschiedenen Gerstensorten auf die Stärke der primär durch die Stressapplikation hervorgerufene Verletzung von Pflanzengewebe hin, da Membranlipide das Ausgangssubstrat für GLV-Emissionen darstellen (Abb. 1; z.B. Croft et al., 1993). Fall et al. (1999) haben gezeigt, dass die Emissionsstärken der GLVs proportional zur Menge des zerstörten Blattgewebes sind. Auch für Pappel wurde eine gute Korrelation zwischen Emissionen der GLVs und der Fläche der Nekrosen nach Ozonexposition bestätigt (Behnke et al., 2009). Da in der vorliegenden Arbeit keine signifikanten Unterschiede in der Stärke der GLV-Emissionen zwischen den Sorten bestanden, spricht dies dafür, dass bei allen Pflanzen gleich viele Membranen zerstört wurden. Ein Hinweis darauf liefern die gleich stark ausgebildeten nekrotischen Flecken auf den Gerstenblättern, welche nach Ozonexposition auftraten (< 20 % der gesamten Blattfläche).

GLV-Emissionen werden nach Pilzbefall (Hora und Baker, 1970; Vaughn und Gardner, 1993), Pathogenbefall (Baldwin et al., 2001) oder Insektenbefall (Parè und Tumlinson, 1999; D'Auria et al., 2007) nachgewiesen. Laut Literatur nehmen GLV-Emissionen eine wichtige Rolle in der pflanzlichen Abwehr ein (z.B. Croft et al., 1993; Hildebrand et al., 1993; Bate und Rothstein, 1998; Dicke et al., 1999; Shiojiri et al., 2006; siehe Kapitel 1.2). Da jedoch bei allen untersuchten Gerstensorten vergleichbar hohe GLV-Emissionen nachgewiesen werden konnten, hat die Züchtung in Richtung Ertrag diesen Abwehrzweig offensichtlich nicht beeinflusst.

Mögliche Ursachen für GLV-Emissionen: Analyse der LOX-Expression

Die Stärke der GLV-Emissionen könnte mit der Expression der LOX korrelieren, da LOX in der Biosynthese der GLV-Emissionen beteiligt sind (siehe Abb. 1). Für Tomatenpflanzen konnte eine Korrelation der Enzymaktivität der LOX mit der Biosynthese der GLV-Emissionen gezeigt werden (Miebach, 2008). In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Korrelation mit der LOX-Expression anhand der LOX-100, des LOX2-Typs untersucht. LOX-100 bilden ausschließlich 13-Fettsäure-Hydroperoxide (Kapitel 1.4.1; Vick und Zimmerman, 1987). Die 13-Linolensäure-Hydroperoxide sind Vorläufer der Hexenale/Hexenole (Abb. 1). Nach der hier angewendeten Ozonexposition waren für alle Sorten ausschließlich die aus 13-Linolensäure-Hydroperoxiden stammenden Emissionen von (Z)-3-Hexenol und (Z)-3-Hexenylacetat nachweisbar (Kapitel 3.8.1.1).

Für die LOX-100 konnte jedoch keinerlei Induktion der Genexpression nachgewiesen werden (Tab. 17b und 18b). Es kann auch nicht ganz ausgeschlossen werden, dass die zweite LOX2-Isoform, die LOX-92 (Vörös et al., 1998) durch Ozon transkriptionell induziert wird, welche in dieser Arbeit nicht spezifisch untersucht wurde. Allerdings ist die Regulation der LOX-Aktivität durch Genexpression, also über die gebildete Menge des exprimierten *lox*-Gens ist für die Bildung der GLV-Emissionen eher unwahrscheinlich, da das direkte Auftreten der GLV-Emissionen für eine Aktivierung bereits vorliegender Proteine spricht. Es ist unbekannt, ob die Abgabe der GLV-Emissionen zunächst eine Induktion der Expression der GLV-synthetisierenden Gene benötigt. Die Verwundung des Pflanzengewebes könnte das Zusammentreffen der Enzyme mit den Substraten ermöglichen oder es könnten durch die Verletzung der Membranen schnell freie Fettsäuren als Substrate der LOX freigesetzt werden ohne eine Genexpression der LOX zu benötigen (Bate und Rothstein, 1998).

Für Tomatenpflanzen wurde gezeigt, dass der von der LOX katalysierte Schritt der limitierende Schritt für die Bildung der GLV-Emissionen ist (Miebach, 2008). Es kann jedoch für Gerste auch nicht ausgeschlossen werden, dass die HPL den limitierenden Schritt in der Bildung der GLV-Emissionen darstellt. Die HPL katalysiert den der LOX folgenden Biosyntheseschritt für die Bildung der GLV-Emissionen (Schaller, 2001; vgl. Abb. 1 und Kapitel 2.13.1). Daher wäre es interessant, die Analyse der HPL-Expression bzw. die Aktivität dieses Enzyms in weiteren Arbeiten zu verfolgen.

4.2.2 Nachweis von Terpenoidemissionen nach Ozonexposition

Wie auch nach MeJA-Exposition kam es durch die Ozonexposition zu Terpenoidemissionen (Abb. 24). Dabei wurden sowohl Mono- als auch Sesquiterpene emittiert, wobei hauptsächlich wie nach MeJA-Exposition Linalool und β -Caryophyllen von allen Sorten emittiert wurden (Abb. 24).

Die Anteile der Monoterpen- und Sesquiterpenemissionen sind nach beiden Expositionsformen ähnlich (Abb. 10). Es sind nur zum Teil für einzelne Sorten kleine Unterschiede in dem Emissionsmuster der Terpene zu erkennen (Abb. 10). Varde besitzt nach MeJA-Exposition einen höheren Anteil an Sesquiterpenemissionen als an Monoterpenemissionen, die Sorte BCC 1479 emittiert sowohl nach Ozon als auch nach MeJA-Exposition vermehrt Sesquiterpene (Abb. 10 und 11a). Es kann also davon ausgegangen werden, dass Linalool- und Caryophyllenemissionen ein wesentlicher Bestandteil der allgemeinen Stressantwort von Gerste sind, wobei sich die Anteile der

jeweiligen Emission (Linaloolemission zu Caryophyllenemission) je nach Sorte unterscheiden können.

Emissionen des Homoterpens TMTT waren nach Ozonexposition im Gegensatz zu der MeJA-Exposition für keine Sorten nachweisbar. Die hier angewendete Ozonexposition ruft im Hinblick auf die Terpenoide demnach nicht genau dasselbe Emissionsmuster wie nach MeJA-Exposition hervor.

Während die Sesquiterpenemissionen nach Ozonexposition bei den verschiedenen Sorten vergleichbar hoch waren, konnten für die Monoterpene signifikante Unterschiede in der Stärke der Emission nachgewiesen werden. Die alten Sorten BCC 869 und BCC 173 wiesen im Vergleich zu den anderen Sorten nach Ozonexposition erhöhte Monoterpenemissionen auf. Für die alte Sorte BCC 1479 konnte jedoch keine Erhöhung der Monoterpenemissionen gezeigt werden (Abb. 24). Es konnte also nicht für alle alten Sorten eine stärkere Monoterpenemission nachgewiesen werden.

Für die untersuchten alten Sorten BCC 869 und BCC 173 könnten die erhöhten Monoterpenemissionen eine stärkere Abwehr gegen Schädlinge bedeuten. Für die Sorte BCC 869 war dabei eine erhöhte Ocimenemission augenfällig (Abb. 26). Pflanzen der Limabohne emittierten nach einem Befall mit Spinnmilben u. a. Ocimen. Diese Ocimenemissionen dienen für die natürlichen Feinde der Spinnmilben als Signal für die Lokalisierung der mit Spinnenmilben befallenden Pflanzen (Dicke et al., 1990; Vuorinen et al., 2004). Die Sorte BCC 173 zeigte nach Ozonexposition auch erhöhte Monoterpenemissionen. Diese sind jedoch nicht auf eine bestimmte erhöhte Emission zurückzuführen (Abb. 25a und 26). Indirekte Abwehrmechanismen könnten daher durch die Zusammensetzung aller emittierten Substanzen begründet sein.

Inwieweit die erhöhten Monoterpenemissionen der beiden alten Sorten BCC 869 und BCC 173 auch eine Rolle in der Abwehr von Pathogenen spielt, bleibt zu klären. Die vom IPK Gatersleben nachgewiesene unterschiedliche Anfälligkeit für Mehltau anhand von endogenen Abwehreigenschaften dieser beiden Sorten (Tab. 4; unveröffentlicht) schließt indirekte Abwehrmechanismen nicht aus. Es wäre denkbar, dass Pathogen-fressende Prädatoren durch die erhöhten Monoterpenemissionen angelockt werden. Für Kürbisgewächse (*Cucurbita moschata*) ist bekannt, dass nach Mehltaubefall die Pflanzen BVOC-Emissionen produzieren, welche Marienkäfer, wie den Sechzehnfleckige Marienkäfer anlocken. Diese Marienkäfer und deren Larven fressen schließlich oberflächlich die Sporen des Mehltaus ab und können so eine Ausbreitung des Mehltaus beeinflussen (Sutherland und Parrella, 2006; Tabata et al., 2011).

4.2.2.a) Mögliche Ursachen für erhöhte Monoterpenemissionen nach Ozonexposition: Analyse der DXR-Expression

Die erhöhten Monoterpenemissionen der Sorten BCC 869 und BCC 173 nach Ozonexposition könnten durch eine verstärkte Expression der Enzyme des MEP-Weges begründet sein. Die DXR, als Eingangsenzym des MEP-Weges wurde jedoch bei allen Gerstensorten durch die Ozonexposition nicht erhöht exprimiert (Tab. 17b und 18b). Die erhöhten Monoterpenemissionen sind demnach unabhängig von der DXR-Expression. Da auch nach MeJA-Exposition (Tab. 12b) keine erhöhte Induktion dieses Gens nachgewiesen werden konnte, sollte für zukünftige Analysen eine posttranskriptionale Regulation der DXR berücksichtigt werden (vgl. Cordoba et al., 2009).

4.2.2.b) Rolle von JA in der Induktion der Monoterpenemissionen nach Ozonexposition

Möglicherweise beruhen die unterschiedlichen Monoterpenemissionen auf Unterschieden in den Signalkaskaden. Ozonexposition soll die Biosynthese von JA induzieren und dadurch zu einer JA-Akkumulation in den Pflanzen führen (z.B. Koch et al., 1998 und 2000). Über eine Metabolisierung von JA in z.B. JA-Ile könnten dann wie schon im Abschnitt 4.1.2.1c) beschrieben, stressrelevante Terpenoidemissionen induziert werden.

Ausschließlich drei Stunden nach der Ozonexposition war eine leicht erhöhte JA-Konzentration zu erkennen (Tab. 15). Dies war bis auf die Sorte Barke für alle Sorten der Fall. 24 Stunden nach der Ozonexposition waren für alle Sorten keine erhöhten JA-Konzentrationen mehr messbar (Abb. 29). In Untersuchungen mit dikotylen Pflanzen wurde der JA-Gehalt nach Ozonexposition deutlich erhöht (Koch et al., 2000; Rao et al., 2000). Dort führt die Exposition mit Ozon der Pflanzen von *Arabidopsis* (Rao et al., 2000) und Pappel (Koch et al., 2000) zu einer deutlichen JA-Akkumulation. Diese Untersuchungen verwendeten eine Ozonkonzentration von ca. 300 ppb und applizierten diese Menge über einen längeren Zeitraum. Daher könnten diese Unterschiede der JA-Akkumulation nach Ozonexposition durch eine unterschiedlich starke aufgenommene Ozonmenge der jeweiligen Pflanzen bedingt sein (siehe Beauchamp et al., 2005). Denkbar wären aber auch Unterschiede in der JA-Akkumulation zwischen monokotylen und dikotylen Pflanzen nach Ozonexposition. Die in der vorliegenden Arbeit geringe und kurzfristige JA-Akkumulation könnte mit der Expressionsstärke der Gene korrelieren, die eine Rolle in der JA-Biosynthese spielen. Die LOX-100-Expression wurde durch die Ozonexposition nicht erhöht (Tab. 17b und 18b). Auch nach 48-stündiger MeJA-Exposition war die LOX-100 Expression kaum induziert (siehe Tab. 12b), obwohl eine deutliche JA-Akkumulation vorlag (siehe Abb. 19). Dies würde dafür

sprechen, dass für die hier untersuchten Gerstensorten die LOX-100 wahrscheinlich nicht für die JA-Biosynthese relevant ist.

Die Genexpressionen der AOS2 und AOC, die eine wesentliche Rolle in der JA-Biosynthese spielen (Abb. 1; z.B. Wasternack, 2007), wurden drei Stunden nach der Ozonexposition in allen Sorten verstärkt induziert (Tab. 17b). Maucher et al. (2004) zeigten für Gerste, dass die AOS- und AOC-Expression mit der JA-Biosynthese korreliert. Demnach könnte die in der vorliegenden Arbeit ausschließlich drei Stunden nach der Ozonexposition gefundene erhöhte AOS- und AOC-Expression die leicht erhöhte JA-Akkumulation zu diesem Zeitpunkt erklären.

Da die Biosynthese und Stärke der Terpenoidemissionen von der JA-Signalkaskade abhängen soll (Boland et al., 1995; Tamogami et al., 2008), reicht auch diese nur geringe und kurzfristige JA-Akkumulation (demnach wie nach MeJA-Exposition sozusagen auch transient) aus, um stressrelevante Terpenoidemissionen zu induzieren. Die erhöhten Monoterpenemissionen der alten Sorten BCC 869 und BCC 173 müssen demnach in Schritten nach der JA-Akkumulation liegen.

Die Expression von JRG5 und JIP23 dagegen, die auf JA reagieren, also wie die Terpenoidemissionen von JA induziert werden, wurden bei allen Sorten sowohl drei Stunden als auch 24 Stunden nach der Ozonexposition gering bis nicht induziert (Tab. 17b und 18b). Dies spricht dafür, dass diese JA-abhängige Signalkaskade, wie sie durch die MeJA-Applikation eindeutig gezeigt werden konnte, durch Ozon nicht induziert wird.

4.2.3 Kein Nachweis von MeSA-Emissionen nach Ozonexposition

Auffallend ist, dass wie nach MeJA-Exposition auch nach Ozonexposition keine Emissionen aus dem Phenylpropanoidweg, insbesondere kein MeSA gefunden wurden. Für viele Pflanzenarten werden MeSA-Emissionen nach Ozonexpositionen gezeigt (Tabak: Heiden et al., 1999b; Beauchamp et al., 2005. Tomate: Jansen et al., 2009; Miebach, 2008. Pappel: Behnke et al., 2009). Jedoch konnten auch Vourinen et al. (2004), wie in dieser Studie für Gerste, bei Limabohnenpflanzen weder nach Ozonexposition noch nach Spinnmilbenbefall MeSA-Emissionen nachweisen.

In Übereinstimmung mit der fehlenden MeSA-Emission in der vorliegenden Arbeit war, dass für keine der untersuchten Gerstenpflanzen freie SA nachweisbar war. Dies gilt sowohl drei als auch 24 Stunden nach der einstündigen Ozonexposition (Kapitel 3.8.3.2). Demnach ist SA vermutlich als Substrat für die Bildung von MeSA nicht ausreichend vorhanden. Dass freie SA nötig für MeSA-Emissionen ist, zeigten Shulaev et al. (1997). Dort sind bei

Tabakpflanzen mindestens 99% der MeSA-Emissionen von SA abgeleitet. Auch bei Tomatenpflanzen besteht eine Korrelation zwischen den endogenen Gehalten der freien SA und den MeSA-Emissionen (Miebach, 2008).

Nach Ozonexposition der Gerstenpflanzen konnten aber erhöhte Mengen an SAG nachgewiesen werden (Tab. 16; Abb. 30). Offensichtlich findet eine effiziente Glykosilierung der gebildeten freien SA statt. Die Methylierung durch die Methyltransferase von SA zu MeSA scheint nicht so effizient zu sein, wie die Glykosilierung (siehe Abb. 3). In der Literatur ist eine schnelle Umsetzung freier SA zu SAG bekannt, welche durch die SA-Glucosyltransferase (SGT) katalysiert wird (Abb. 1; z.B. Malamy und Klessig, 1992). Die in dieser Arbeit gefundenen erhöhten SAG-Gehalte könnten demnach durch eine verstärkte Aktivität der SGT durch die Ozonexposition begründet sein.

Durch die Ozonexposition wurde der SAG-Gehalt besonders bei den modernen Sorten stärker induziert als durch die MeJA-Exposition (Ozon: Abb. 30, Tab. 16; MeJA: Abb. 22 und 23). Dies deutet daraufhin, dass SA in den untersuchten Gerstensorten möglicherweise durch die Ozonexposition zwar verstärkt gebildet wird, jedoch schnell in SAG umgewandelt wird.

Ein direkter antagonistischer Effekt von der JA-Konzentration auf die SA-Bildung nach Ozonexposition ist eher unwahrscheinlich, da die endogenen JA-Gehalte nur gering erhöht wurden (Abb. 29; Tab. 15). Ein Effekt von JA-Metaboliten, wie JA-Ile kann an dieser Stelle jedoch nicht ausgeschlossen werden.

4.2.4 Vergleich Ozon – Pathogen Reaktionen

4.2.4.a) Emissionen nach Ozonexposition und Pathogeninfektion

In der vorliegenden Arbeit wurde Ozonexposition als Stressor angewendet, da Ozon vergleichbare Reaktionen wie nach einem Pathogenbefall auslösen soll (Sandermann et al., 1998). Zur Bestimmung der Reaktionen auf einen Pathogenbefall wurde für Barke und BCC 173 daher ein Infektionsversuch mit dem Pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* durchgeführt (Kapitel 3.8.2; je ein Versuch). Von besonderem Interesse war, ob durch einen Pathogenbefall MeSA-Emissionen nachweisbar sind. Von der Sorte Barke ist bekannt, dass sie nach einem Mehлтаubefall MeSA-Emissionen zeigt (persönliche Mitteilung Dr. Jürgen Wildt, Forschungszentrum Jülich).

Neben den Emissionen der GLVs und Terpenoide führte die Infiltration mit *P. syringae* pv. *syringae* bei beiden Sorten zu MeSA-Emissionen (Abb. 27 und 28). Während eines realen Schädlingsbefalls wird demnach freie SA zu MeSA umgewandelt. Eine Induktion der pflanzlichen Abwehrmechanismen über SA ist nach der Infektion mit *P. syringae* pv.

syringae wahrscheinlich, da SA eine pflanzliche Resistenz gegen hemibiotrophe Pathogene, wie *P. syringae* pv. *syringae* vermittelt (Huang et al., 2003; Koo et al., 2007).

Interessant ist hier, dass nach der Infiltration mit *P. syringae* pv. *syringae* am Beispiel der Sorte BCC 173 keine freie SA nachgewiesen werden konnte (Kapitel 3.8.4; die Bestimmung der Inhaltsstoffe erfolgte hier nur am Beispiel BCC 173 und nicht für Barke). Dies entsprach nicht der Erwartung. Denn der Befall mit *P. syringae* pv. *syringae* der Gerstensorte Golden Promise führte zu einem Nachweis freier SA (Vallélian-Bindschedler et al., 1998). Dabei stammt die nachgewiesene freie SA ausschließlich von Gerste, da *P. syringae* pv. *syringae* keine SA produziert (Summermatter et al., 1995).

Dass in dieser Arbeit keine freie SA nachweisbar war, könnte mehrere Gründe haben. Eine Möglichkeit wäre, dass die Nachweisgrenze für freie SA in dieser Arbeit generell nicht gut genug war, um bestimmt werden zu können. Ausgeschlossen werden können Fehler beim Messgerät, da durch die Zugabe eines SA-Standards zu den pflanzlichen Extrakten SA detektiert werden konnte und ab 10 nM (entspricht 7 ng/g FG) nachweisbar war (Kapitel 2.12). Dies zeigt, dass SA generell mit dem in dieser Arbeit verwendeten Analyseverfahren nachweisbar ist. Auch in anderen Untersuchungen wurde dieses Verfahren zur Bestimmung von SA-Gehalten herangezogen, wobei jedoch eine andere Extraktionsmethode als in dieser Arbeit angewendet wurde (Koch, 2008). Demnach können Fehler bei Extraktion, wie etwa die Sublimation (Verberne et al., 2002), nicht ganz ausgeschlossen werden.

Ein zu später Messzeitpunkt von fünf Tagen nach der Infiltration mit *P. syringae* pv. *syringae* für die Bestimmung freier SA ist dabei unwahrscheinlich, da der SA-Gehalt unmittelbar nach der Detektion der MeSA-Emissionen gemessen wurde. Demnach muss auch freie SA für die Umwandlung zu MeSA vorhanden gewesen sein.

Dies spricht dafür, dass freie SA in Gerste sehr schnell umgesetzt wird. Die Menge an gebildeter freier SA könnte nach einem Pathogenbefall deutlich höher sein als nach einer Ozonexposition, sodass mehr freie SA umgesetzt werden kann. Dafür spricht, dass durch den Pathogenbefall SAG im Vergleich zu den SAG-Gehalten nach Ozonexposition höher war (Kapitel 3.8.4; Abb. 30; Tab. 16). Es könnte auch sein, dass sich die SA-Gehalte nach Ozonexposition und Pathogenbefall nicht unterscheiden, sondern dass die Aktivität der SA-Methyltransferase bzw. der SA-Glucosyltransferase (siehe Abb. 1) durch den Pathogenbefall höher war, um so die MeSA-Emissionen bzw. die erhöhten SAG-Gehalte zu begründen.

Attaran et al. (2009) beschrieben, dass bei *Arabidopsis* die durch avirulente *P. syringae* Pathogene induzierten MeSA-Emissionen von einer transienten JA-Akkumulation reguliert werden. In der vorliegenden Arbeit war der endogene JA-Gehalt nach fünf Tagen der Infektion gering (vgl. Kapitel 3.8.4). Ein Hinweis für das Fehlen der Induktion der JA-Signalkaskade ist die nicht induzierte JIP23-Expression (Tab. 17b und 18b) und die nicht nachweisbaren TMTT-Emissionen. Für *Arabidopsis* wurde gezeigt, dass TMTT-Emissionen von der Biosynthese und der Signalwirkung von JA getriggert werden (Attaran et al., 2008).

Es gibt aber auch Hinweise darauf, dass die JA-Signalkaskade durch den Pathogenbefall induziert wurde, da die Genexpression von JRG erhöht wurde (Tab. 17b). Dies zeigt, dass dies sehr komplex ist und nur durch eine detailliertere Untersuchung der JA-Konzentrationen sowie der Genexpressionen geklärt werden kann, ob und inwieweit es zu einer JA-Signalinduktion kam.

Dass JA einen Einfluss auf die Bildung der MeSA-Emissionen besitzt wurde durch die Zugabe von MeJA auf bereits Pathogen infizierte Gerstenpflanzen gezeigt. Durch die Zugabe von MeJA wurden die durch den Pathogenbefall induzierten MeSA-Emissionen erhöht (Abb. 28). JA könnte somit antagonistisch auf SA wirken, indem es die Expression der SA-Methyltransferase triggert und so die Bildung von SA zu MeSA fördert (Ament et al., 2004; Filella et al., 2006; Koo et al., 2007; Attaran et al., 2009). Es ist aber auch nicht auszuschließen, dass durch JA vermehrt SA gebildet wird und SA direkt u. a. zu MeSA-Emissionen umgewandelt wird. Für Pappelpflanzen wurde dagegen nachgewiesen, dass MeSA-Emissionen durch exogen appliziertes MeJA reduziert werden (Behnke et al., 2011).

Es muss beachtet werden, dass der hier durchgeführte Pathogenbefall mit anschließender MeJA-Zugabe ein Einzelexperiment darstellt. Die Wirkung der Pflanzenhormone JA und SA aufeinander müsste für Gerste mit weiteren Wiederholungen untersucht werden, wobei die Menge an MeJA sowie die Zeitpunkte der MeJA-Applikation variiert werden sollten. Die JA-SA-Interaktion ist abhängig von der jeweiligen relativen Konzentration jedes Hormons. Geringe JA- und SA-Konzentrationen führten bei *Arabidopsis* z.B. zu einem synergetischen Effekt in der Expression der PR-Proteine. Hohe Konzentrationen beider Hormone führten jedoch zu antagonistischen Effekten (Mur et al., 2006). Auch die Reihenfolge der zeitlichen Applikation von JA bzw. SA soll eine wichtige Rolle in der Signalinteraktion von JA und SA einnehmen (Koornneef et al., 2008). Inwieweit die jeweilige Konzentration der Hormone und die Zeitpunkte ihrer Applikation auch eine Rolle für die Induktion der SA-Methyltransferase spielen, um MeSA-Emissionen zu bilden, bleibt zu klären.

Auch eine Wirkung anderer Signalmoleküle, wie Ethylen muss zusätzlich berücksichtigt werden. Ethylen und SA regulieren nach Ozonexposition die Blattschäden (Pell et al., 1997; Rao und Davis, 2001; Overmyer et al., 2003). Bei Tabak ist ein positiver Einfluss von Ethylen auf die SA-Biosynthese während Ozonexposition nachgewiesen (Ogawa et al., 2005).

Weder nach Ozonexposition noch nach dem durchgeführten Pathogenbefall mit *P. syringae* pv. *syringae* wurde von den Gerstensorten TMTT emittiert. Acyclische Homoterpene, wie das TMTT sind häufig emittierte Verbindungen nach einem Herbivorenbefall (Holopainen, 2004). Demnach könnten die ausschließlich nach MeJA-Exposition gefundenen TMTT-Emissionen typisch für einen Herbivorenbefall und somit ein Anzeichen für Herbivorie sein. Dies ist konsistent dazu, dass auch Tabakpflanzen nach einer Ozonexposition kein TMTT emittieren (Heiden et al., 1999b). Es gibt aber auch Pflanzen die nach Ozonexposition TMTT emittieren. Versuche von Vuorinen et al. (2004) zeigten für Limabohnenpflanzen nach Ozonexposition TMTT-Emissionen. Auch *Arabidopsis* emittiert nach einem Pathogenbefall mit *P. syringae* TMTT (Attaran et al., 2008; Herde et al., 2008). Die TMTT-Emissionen hängen dabei von der Biosynthese und der Signalwirkung von JA und nicht von SA ab (Attaran et al., 2008). Dies könnte auch die in dieser Arbeit nicht nachweisbaren TMTT-Emissionen sowohl nach Ozonexposition als auch nach dem Pathogenbefall erklären, da in beiden Fällen nur geringe JA-Konzentrationen nachweisbar waren (Tab. 15; Kapitel 3.8.4).

Eine generelle Aussage, dass TMTT-Emissionen ausschließlich nach Herbivorie nachweisbar sind kann nicht getroffen werden. Die von *Medicago truncatula* herbivore-induzierten TMTT-Emissionen sind direkt von der Aktion von JA, Ethylen und Calcium abhängig (Arimura et al., 2008). Für Tomatenpflanzen wird nach Herbivorie dagegen SA eine wichtige Rolle in der Induktion der TMTT-Emissionen zugeschrieben (Ament et al., 2006). Inwieweit JA oder SA für die Induktion der TMTT-Emissionen für Gerste nach Herbivorie eine entscheidene Rolle spielen bleibt zu klären. Dabei sollte zunächst untersucht werden, ob TMTT-Emissionen tatsächlich nach Herbivorie nachweisbar sind.

Nach einem Pathogenbefall scheint dagegen hauptsächlich die Biosynthese und Signalwirkung von JA eine entscheidende Rolle in der Induktion der TMTT-Emissionen einzunehmen (Attaran et al., 2008). Ob nun für Gerste generell nach einem Pathogenbefall keine TMTT-Emissionen nachweisbar sind und inwieweit dies mit den JA-Gehalten korreliert, müsste mit weiteren Pathogenen untersucht werden.

4.2.4.b) Genexpression nach Ozonexposition und Pathogeninfektion

Um zu untersuchen, inwieweit die pflanzlichen Reaktionen auf einen realen Pathogenbefall und auf eine Ozonexposition auf Genebene vergleichbar waren, wurde die Expression pathogenspezifisch induzierter Gene untersucht.

Das PR-Protein PR-1b stellt ein klassisches PR-Protein dar, wobei seine Expression durch Pathogene induziert wird (Muradov et al., 1993). Durch die Ozonexposition wurde die PR-1b-Genexpression erhöht (Tab. 17b). Zwar wurde die PR-1b-Genexpression nur einmal je Sorte gemessen, jedoch wiesen alle drei alten Gerstensorten im Vergleich zu den modernen Sorten eine höhere Expression auf (Tab. 17b). Versuche von Muradov et al. (1993) zeigten für Gerstensorten mit unterschiedlich starker Mehлтаuresistenz eine unterschiedlich starke PR-1b-Genexpression. Die resistente Sorte besitzt dabei eine stärkere PR-1b-Expression als die anfällige Sorte. Daher könnten auch in der vorliegenden Arbeit die alten Sorten resistenter als die modernen Sorten gegenüber Pathogenen sein. Jedoch ist dies nicht in Übereinstimmung mit der Mehлтаuresistenz dieser Sorten (Tab. 4). Die erhöhte PR-1b-Genexpression spiegelt sich demnach nicht an der Resistenz für Mehltau wider.

Die Untersuchung der PR-1b-Genexpression der mit *P. syringae* pv. *syringae* infiltrierten Sorte BCC 173 zeigte nur eine geringe Induktion der PR-1b-Genexpression (Tab. 18b). Allerdings wurde die Genanalyse nach Pathogenbefall zu einem sehr späten Zeitpunkt durchgeführt (5 Tage nach Beginn der Infektion mit *P. syringae* pv. *syringae*) und die Analyse erfolgte nur einmal.

In der Literatur wird häufig ein Signaleffekt von SA auf die Induktion der PR-Expression beschrieben. Nach einer Pathogenerkennung kommt es in den Pflanzen zu einer SA-Akkumulation, wobei über SA die Transkription von PR-Proteinen induziert wird (z.B. Vlot et al., 2009; Pieterse et al., 2009). Da für keine Gerstensorte SA nachweisbar war (< 7 ng/g FG) könnte eine Signalwirkung von SA auch bei einer kleinen Konzentration unterhalb von 7 ng/g FG stattfinden und/oder es besteht eine Signalwirkung über SAG. Bis dato ist es jedoch unklar, ob SAG eine biologisch aktive Form darstellt (Dempsey et al., 2011). In vielen Untersuchungen wird angenommen, dass SAG inaktiv ist und zu SA umgewandelt werden muss, um Abwehrmechanismen zu induzieren (Hennig et al., 1993; Dempsey und Klessig, 1994). In Reis wurde dagegen festgestellt, dass die Umwandlung von SA zu SAG essentiell für die Ausbildung der Resistenz gegenüber einem Befall mit dem Pilz *Magnaporthe grisea* ist (Umemura et al., 2009). SAG könnte daher wichtig für die Induktion der PR-

Genexpression sein. So konnte bei Tabak SAG langsam den oxidativen Burst aktivieren (Kawano et al., 2004).

Vallélian-Bindschedler et al. (1998) beschrieben, dass die Induktion der PR-Proteine bei Gerste (Kultivar Golden Promise) nach dem Befall mit drei verschiedenen Pathogenarten nicht mit einer SA-Akkumulation verbunden ist. Die Nachweisgrenze lag dort ähnlich wie in dieser Arbeit bei 4 ng/g FG (Meuwly und Métraux, 1993). Die Rolle von SAG für die Resistenz gegen Pathogene von Gerste müsste in weiteren Arbeiten untersucht werden.

Es könnten auch andere Signalmoleküle, wie Ethylen (Kangasjärvi et al., 1994; Vallélian-Bindschedler et al., 1998; Tamaoki, 2008) oder Abscisinsäure (Vallélian-Bindschedler et al., 1998) bei Gerste eine bedeutende Rolle in der Resistenz gegen Pathogene spielen.

Neben der Genexpression des PR-1b wurde auch die Genexpression der PR-Proteine LTP und TH näher untersucht. LTP wirken toxisch gegenüber bakteriellen Pathogenen und TH gegenüber pilzlichen Pathogenen (Molina und Garcia-Olmedo, 1993; Molina et al., 1993; Garcia-Olmedo et al., 1995 und 1996).

In dieser Arbeit zeigt die deutlich erhöhte LTP-Expression nach der Infektion mit *P. syringae* pv. *syringae* (Tab. 18b) eine typische Reaktion nach einem Bakterienbefall (Garcia-Olmedo et al., 1996).

Daher kann anhand des Vergleichs der Genexpressionsstärken der LTP und TH nach dem Pathogenbefall mit denen nach Ozonexposition daraus geschlossen werden, ob die angewendete Ozonexposition einen bakteriellen Pathogenbefall simuliert. Nach Ozonexposition wurde die TH-Expression erhöht, die LTP-Expression wurde nicht erhöht induziert (Tab. 17b und 18b). Dabei zeigen die beispielhaft näher untersuchten Sorten BCC 1479 und Barke eine unterschiedliche zeitliche Induktion der TH-Expression. Die TH-Expression der Sorte BCC 1479 war 3 Stunden nach der Ozonexposition erhöht und wurde 24 Stunden nach der Ozonexposition nicht mehr induziert. Barke wies dagegen eine erhöhte TH-Expression erst 24 Stunden nach der Ozonexposition auf (Tab. 17b und 18b).

Die erhöhte TH-Expression und die nicht erhöhte LTP-Expression nach Ozonexposition sprechen für eine ähnliche Reaktion wie nach einem pilzlichen Pathogenbefall (Molina und Garcia-Olmedo, 1993; Molina et al., 1993; Garcia-Olmedo et al., 1995 und 1996).

4.3 Schlussbetrachtung und Ausblick

Schlussbetrachtung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob sich die pflanzlichen Stressreaktionen verschiedener Gerstensorten im Laufe der Züchtung von Pflanzen in Richtung Hohertrag verändert wurden. Die pflanzlichen Stressreaktionen wurden dabei anhand von BVOC-Emissionen untersucht. Erstmals konnte gezeigt werden, dass die in dieser Arbeit untersuchten alten Landsorten von Gerste nach MeJA-Exposition stärkere Terpenoidemissionen als die modernen Hohertragsorten aufwiesen (Abb. 15 und 16). Nach Ozonexposition konnte eine stärkere Monoterpenemissionsrate für zwei alte Landsorten nachgewiesen werden (Abb. 24). Diese Ergebnisse sind erste Hinweise darauf, dass die Induktion des Sekundärstoffwechsels als Reaktion auf biotischen Stress in modernen Sorten reduziert ist. Allgemein ist zu beachten, dass die BVOC-Emissionsraten eine hohe Variabilität innerhalb einer Gerstensorte aufwiesen (Abb. 16 und 24). Daher muss für die Analyse der BVOC-Emissionen die Replikanzahl entsprechend hoch gewählt werden ($n > 6$).

Die gefundenen Unterschiede in den Emissionsstärken zwischen den Sorten konnten sowohl nach MeJA-Exposition als auch nach Ozonexposition nicht anhand ergänzender Genexpressionsanalysen von emissionsrelevanten Enzymen erklärt werden. Um die Unterschiede in den Emissionsraten der Sorten durch Schritte in den Stoffwechselwegen zu erklären, wären Microarray-Analysen sinnvoll.

Ausblick

Diese Arbeit hatte zum Ziel die Stressreaktionen von modernen Hohertragsorten mit denen ihrer Vorfahren zu vergleichen. In den vorangegangenen Abschnitten sind schon einige Ansatzpunkte für weiterführende Experimente genannt, die sich durch die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse ergeben.

So könnte untersucht werden, ob die induzierten Emissionen und Emissionsstärken durch die Expositionen mit MeJA oder Ozon wirklich mit denen nach einem Schädlingsbefall vergleichbar sind. Dabei müssten auch unterschiedliche Schädlingsarten betrachtet werden.

Neben dem Vergleich des Emissionsmusters nach einem Schädlingsbefall und den in dieser Arbeit angewendeten abiotischen Elicitoren sollte besonders die ökologische Relevanz der Emissionen auf Schädlinge kontrolliert werden. Hier müsste zum einen untersucht werden, ob Schädlinge Gerstenpflanzen mit höheren Emissionsraten meiden oder in ihrem Wachstum inhibiert sind.

Zum anderen müsste untersucht werden, ob Feinde der Schädlinge durch erhöhte Emissionsraten angelockt werden und diese dann auch wirklich fressen (Hoballah und Turlings, 2001; Coleman et al., 1999; van Loon et al., 2000; Kessler und Baldwin, 2001). In diesem Zusammenhang sollte auch überprüft werden, ob durch die Emissionen zusätzlich weitere Schädlinge angelockt werden (Degenhardt et al., 2003; Bukovinszky et al., 2005) und ob durch die BVOC es zu einer veränderten Insektenstruktur von Generalisten zu vermehrten Spezialisten kommt (van Zandt und Agrawal, 2004; Poelman et al., 2008). Von Wichtigkeit wäre, wie lange die BVOC-Emissionen während/nach einem Schädlingsbefall andauern. Eine kontinuierliche Abgabe der BVOC kann bedeuten, dass die Prädatoren diese BVOC ignorieren (Degenhardt et al., 2003) oder dass ein Parasitismus der angelockten Parasitoide aufgrund eines zu späten Entwicklungsstadium der Beute nicht mehr stattfinden kann (Puente et al., 2008). Um diese ökologische Relevanz der BVOC-Emissionen zu testen, würden sich Wahlversuche mit Schädlingen und deren natürlichen Feinde oder idealerweise Versuche im Freiland eignen.

Des Weiteren muss eine Interaktion zwischen Pflanzen durch BVOC-Emissionen beachtet werden. Von Bäumen emittiertes Isopren kann z.B. die Anlockung der Parasitoide zu den BVOC der befallenen Pflanzen reduzieren (Loivamäki et al., 2008).

Nach der Untersuchung der ökologischen Relevanz der BVOC-Emissionen müssten die Mechanismen identifiziert werden, die für die Reduzierung der Terpenoidemissionen der Hohertragsorten verantwortlich sind.

Diese Kenntnisse über das Muster, die Stärke der BVOC-Emissionen sowie die Aufklärung der hierfür verantwortlichen Mechanismen könnten genutzt werden, um Hohertragsorten wieder mit einer höheren Emissions- und somit einer verbesserten Abwehrantwort zu versehen. Neben der Quantität müsste zukünftig auch der Einfluss auf die Qualität der Samen durch eine verstärkte Emissionsantwort berücksichtigt werden.

Dies zeigt, dass der Ansatz, Pflanzen mit erhöhten Emissionen zu züchten noch viele Untersuchungen benötigt, um diese komplexen Interaktionen zu verstehen und so negative Effekte auf die Pflanzen-Umwelt-Beziehungen sowie *vice versa* ausschließen zu können.

5. Literatur

- Ament K, Kant MR, Sabelis MW, Haring MA und Schuurink RC (2004): Jasmonic acid is a key regulator of spider mite-induced volatile terpenoid and methyl salicylate emission in tomato. *Plant Physiology* 135: 2025-2037
- Ament K, Van Schie CC, Bouwmeester HJ, Haring MA und Schuurink RC (2006): Induction of a leaf specific geranylgeranyl pyrophosphate synthase and emission of (E,E)-4,8,12-trimethyltrideca-1,3,7,11-tetraene in tomato are dependent on both jasmonic acid and salicylic acid signaling pathways. *Planta* 224: 1197-1208
- Aquil S, Husaini AM, Abdin, MZ, und Rather GM (2009): Overexpression of the HMG-CoA reductase gene leads to enhanced artemisinin biosynthesis in transgenic *Artemisia annua* plants. *Planta Medica* 75: 1453-1458
- Arimura G, Garms S, Maffei M, Bossi S, Schulze B, Leitner M, Mithöfer A und Boland W (2008): Herbivore-induced terpenoid emission in *Medicago truncatula*: concerted action of jasmonate, ethylene and calcium signaling. *Planta* 227: 453-464
- Attaran E, Rostás M und Zeier J (2008): *Pseudomonas syringae* elicits emission of the terpenoid (E,E)-4,8,12-trimethyl-1,3,7,11-tridecatetraene in *Arabidopsis* leaves via jasmonate signaling and expression of the terpene synthase TPS4. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21: 1482-1497
- Attaran E, Zeier TE, Griebel T und Zeier J (2009): Methyl salicylate production and jasmonate signalling are not essential for systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21: 954-971
- Bach TJ, Rogers DH und Rudney H (1986): Detergent-solubilization, purification, and characterization of membrane-bound 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase from radish seedlings. *European Journal of Biochemistry* 154: 103- 111
- Baldwin IT, Halitschke R, Kessler A und Schittko U (2001): Merging molecular and ecological approaches in plant-insect interactions. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 351-358
- Bate NJ und Rothstein SJ (1998): C₆-volatiles derived from the lipoxygenase pathway induce a subset of defense-related genes. *Plant Journal* 16: 561-569

- Beauchamp J, Wisthaler A, Hansel A, Kleist E, Miebach M, Niinemets Ü, Schurr U und Wildt J (2005): Ozone induced emissions of biogenic VOC from tobacco: relationships between ozone uptake and emission of LOX products. *Plant, Cell & Environment* 28: 1334–1343.
- Behnke K, Kleist E, Uerlings R, Wildt J, Rennenberg H und Schnitzler JP (2009): RNAi-mediated suppression of isoprene biosynthesis in hybrid poplar impacts ozone tolerance. *Tree Physiology* 13: 1-12
- Behnke K, Springer M, Schnitzler JP, Kiendler-Scharr A, Mentel T, Tillmann R, Andres S, Kleist E und Wildt J (2011): Emission of aromatic compounds from poplar. *Geophysical Research Abstracts* 13, EGU2011-3275, European Geosciences Union General Assembly, Vienna/Austria
- Beltrano J, Ronco MG, Montaldi ER und Carbone A (1998): Senescence of flag leaves and ears of wheat hastened by methyl jasmonate. *Journal of Plant Growth Regulation* 17: 53-57
- Bennett RN und Wallsgrave RM (1994): Secondary metabolites in plant defense-mechanisms. *New Phytologist* 127: 617-633.
- Benrey B, Calleja A, Rios L, Oyama K und Denno RF (1998): The effects of domestication of *Brassica* and *Phaseolus* on the interaction between phytophagous insects and parasitoids. *Biological Control* 11:130–140.
- Blée E (1998): Phytooxylipins and plant defense reactions. *Progress in Lipid Research* 37: 33-72
- Bohlmann H und Apel K (1987): Isolation and characterization of cDNAs coding for leaf-specific thionins closely related to endosperm-specific hordothionin of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Molecular and General Genetics* MGG 207: 446-454
- Bohlmann H, Clausen S, Behnke S, Giese H, Hiller C, Reimann-Philipp U, Schrader G, Barkholt V und Apel K (1988): Leaf-specific thionins of barley – a novel class of cell wall proteins toxic to plant-pathogenic fungi and possibly involved in the defence mechanism of plants. *The EMBO Journal* 7: 1559-1565
- Boland W, Hopke J, Donath J, Nüske J und Bublitz F (1995): Jasmonsäure- und Coronatin-induzierte Duftproduktion in Pflanzen. *Angewandte Chemie* 107: 1715-1717

- Botella-Pavía P, Besumbes O, Phillips MA, Carretero-Paulet L, Boronat A und Rodríguez-Concepción M (2004): Regulation of carotenoid biosynthesis in plants: evidence for a key role of hydroxymethylbutenyl diphosphate reductase in controlling the supply of plastidial isoprenoid precursors. *Plant Journal* 40: 188-199
- Boyko A und Kovalchuk I (2011): Genetic and epigenetic effects of plant-pathogen interactions: An evolutionary perspective. *Molecular Plant* 4: 1014-1023
- Bricchi I, Leitner M, Foti M, Mithöfer M, Boland W und Maffei ME (2010): Robotic mechanical wounding (MecWorm) versus herbivore-induced responses: early signaling and volatile emission in Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.). *Planta* 232: 719-729
- Bukovinszky T, Gols R, Posthumus MA, Vet LEM und van Lenteren JC (2005): Variation in plant volatiles and attraction of the parasitoid *Diadegma semiclausum* (Hellén). *Journal of Chemical Ecology* 31: 461-480
- Bundessortenamt (2011): Getreide: Gerste (*Hordeum vulgare* L. sensu lato). Beschreibende Sortenliste. Getreide. Mais. Öl- und Faserpflanzen. Leguminosen. Rüben. Zwischenfrüchte: 20-50. Osterfelddamm 80, 30627 Hannover
- Burton RA, Shirley NJ, King BJ, Harvey AJ und Fincher GB (2004): The *CesA* gene family of barley. Quantitative analysis of transcripts reveals two groups of co-expressed genes. *Plant Physiology* 134: 224-236
- Carrasco L, Vazquez D, Hernandez-Lucas C, Carbonero P und Garcia-Olmedo F (1981): Thionins: plant peptides that modify membrane permeability in cultured mammalian cells. *European Journal of Biochemistry* 116: 185-189
- Carretero-Paulet L, Cairó A, Botella-Pavía P, Besumbes O, Campos N, Boronat A und Rodríguez-Concepción M (2006): Enhanced flux through the methylerythritol 4-phosphate pathway in *Arabidopsis* plants overexpressing deoxyxylulose 5-phosphate reductoisomerase. *Plant Molecular Biology* 62: 683-695
- Chanda B, Xia Y, Mandal MK, Yu K, Sekine KT, Gao QM, Selote D, Hu Y, Stromberg A, Navarre D, Kachroo A und Kachroo P (2011): Glycerol-3-phosphate is a critical mobile inducer of systemic immunity in plants. *Nature Genetics* 43: 421-427
- Chen F, D'Auria JC, Tholl D, Ross JR, Gershenzon J, Noel JP und Pichersky E (2003): An *Arabidopsis thaliana* gene for methylsalicylate biosynthesis, identified by a biochemical genomics approach, has a role in defense. *Plant Journal* 36: 577-588

- Cheniclet C (1987): Effects of wounding and fungus inoculation on terpene producing systems of maritime pine. *Journal of Experimental Botany* 38: 1557-1572
- Cheong JJ und Choi YD (2003): Methyl jasmonate as a vital substance in plants. *Trends in Genetics* 19: 409-413
- Chini A, Fonseca S, Fernández G, Adie B, Chico JM, Lorenzo O, García-Casado G, López-Vidriero I, Lozano FM, Ponce MR, Micol JL und Solano R (2007): The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* 448: 666-671
- Coleman RA, Barker AM und Fenner M (1999): Parasitism of the herbivore *Pieris brassicae* L. (Lepidoptera, Pieridae) by *Cotesia glomerata* L. (Hymenoptera, Braconidae) does not benefit the host plant by reduction of herbivory. *Journal of Applied Entomology* 123: 171-177
- Cordoba E, Salmi M und Leòn P (2009): Unravelling the regulatory mechanisms that modulate the MEP pathway in higher plants. *Journal of Experimental Botany* 60: 2933-2943
- Croft KPC, Jüttner F und Slusarenko AJ (1993): Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Plant Physiology* 101: 13–24.
- D`Auria JC, Pichersky E, Schaub A, Hansel A und Gershenzon J (2007): Characterization of BAHD acyltransferase responsible for producing the green leaf volatile (Z)-3-hexen-1-yl acetate in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 49: 194-207
- Degenhardt J, Gershenzon J, Baldwin IT und Kessler A (2003): Attracting friends to feast on foes: engineering terpene emission to make crop plants more attractive to herbivore enemies. *Current Opinion in Biotechnology* 14: 169-176
- Dempsey DA und Klessig DF (1994): Salicylic acid, active oxygen species and systemic acquired resistance in plants. *Trends Cell Biology* 4: 334-338
- Dempsey DA, Vlot AC, Wildermuth MC und Klessig DF (2011): Salicylic acid biosynthesis and metabolism. *The American Society of Plant Biologists. The Arabidopsis Book, Metabolism, Number 9: e0156*
- Deng W, Hamilton-Kemp T, Nielsen M, Andersen RA, Collins GB und Hildebrand F (1993): Effects of six-carbon aldehydes and alcohols on bacterial proliferation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41: 506-510

- Diaz I, Carmona MJ und Garcia-Olmedo F (1992): Effects of thionins on β -glucuronidase in vitro and in plant protoplasts. *FEBS Letters* 296: 279-282
- Dicke M (1994): Local and systemic production of volatile herbivore-induced terpenoids: their role in plant-carnivore mutualism. *Journal of Plant Physiology* 143: 465-472
- Dicke M, van Beek TA, Posthumus MA, Ben Dom N, van Bokhoven H und De Groot AE (1990): Isolation and identification of volatile kairomone that affects acarine predator-prey interactions. *Journal of Chemical Ecology* 16: 381-396
- Dicke M, Gols R, Ludeking D und Posthumus M (1999): Jasmonic acid and herbivory differently induce carnivore-attracting plant volatiles in lima bean plants. *Journal of Chemical Ecology* 25: 1907-1922
- Dubey VS, Bhalla R und Luthra R (2003): An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. *Journal of Biosciences* 28: 637-646
- Eckey-Kaltenbach H, Ernst D, Heller W und Sandermann Jr H (1994): Biochemical plant responses to ozone. IV. Cross-induction of defensive pathways in parsley plants. *Plant Physiology* 104: 67-74
- Edreva A (2005): Pathogenesis-related proteins: Research progress in the last 15 years. *General and Applied Plant Physiology* 31: 105-124
- Eisenreich W, Rohdich F und Bacher A (2001): Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends Plant Science* 6: 78-84
- Elliott S und Loudon A (1987): Effects of monoterpene odors on food selection by red deer calves (*Cervus elaphus*). *Journal of Chemical Ecology* 13: 1343-1349
- Enfissi EMA, Fraser PD, Lois LM, Boronat A, Schuch W und Bramley PM (2005): Metabolic engineering of the mevalonate and non-mevalonate isopentenyl diphosphate-forming pathways for the production of health-promoting isoprenoids in tomato. *Plant Biotechnology Journal* 3: 17-27
- Estévez JM, Cantero A, Reindl A, Reichler S und Leòn P (2001): 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants. *Journal of Biological Chemistry* 276: 22901-22909
- Fall R (2003): Abundant oxygenates in the atmosphere: A biochemical perspective. *Chemical Reviews* 103: 4941-4951

- Fall R, Karl T, Hansel A, Jordan A und Lindinger W (1999): Volatile organic compounds emitted after leaf wounding: On-line analysis by proton-transfer-reaction mass spectrometry. *Journal of Geophysical Research* 104: 15963-15974
- Farag MA und Paré PW (2002): C₆-Green leaf volatiles trigger local and systemic VOC emissions in tomato. *Phytochemistry* 61: 545-554
- Farentinos RC, Capretta PJ, Kepner RE und Littlefield VM (1981): Selective herbivory in tassel-eared squirrels: Role of monoterpenes in Ponderosa pines chosen as feeding trees. *Science* 213: 1273-1275
- Farmer EE (2007): Jasmonate perception machines. *Nature* 448: 659-660
- Farmer EE und Ryan CA (1990): Interplant communication: Airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87: 7713-7716
- Farmer EE und Ryan CA (1992): Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell* 4: 129-134
- Feussner I und Wasternack C (2002): The lipoxygenase pathway. *Annual Review of Plant Biology* 53: 275-297
- Feussner I, Wasternack C, Kindl H und Kühn H (1995): Lipoxygenase-catalyzed oxygenation of storage lipids is implicated in lipid mobilization during germination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 11849–11853.
- Filella I, Peñuelas J und Llusà J (2006): Dynamics of the enhanced emissions of monoterpenes and methyl salicylate, and decreased uptake of formaldehyde, by *Quercus ilex* leaves after application of jasmonic acid. *New Phytologist* 169: 135-144
- Filella I, Peñuelas J und Ribas A (2005): Using plant biomonitors and flux modelling to develop O₃ dose-response relationship in Catalogna. *Environmental Pollution* 134: 145-151
- Folkers A (2002): Sauerstoffhaltige flüchtige organische Verbindungen in der Troposphäre: Entwicklung und Anwendung einer gaschromatographischen Nachweismethode. *Berichte des Forschungszentrums Jülich, JUEL-3998*
- Folkers A, Hüve K, Ammann C, Dindorf T, Kesselmeier J, Kleist E, Kuhn U, Uerlings R und Wildt J (2008): Methanol emissions from deciduous tree species: dependence on temperature and light intensity. *Plant Biology* 10: 1-11

- Frey M, Stettner C, Paré PW, Schmelz EA, Tumlinson JH und Gierl (2000): An herbivore elicitor activates the gene for indole emission in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 14801-14806
- Frey M, Spiteller D, Boland W und Gierl A (2004): Transcriptional activation of IGL, the gene for indole formation in *Zea mays*: a structure-activity study with elicitor-active N-acyl glutamines from insects. *Phytochemistry* 65: 1047-1055
- Funk C, Lewinsohn E, Stofer-Vogel B, Steele CL und Croteau R (1994): Regulation of oleoresinosis in Grand fir (*Abies grandis*). Coordinate induction of monoterpene and diterpene cyclases and two cytochrome P450-dependent diterpenoid hydroxylases by stem wounding. *Plant Physiology* 106: 999-1005
- García-Olmedo F, Molina A, Segura A und Moreno M (1995): The defensive role of non-specific lipid-transfer proteins in plants. *Trends in Microbiology* 3: 72-74
- García-Olmedo F, Molina A, Segura A, Moreno M, Castagnaro A, Titarenko E, Rodríguez-Palenzuela P, Piñeiro M und Diaz I (1996): Engineering plants against pathogens: A general strategy. *Field Crops Research* 45: 79-84
- Garcion C und Mètraux JP (2006): Salicylic acid. In: Hedden P, Thomas SG (Eds.). *Plant Hormone Signaling. Annual Plant Reviews* 24: 229-255, Oxford: Wiley-Blackwell Publishing Ltd.
- Gardner HW (1991): Recent investigations into the lipoxygenase pathway of plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1084: 221-2398
- Gershenzon J und Croteau R (1991): Terpenoids. In: Charlwood BV, Banthorpe DV (Eds.). San Diego, New York (Academic Press). *Methods in Plant Biochemistry* 7: 165-219
- Gershenzon J und Dudareva N (2007): The function of terpene natural products in the natural world. *Nature Chemical Biology* 3: 408-414
- Glazebrook J (2005): Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 43: 205-227
- Goldammer T (2008): Barley. In: *Brewer's Handbook. The Complete Book to Brewing Beer. Sec. Edition.* Apex Publishers. Chapter 2 Barley Malts: 21-13
- Gols R, Bukovinszky T, van Dam NM, Dicke M, Bullock JM und Harvey JA (2008): Performance of generalist and specialist herbivores and their endoparasitoids differs on cultivated and wild *Brassica* populations. *Journal of Chemical Ecology* 34: 132-143

- Gondet L, Weber T, Maillot-Vernier P, Benveniste P und Bach TJ (1992): Regulatory role of microsomal 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in a tobacco mutant that overproduces sterols. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 186: 888-893
- Goodman RN und Novacky AJ (1994): The hypersensitive reaction in plants to pathogens. A resistance phenomenon. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA
- Gouinguéné SP, Degen T und Turlings TCJ (2001): Variability in herbivore-induced odour emissions among maize cultivars and their wild ancestors (teosinte). *Chemoecology* 11: 9-16
- Gouinguéné SP und Turlings TCJ (2002): The effects of abiotic factors on induced volatile emissions in corn plants. *Plant Physiology* 129: 1296-1307
- Grechkin A (1998): Recent developments in biochemistry of plant lipoxygenase pathway. *Progress in Lipid Research* 37: 317-352
- Grün S, Frey M und Gierl A (2005): Evolution of the indole alkaloid biosynthesis in the genus *Hordeum*: Distribution of gramine and DIBOA and isolation of the Benzoxazinoid biosynthesis genes from *Hordeum lechleri*. *Phytochemistry* 66: 1264-1272
- Gryniewicz G, Achmatowicz O, Hennig J, Indulski J und Klessig DF (1993): Synthesis and characterization of the salicylic acid β -D-glucopyranoside. *Polish Journal of Chemistry* 67: 1251-1554
- Guenther AB, Zimmerman PR, Harley PC, Monson RK und Fall R (1993): Isoprene and monoterpene emission rate variability: model evaluation and sensitivity analyses. *Journal of Geophysical Research* 98: 12609-12617
- Ha SH, Lee SW, Kim YM und Hwang YS (2001): Molecular characterization of *Hmg2* gene encoding a 3-hydroxy-methylglutaryl-CoA reductase in rice. *Molecules and Cells* 11: 295-302
- Hammond-Kosack KE und Jones JD (1996): Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8: 1773-1791
- Hatanaka A (1993): The biogeneration of green odour by green leaves. *Phytochemistry* 34: 1201-1218

- Hatanaka A, Kajiwara T und Sekiya J (1987): Biosynthetic pathway for C₆-aldehydes formation from linolenic acid in green leaves. *Chemistry and Physics of Lipids* 44: 341-361
- Heath MC (1987): Evolution of plant resistance and susceptibility to fungal invaders. *Canadian Journal of Plant Pathology* 9: 389-397
- Heiden AC, Hoffmann T, Kahl J, Kley D, Klockow D, Langebartels C, Mehlhorn H, Sandermann Jr H, Schraudner M, Schuh G und Wildt J (1999b): Emission of volatile organic compounds from ozone-exposed plants. *Ecological Applications* 9:1160-1167
- Heiden AC, Kobel K, Langebartels C, Schuh-Thomas G und Wildt J (2003): Emissions of oxygenated volatile organic compounds from plants, part I: Emissions from lipoxygenase activity. *Journal of Atmospheric Chemistry* 45: 143-172
- Heiden AC, Kobel K und Wildt J (1999a): Einfluss verschiedener Stressfaktoren auf die Emission pflanzlicher flüchtiger organischer Verbindungen. Berichte des Forschungszentrum Jülich; 3622. D 464 (Dissertation Universität-GH Duisburg). Forschungszentrum Jülich GmbH; Jülich, Deutschland
- Heil M und Bueno JCS (2007): Within-plant signaling by volatiles leads to induction and priming of an indirect plant defense in nature. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 5467–5472
- Heil M, Koch T, Hilpert A, Fiala B, Boland W und Linsenmair KE (2001): Extrafloral nectar production of the ant-associated plant, *Macaranga tanarius*, is an induced, indirect, defensive response elicited by jasmonic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 1083-1088
- Hemmerlin A, Hoeffler JF, Meyer O, Tritsch D, Kagan IA, Grosdemange-Billiard C, Rohmer M und Bach TJ (2003): Cross-talk between the cytosolic mevalonate and the plastidial methylerythritol phosphate pathways in Tobacco Bright Yellow-2 cells. *Journal of Biological Chemistry* 278: 26666-26676
- Hennig J, Malamy J, Gryniewicz G, Indulski J und Klessig DF (1993): Interconversion of salicylic acid signal and its glucoside in tobacco. *Plant Journal* 4: 593-600
- Herde M, Gärtner K, Köllner TG, Fode B, Boland W, Gershenzon J, Gatz C und Tholl D (2008): Identification and regulation of TPS04/GES, an *Arabidopsis* geranylinalool synthase catalyzing the first step in the formation of the insect-induced volatile C₁₆-homoterpene TMTT. *Plant Cell* 20: 1152-1168

- Herrmann KM (1995a): The shikimate pathway - early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *Plant Cell* 7: 907-919.
- Herrmann KM (1995b): The shikimate pathway as an entry to aromatic secondary metabolism. *Plant Physiology* 107: 7-12
- Herrmann KM und Weaver LM (1999): The shikimate pathway. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 473-503.
- Hildebrand DF, Brown GC, Jackson DM und Hamilton-Kemp TR (1993): Effects of some leaf-emitted volatile compounds on aphid population increase. *Journal of Chemical Ecology* 19: 1875-1887
- Himejima M, Hobson KR, Otsuka T, Wood DL und Kubo I (1992): Antimicrobial terpenes from oleoresin of Ponderosa pine tree (*Pinus ponderosa*): a defense mechanism against microbial invasion. *Journal of Chemical Ecology* 18: 1809-1818
- Hoballah MEF und Turlings TCJ (2001): Experimental evidence that plants under caterpillar attack may benefit from attracting parasitoids. *Evolutionary Ecology Research* 3: 553–565.
- Holopainen JK (2004): Multiple functions of inducible plant volatiles. *Trends in Plant Science* 9: 529-533
- Hopke J, Donath J, Blechert S und Boland W (1994): Herbivore-induced volatiles: the emission of acyclic homoterpenes from leaves of *Phaseolus lunatus* and *Zea mays* can be triggered by a β -glucosidase and jasmonic acid. *FEBS Letters* 352: 146-150
- Hora TS und Baker R (1970): A volatile factor in soil fungistasis. *Nature* 225: 1071-1072.
- Howe GA und Jander G (2008): Plant immunity to insect herbivores. *Annual Review of Plant Biology* 59: 41-66
- Huang J, Cardoza YJ, Schmelz EA, Raina R, Engelberth J und Tumlinson JH (2003): Differential volatile emissions and salicylic acid levels from tobacco plants in response to different strains of *Pseudomonas syringae*. *Planta* 217: 767-775
- Hüve K, Christ MM, Kleist E, Uerlings R, Niinemets Ü, Walter A und Wildt J (2007): Simultaneous growth and emission measurements demonstrate an interactive control of methanol release by leaf expansion and stomata. *Journal of Experimental Botany* 58: 1-11
- Jansen RMC, Hofstee JW, Wildt J, Verstappen FWA, Bowmeester HJ und van Henten EJ (2009): Induced plant volatiles allow sensitive monitoring of plant health status in greenhouses. *Plant Signaling & Behaviour* 4: 824 - 829

- Jaspers P, Kollist H, Langebartels C und Kangasjärvi J (2005): Plant responses to ozone. In: Antioxidants and reactive oxygen species in plants (Smirnoff, N., ed). Blackwell Publishing, Oxford: 268-292
- Jung HW, Tschaplinski TJ, Wang L, Glazebrook J und Greenberg JT (2009): Priming in systemic plant immunity. *Science* 324: 89-91
- Kärenlampi SO, Airaksinen K, Miettinen ATE, Kokko HI, Holopainen JK, Kärenlampi LV und Karjalainen RO (1994): Pathogenesis-related proteins in ozone-exposed Norway spruce [*Picea abies* (Karst) L.]. *New Phytologist* 126: 81-89
- Kangasjärvi J, Jaspers P und Kollist H (2005): Signalling and cell death in ozone-exposed plants. *Plant, Cell & Environment* 28: 1021-1036
- Kangasjärvi J, Talvinen J, Utriainen M und Karjalainen R (1994): Plant defence systems induced by ozone. *Plant, Cell & Environment* 17: 783-794
- Karban R und Baldwin IT (1997): *Induced Responses to Herbivory*. Chicago, IL: Univ. Chicago Press
- Kawano T, Tanaka S, Kadono T und Muto S (2004): Salicylic acid acts as a slow inducer of oxidative burst in tobacco suspension culture. *Zeitschrift für Naturforschung C* 59: 684-692
- Kesselmeier J und Staudt M (1999): Biogenic volatile organic compounds (VOC): An overview on emission, physiology and ecology. *Journal of Atmospheric Chemistry* 33: 23-88
- Kessler A und Baldwin IT (2001): Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science* 291: 2141-2144
- Kessler A und Baldwin IT (2002): Plant Responses to insect herbivory: The emerging molecular analysis. *Annual Review of Plant Biology* 53: 299-328
- Kim YB, Kim SM, Kang MK, Kuzuyama T, Lee JK, Park SC, Shin SC und Kim SU (2009): Regulation of resin acid synthesis in *Pinus densiflora* by differential transcription of genes encoding multiple 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase and 1-hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl 4-diphosphate reductase genes. *Tree Physiology* 29: 737-749

- Kim SM, Kuzuyama T, Chang YJ, Song KS und Kim SU (2006): Identification of class 2 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase and 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase genes from *Ginkgo biloba* and their transcription in embryo culture with respect to ginkgolide biosynthesis. *Planta Medica* 72: 234-240
- Kleinig H (1989): The Role of Plastids in Isoprenoid Biosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40: 39-59
- Knüpfper H und van Hintum TH (1995): The Barley Core Collection – an international effort. In: Hodgkin T, Brown AHD, van Hintum TH und Morales EAV (Eds.), *Core Collections of Plant Genetic Resources*. John Wiley and Sons, UK: 171-178
- Koch I (2008): Analytik von ozoninduzierten phenolischen Sekundärmetaboliten in *Nicotiana tabacum* L. cv Bel W3 mittels LC-MS. Dissertation, Schriften des Forschungszentrums Jülich. Reihe Energie & Umwelt. Energy & Environment. Band/Volume 26. Forschungszentrum Jülich GmbH
- Koch JR, Creelman RA, Eshita SM, Seskar M, Mullet JE und Davis KR (2000): Ozone sensitivity in hybrid poplar correlates with insensitivity to both salicylic acid and jasmonic acid: The role of programmed cell death in lesion formation. *Plant Physiology* 123: 487-96
- Koch T, Krumm T, Jung V, Engelberth J und Boland W (1999): Differential induction of plant volatile biosynthesis in the Lima bean by early and late intermediates of the Octadecanoid-signaling pathway. *Plant Physiology* 121: 153–162
- Koch JR, Scherzer AJ, Eshita SM und Davis KR (1998): Ozone sensitivity in hybrid poplar is correlated with a lack of defense-gene activation. *Plant Physiology* 118: 1243-52
- Koeduka T, Stumpe M, Matsui K, Kajiwara T und Feussner I (2003): Kinetics of barley FA hydroperoxide lyase are modulated by salts and detergents. *Lipids* 38: 1167-1172
- Köllner TG, Held M, Lenk C, Hiltbold I, Turlings TCJ, Gershenzon J und Degenhardt J (2008): A maize (*E*)- β -caryophyllene synthase implicated in indirect defense responses against herbivores is not expressed in most American maize varieties. *Plant Cell* 20: 482-494
- Kombrink E und Somssich IE (1995): Defense responses of plants to pathogens. In: Callow JA, Andrews JH und Tommerup IC (Eds.). *Advances in Botanical Research (incorporating Advances in Plant Pathology)*, Academic Press, London, UK, Vol. 21: 1-34

- Koo YJ, Kim MA, Kim EH, Song JT, Jung C, Moon JK, Kim JH, Seo HS, Song SI, Kim JK, Lee JS, Cheong JJ und Choi YD (2007): Overexpression of salicylic acid carboxyl methyltransferase reduces salicylic acid-mediated pathogen resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 64: 1-15
- Koornneef A, Leon-Reyes A, Ritsema T, Verhage A, Den Otter FC, van Loon LC und Pieterse CMJ (2008): Kinetics of Salicylate-Mediated Suppression of Jasmonate Signaling Reveal a Role for Redox Modulation. *Plant Physiology* 147:1358-1368
- Kramell R, Miersch O, Atzorn R, Parthier B und Wasternack C (2000): Octadecanoid-derived alteration of gene expression and the "Oxylipin signature" in stressed barley leaves. Implications for different signaling pathways. *Plant Physiology* 123: 177-187
- Kreuzwieser J, Schnitzler JP und Steinbrecher R (1999): Biosynthesis of organic compounds emitted by plants. *Plant Biology* 1: 149–159.
- Kriechbaumer V, Weigang L, Fiebelmann A, Letzel T, Frey M, Gierl A und Glawischnig E (2008): Characterisation of the tryptophan synthase alpha subunit in maize. *BMC Plant Biology* 8: 44
- Lamb C und Dixon RA (1997): The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 251-275
- Lange BM, Wildung MR, McCaskill D und Croteau R (1998): A family of transketolases that directs isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 2100-2104
- Laudert D und Weiler EW (1998): Allene oxide synthase: a major control point in *Arabidopsis thaliana* octadecanoid signalling. *Plant Journal* 15: 675-684
- Laule O, Fürholz A, Chang HS, Zhu T, Wang X, Heifetz PB, Gruissem W und Lange M (2003): Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 6866–6871
- Lee JE, Kleinhofs A, Graner A, Wegener S, Parthier B und Löbner M (1997b): Genomic sequence and mapping of a methyl jasmonate-induced O-methyltransferase from barley (*Hordeum vulgare*). *DNA Sequence: the Journal of DNA Sequencing and Mapping* 7: 357-363

- Lee JE, Parthier B und Löbler M (1996): Jasmonate signalling can be uncoupled from abscisic acid signalling in barley: identification of jasmonate-regulated transcripts which are not induced by abscisic acid. *Planta* 199: 625-632
- Lee JE, Vogt T, Hause B und Löbler M (1997a): Methyl jasmonate induces an *O*-methyltransferase in barley. *Plant Cell Physiology* 38: 851-862
- Lewinsohn E, Gijzen M und Croteau R (1991): Defense mechanisms of conifers. Differences in constitutive and wound-induced monoterpene biosynthesis among species. *Plant Physiology* 96: 44-49
- Lichtenthaler HK (1999): The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 47-65
- Liu PP, von Dahl CC und Klessig DF (2011): The extent to which methyl salicylate is required for signaling systemic acquired resistance is dependent on exposure to light after the infection. *Plant Physiology* 157: 2216-26.
- Liu PP, Yang Y, Pichersky E und Klessig DF (2010): Altering expression of *Benzoic acid/Salicylic acid carboxyl Methyltransferase 1* compromises systemic acquired resistance and PAMP-triggered immunity in *Arabidopsis*. *Molecular plant-microbe interactions* 23: 82-90
- Löbler M und Lee J (1998): Jasmonate signalling in barley. *Trends in Plant Science* 3: 8-9
- Lois LM, Campos N, Rosa-Putra S, Danielsen K, Rohmer M und Boronat A (1998): Cloning and characterization of a gene from *Escherichia coli* encoding a transketolase-like enzyme that catalyzes the synthesis of D-1-deoxyxylulose 5-phosphate, a common precursor for isoprenoid, thiamine, and pyridoxol biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 2105-2110
- Lois LM, Rodríguez-Concepción M, Gallego F, Campos N und Boronat A (2000): Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: regulatory role of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase. *Plant Journal* 22: 503-513
- Loivamäki M, Mumm R, Dicke M und Schnitzler JP (2008) Isoprene interferes with the attraction of bodyguards by herbaceous plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 17430-17435

- Loughrin JH, Manukian A, Heath RR und Tumlinson JH (1995): Volatiles emitted by different cotton varieties damaged by feeding beet armyworm larvae. *Journal of Chemical Ecology* 21: 1217-1227
- Maffei ME, Mithöfer A und Boland W (2007): Before gene expression: early events in plant-insect interaction. *Trends in Plant Science* 12: 310-316
- Mahmoud SS und Croteau RB (2001): Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint by altering expression of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase and menthofuran synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 8915-8920
- Malamy J und Klessig DF (1992): Salicylic acid and plant disease resistance. *Plant Journal* 2: 643-654
- Matuszewski BK, Constanzer ML und Chavez-Eng CM (2003): Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Analytical Chemistry* 75: 3019-3030.
- Mauch-Mani B und Slusarenko AJ (1996): Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica*. *Plant Cell* 8: 203-212
- Maucher H, Hause B, Feussner I, Ziegler J und Wasternack C (2000): Allene oxide synthases of barley (*Hordeum vulgare* cv. Salome): tissue specific regulation in seedling development. *Plant Journal* 21: 199-213
- Maucher H, Stenzel I, Miersch O, Stein N, Prasad M, Zierold U, Schweizer P, Dorer C, Hause B und Wasternack C (2004): The allene oxide cyclase of barley (*Hordeum vulgare* L.) - cloning and organ-specific expression. *Phytochemistry* 65: 801-811
- Mayer KF, Martis M, Hedley PE, Simková H, Liu H, Morris JA, Steuernagel B, Taudien S, Roessner S, Gundlach H, Kubaláková M, Suchánková P, Murat F, Felder M, Nussbaumer T, Graner A, Salse J, Endo T, Sakai H, Tanaka T, Itoh T, Sato K, Platzer M, Matsumoto T, Scholz U, Dolezel J, Waugh R und Stein N (2011): Unlocking the barley genome by chromosomal and comparative genomics. *Plant Cell* 23: 1249-63
- McGarvey DJ und Croteau R (1995): Terpenoid metabolism. *Plant Cell* 7: 1015-1026

- Meuwly P und Métraux JP (1993): Ortho-anisic acid as internal standard for the simultaneous quantitation of salicylic acid and its putative biosynthetic precursors in cucumber leaves. *Analytical Biochemistry* 214: 500-505
- Miebach M (2008): Untersuchung von Zusammenhängen zwischen pflanzlichen Emissionen und pflanzeninternen Signalmolekülen und Enzymaktivitäten. Dissertation. Berichte des Forschungszentrum Jülich GmbH, 4062.
- Mithofer A, Wanner G und Boland W (2005): Effects of feeding *Spodoptera littoralis* on lima bean leaves. II. Continuous mechanical wounding resembling insect feeding is sufficient to elicit herbivory-related volatile emission. *Plant Physiology* 137: 1160-1168
- Molina A und Garcia-Olmedo F (1993): Developmental and pathogen-induced expression of three barley genes encoding lipid transfer proteins. *Plant Journal* 4: 983-991
- Molina A, Segura A und Garcia-Olmedo F (1993): Lipid transfer proteins (nsLTPs) from barley and maize leaves are potent inhibitors of bacterial and fungal plant pathogens. *FEBS Letters* 316: 119-122
- Moore KB und Oishi KK (1993): Characterization of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase activity during maize seed development, germination, and seedling emergence. *Plant Physiology* 101: 485-491
- Morris WL, Ducreux LJ, Hedden P, Millam S und Taylor MA (2006): Overexpression of a bacterial 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase gene in potato tubers perturbs the isoprenoid metabolic network: implications for the control of the tuber life cycle. *Journal of Experimental Botany* 57: 3007-3018
- Morrissey KL (2007): Biological and chemical induction of systemic resistance in the barley powdery mildew pathosystem. Dissertation, Schriften des Forschungszentrums Jülich. Reihe Umwelt/Environment. Volume 73. Jülich, Deutschland
- Mur LAJ, Kenton P, Atzorn R, Miersch O und Wasternack C (2006): The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. *Plant Physiology* 40: 249–262
- Muradov A, Petrasovits L, Davidson A und Scott KJ (1993): A cDNA clone for a pathogenesis-related protein 1 from barley. *Plant Molecular Biology* 23: 439-442

- Myung K, Hamilton-Kemp TR und Archbold DD (2007): Interaction with and effects on the profile of proteins of *Botrytis cinerea* by C₆ Aldehydes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 2182-2188
- Narváez-Vásquez J, Florin-Christensen J und Ryan CA (1999): Positional specificity of a phospholipase A activity induced by wounding, systemin, and oligosaccharide elicitors in tomato leaves. *The Plant Cell* 11: 2249-2260
- Oerke EC und Dehne HW (1997): Global crop production and the efficacy of crop protection - Current situation and future trends. *European Journal of Plant Pathology* 103: 203-215.
- Ogawa D, Nakajima N, Sano T, Tamaoki M, Aono M, Kubo A, Kanna M, Ioki M, Kamada H und Saji H (2005): Salicylic acid accumulation under O₃ exposure is regulated by ethylene in tobacco plants. *Plant Cell Physiology* 46: 10062-72
- Olias JM, Perez AG, Rios JJ und Sanz LC (1993): Aroma of virgin olive oil: Biogenesis of the "green" odor notes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41: 2368-2373
- Overmyer K, Brosche M und Kangasjarvi J (2003): Reactive oxygen species and hormonal control of cell death. *Trends Plant Science* 8: 335–342.
- Paré PW und Tumlinson JH (1997): De novo biosynthesis of volatiles induced by insect herbivory in cotton plants. *Plant Physiology* 114: 1161-1167.
- Paré PW und Tumlinson JH (1996): Plant volatile signals in response to herbivore feeding. *Florida Entomologist* 79: 93-103
- Paré PW und Tumlinson JH (1998): Cotton volatiles synthesized and released distal to the site of insect damage. *Phytochemistry* 47: 521-526
- Paré PW und Tumlinson JH (1999): Plant volatiles as a defense against insect herbivores. *Plant Physiology* 121: 325-332
- Park SW, Kaimoyo E, Kumar D, Mosher S und Klessig DF (2007): Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science* 318: 113 – 116.
- Pell EJ, Schlaghauer CD und Arteca RN (1997): Ozone-induced oxidative stress: Mechanisms of action and reaction. *Physiologia Plantarum* 100: 264–273.

- Phillips MA, Walter MH, Ralph SG, Dabrowska P, Luck K, Uròs EM, Boland W, Strack D, Rodríguez-Concepción M, Bohlmann J, Gershenzon J (2007): Functional identification and differential expression of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase in induced terpenoid resin formation of Norway spruce (*Picea abies*). *Plant Molecular Biology* 65: 243-257
- Pichersky E und Gershenzon J (2002): The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 237-243.
- Piesik D, Pańka D, Delaney KJ, Skoczek A, Lamparski R und Weaver DK (2011): Cereal crop volatile organic compound induction after mechanical injury, beetle herbivory (*Oulema* spp.), or fungal infection (*Fusarium* spp.). *Journal of Plant Physiology* 168: 878-886
- Pieterse CM, Leon-Reyes A, van der Ent S und van Wees SCM (2009): Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology* 5: 308-316
- Pimentel D (2005): Environmental and economic costs of the application of pesticides primarily in the United States. *Environment, Development and Sustainability* 7: 229-252
- Poehlman JM (1985). Adaptation and distribution. In: Rasmusson DC (ed) *Barley*. American Society of Agronomy, Madison: 19-56
- Poelman EH, van Loon JJA und Dicke M (2008): Consequences of plant defense for biodiversity at higher trophic levels. *Trends in Plant Science* 13: 534-541
- Pontier D, Godiard L, Marco Y und Roby D (1994): *hsr203J*, a tobacco gene whose activation is rapid, highly localized and specific for incompatible plant/pathogen interactions. *Plant Journal* 5: 507-521
- Puente ME, Kennedy GG und Gould F (2008): The impact of herbivore-induced plant volatiles on parasitoid foraging success: a general deterministic model. *Journal of Chemical Ecology* 34: 945-958
- Rancé I, Fournier J und Esquerre-Tugaye M (1998): The incompatible interaction between *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* race 0 and tobacco is suppressed in transgenic plants expressing antisense lipoxygenase sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 6554-6559

- Rao MV und Davis KR (2001): The physiology of ozone induced cell death. *Planta* 213: 682–690
- Rao MV, Lee H, Creelman RA, Mullet JE und Davis KR (2000): Jasmonic acid signaling modulates ozone-induced hypersensitive cell death. *Plant Cell* 12: 1633-46
- Reinhard J, Srivivasan MV und Zhang S (2004): Scent-triggered navigation in honeybees. *Nature* 427: 411
- Reymond R, Weber H, Damond M und Farmer EE (2000): Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12: 707-719
- Rodriguez-Saona C, Crafts-Brandner SJ, Paré PW und Henneberry TJ (2001): Exogenous methyl jasmonate induces volatile emissions in cotton plants. *Journal of Chemical Ecology* 27: 679-695
- Rohmer M (1999): The mevalonate-independent methylerythritol 4-phosphate (MEP) pathway for isoprenoid biosynthesis, including carotenoids. *Pure and Applied Chemistry* 71: 2279-2284
- Rohmer M, Knani M, Simonin P, Sutter B und Sahn H (1993): Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochemical Journal* 295: 517-524
- Rohwer CL und Erwin JE (2008): Horticultural applications of jasmonates: A review. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 83: 283-304
- Rosahl S (1996): Lipoxygenases in plants - their role in development and stress response. *Zeitschrift für Naturforschung C* 51: 123-138
- Sandermann H, Ernst D, Heller W und Langebartels C (1998): Ozone: an abiotic elicitor of plant defence reactions. *Trends in Plant Science* 3: 47-50.
- Schaller F (2001): Enzymes of the biosynthesis of octadecanoid-derived signaling molecules. *Journal of Experimental Botany* 52: 11-23
- Schaller F und Weiler EW (1997): Enzymes of octadecanoid biosynthesis in plants 12-oxo-phytodienoate 10,11-reductase. *European Journal of Biochemistry* 245: 294-299
- Schmid J und Amrhein N (1995): Molecular organization of the shikimate pathway in higher plants. *Phytochemistry* 39: 737-749

- Schoonhoven LM, van Loon, JJA und Dicke M (2005): *Insect-Plant Biology* (2nd ed.). Oxford University Press, USA
- Schraudner M, Ernst D, Langebartels C und Sandermann Jr H (1992): Biochemical plant responses to ozone III. Activation of defence-related proteins β -1,3-glucanase and chitinase in tobacco leaves. *Plant Physiology* 99: 1321-1328
- Schuh G, Heiden AC, Hoffmann Th, Kahl J, Rockel P, Rudolph J und Wildt J (1997): Emissions of volatile organic compounds from sunflower and beech: dependence on temperature and light intensity. *Journal of Atmospheric Chemistry* 27: 291-318
- Schuh G, Wildt J und Kley D (1996): Bestimmung von Emissionsraten pflanzlicher Kohlenwasserstoffe bei Sonnenblumen in Abhängigkeit von Temperatur, Lichtintensität und Streß, insbesondere von der Belastung mit Ozon. *Berichte des Forschungszentrum Jülich*, 3261
- Segarra G, Jàuregui O, Casanova E und Trillas I (2006): Simultaneous quantitative LC-ESI-MS/MS analyses of salicylic acid and jasmonic acid in crude extracts of *Cucumis sativus* under biotic stress. *Phytochemistry* 67: 395-401
- Sembdner G und Parthier B (1993): The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 44: 569-589
- Semiz G, Blande JD, Heijari J, Işık K, Niinemets Ü und Holopainen JK (2011): Manipulation of VOC emissions with methyl jasmonate and carrageenan in the evergreen conifer *Pinus sylvestris* and evergreen broadleaf *Quercus ilex*. *Plant Biology* 14: 57-65
- Shah J (2009): Plants under attack: systemic signals in defence. *Current Opinion in Plant Biology* 12: 459-464
- Sharma YK, Léon J, Raskin I und Davis KR (1996): Ozone-induced responses in *Arabidopsis thaliana*: the role of salicylic acid in the accumulation of defense-related transcripts and induced resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 5099-5104
- Shibata D, Slusarenko AJ, Casey R, Hildebrand D und Bell E (1994): Lipoxygenases. *Plant Molecular Biology Reporter* 12: 41-42

- Shiojiri K, Kishimoto K, Ozawa R, Kugimiya S, Urashimo S, Arimura G, Horiuchi J, Nishioka T, Matsui K und Takabayashi J (2006): Changing green leaf volatile biosynthesis in plants: An approach for improving plant resistance against both herbivores and pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 16672-16676
- Shulaev V, Silverman P und Raskin I (1997): Airborne signalling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. *Nature* 385: 718-721
- Sicker D, Frey M, Schulz M und Gierl A (2000): Role of natural benzoxazinones in the survival strategy of plants. *International Review of Cytology* 198: 319-346
- Spoel SH, Johnson JS und Dong X (2007): Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different lifestyles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 18842-18847
- Sprenger GA, Schörken U, Wiegert T, Grolle S, De Graaf AA, Taylor SV, Begley TP, Bringer-Meyer S und Sahn H (1997): Identification of a thiamine-dependent synthase in *Escherichia coli* required for the formation of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate precursor to isoprenoid, thiamine, and pyridoxol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 12857-12862
- Sreenivasulu N, Graner A und Wobus U (2008): Barley Genomics: An Overview. *International Journal of Plant Genomics*, Article ID 486258, doi:10.1155/2008/486258: 1-13
- Stenzel I, Hause B, Miersch O, Kurz T, Maucher H, Weichert H, Ziegler J, Feussner I und Wasternack C. (2003): Jasmonate biosynthesis and the allene oxide cyclase family of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 51: 895-911
- Stermer BA und Bostock RM (1987): Involvement of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase in the regulation of sesquiterpenoid phytoalexin synthesis in potato. *Plant Physiology* 84: 404-408
- Stotz HU, Pittendrigh BR, Kroymann J, Weniger K, Fritsche J, Bauke A und Mitchell-Olds T (2000): Induced plant defense responses against chewing insects. Ethylene signaling reduces resistance of *Arabidopsis* against egyptian cotton worm but not Diamondback Moth. *Plant Physiology* 124: 1007-1018

- Stout MJ, Thaler JS und Thomma BP (2006): Plant-mediated interactions between pathogenic microorganisms and herbivorous arthropods. *Annual Review of Entomology* 51: 663-689
- St-Pierre B und De Luca V (2000): Evolution of acyltransferase genes: origin and diversification of the BAHD superfamily of acyltransferases involved in secondary metabolism. In: John RI, Romeo T, Varin L, De Luca V, editors. *Recent Advances in Phytochemistry Evolution of Metabolic Pathways*. Vol. 34. Oxford: Elsevier Science Publishing: 285–315
- Strassner J, Schaller F, Frick BU, Howe GA, Weiler EW, Amrhein N, Macheroux P und Schaller A (2002): Characterization and cDNA-microarray expression analysis of 12-oxophytodienoate reductase reveals different roles for octadecanoid biosynthesis in the local versus the systemic wound response. *Plant Journal* 32: 585-601
- Stuhlfelder C, Lottspeich F, Mueller MJ (2002): Purification and partial amino acid sequences of an esterase from tomato. *Phytochemistry* 60:233–240
- Stuhlfelder C, Mueller MJ, Warzecha H (2004): Cloning and expression of a tomato cDNA encoding a methyl jasmonate cleaving esterase. *European Journal of Biochemistry* 271: 2976–2983
- Summermatter K, Sticher L und Métraux JP (1995): Systemic responses in *Arabidopsis thaliana* infected and challenged with *Pseudomonas syringae* pv *syringae*. *Plant Physiology* 108: 1379-1385
- Sutherland AM und Parrella MP (2006) Quantification of powdery mildew consumption by a native coccinellid: implications for biological control? California conference on biological control 5: 188–192. Verfügbar über:
<http://www.cnr.berkeley.edu/biocon/PDF/CCBCV/Complete%20Proceedings%20for%20CCBC%20V.pdf> via Internet
- Suzuki H, Oba K und Uritani I (1975): The occurrence and some properties of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in sweet potato roots infected by *Ceratocystis fimbriata*. *Physiological Plant Pathology* 7: 265-276
- Tabata J, De Moraes CM und Mescher MC (2011): Olfactory cues from plants infected by powdery mildew guide foraging by a mycophagous ladybird beetle. *PLoS ONE* 6 (8): e23799
- Tamaoki M (2008): The role of phytohormone signaling in ozone-induced cell death in plants. *Plant Signaling & Behavior* 3: 166-174

- Tamogami S, Rakwal R und Agrawal GK (2008): Interplant communication: airborne methyl jasmonate is essentially converted into JA and JA-Ile activating jasmonate signaling pathway and VOCs emission. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 376: 723-7
- Theodoulou FL, Job K, Slocombe SP, Footitt S, Holdsworth M, Baker A, Larson TR und Graham IA (2005): Jasmonic acid levels are reduced in COMATOSE ATP-binding cassette transporter mutants. Implications for transport of jasmonate precursors into peroxisomes. *Plant Physiology* 137: 835-840
- Thines B, Katsir L, Melotto M, Niu Y, Mandaokar A, Liu GH, Nomura K, He SY, Howe GA und Browse J (2007): JAZ repressor proteins are targets of the SCF^{COII} complex during jasmonate signalling. *Nature* 448: 661-665
- Tsuda K, Sato M, Glazebrook J, Cohen JD und Katagiri F (2008): Interplay between MAMP-triggered and SA-mediated defense responses. *Plant Journal* 53: 763-775
- Turlings TCJ, Tumlinson JH und Lewis WJ (1990): Exploitation of herbivore-induced plant odors by host-seeking parasitic wasps. *Science* 250: 1251-1253
- Tzin V und Galili G (2010): New insights into the shikimate and aromatic amino acids biosynthesis pathways in plants. *Molecular Plant* 3: 956-972
- Ullrich SE (2011): Cultural Practices: Focus on major barley-producing regions. Europe. In: *Production, Improvement, and Uses*. Wiley-Blackwell. Chapter 9: 221-224
- Umemura K, Satou J, Iwata M, Uozumi N, Koga J, Kawano T, Koshiha T, Anzai H und Mitomi M (2009): Contribution of salicylic acid glucosyltransferase, OsSGT1, to chemically induced disease resistance in rice plants. *Plant Journal* 57: 463-472
- Vallélian-Bindschedler L, Métraux JP und Schweizer P (1998): Salicylic acid accumulation in barley is pathogen specific but not required for defense-gene activation. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11: 702-705
- Van Loon JA, de Boer JG und Dicke M (2000): Parasitoid-plant mutualism: parasitoid attack of herbivore increases plant reproduction. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 97: 219-227
- Van Loon LC und van Strien (1999): The families of pathogen-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55:85-97

- Van Poecke RMP und Dicke M (2004): Indirect defence of plants against herbivores: Using *Arabidopsis thaliana* as a model plant. *Plant Biology* 6: 387-401
- Van Poecke RMP, Posthumus MA und Dicke M (2001): Herbivore-induced volatile production by *Arabidopsis thaliana* leads to attraction of the parasitoid *Cotesia rubecula*: chemical, behavioral, and gene-expression analysis. *Journal of Chemical Ecology* 27: 1911-1928
- Van Zandt PA und Agrawal AA (2004): Community-wide impacts of herbivore-induced plant responses in milkweed (*Asclepias syriaca*). *Ecology* 85: 2616-2629
- Vaughn S F und Gardner HW (1993): Lipoxygenase-derived aldehydes inhibit fungi pathogenic on soybean. *Journal of Chemical Ecology* 19: 2337-2345
- Verberne MC, Brouwer N, Delbianco F, Linthorst HJM, Bol JF und Verpoorte R (2002): Method for the Extraction of volatile compound salicylic acid from tobacco leaf material. *Phytochemical Analysis* 13: 45-50
- Vick BA und Zimmerman DC (1984): Biosynthesis of jasmonic acid by several plant species. *Plant Physiology* 75: 458-461
- Vick BA und Zimmerman DC (1987): Pathway of the fatty acid hydroperoxide metabolism in spinach leaf chloroplasts. *Plant Physiology* 85:1073-1078
- Vlot AC, Dempsey DA und Klessig DF (2009): Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology* 47: 177-206
- Vörös K, Feussner I, Kühn H, Lee J, Graner A, Löbner M, Parthier B und Wasternack C (1998): Characterization of a methyljasmonate-inducible lipoxygenase from barley (*Hordeum vulgare* cv. Salome) leaves. *European Journal of Biochemistry* 251: 36-44
- Vuorinen T, Nerg AM, Ibrahim MA, Reddy GVP und Holopainen JK (2004): Emissions of *Plutella xylostella*-induced compounds from cabbages grown at elevated CO₂ and orientation behavior of the natural enemies. *Plant Physiology* 135: 1984-1992
- Walling LL (2000): The myriad plant responses to herbivores. *Journal of Plant Growth Regulation* 19: 195-216
- Walter M, Fester T und Strack D (2000): Arbuscular mycorrhizal fungi induce the non-mevalonate methylerythritol phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis correlated with accumulation of the yellow pigment and the other apocarotenoids. *Plant Journal* 21: 571-578

- Walter M, Hans J und Strack D (2002): Two distantly-related genes encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthases: differential regulation in shoots and apocarotenoid-accumulating mycorrhizal roots. *Plant Journal* 31: 243-254
- Wasternack C (2006): Oxilipins: biosynthesis, signal transduction and action. In: Hedden P, Thomas S., editors. *Plant hormone signaling. Annual Plant Reviews*. Oxford: Blackwell Publishing Ltd: 185–228.
- Wasternack C (2007): Jasmonates: An update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of Botany* 100: 681-697
- Wasternack C und Parthier B (1997): Jasmonate-signalled plant gene expression. *Trends Plant Science* 2: 302-306
- Weaver DK, Dunkel FV, van Puyvelde L, Richards DC und Fitzgerald GW (1994): Toxicity of protectant potential of the essential oil of *Tetradenia riparia* (Lamiales, Lamiaceae) against *Zabrotes subfasciatus* (Col., Bruchidae) infesting dried pinto beans (Fabales, Leguminosae). *Journal of Applied Entomology* 118: 179-196
- Weichert H, Stenzel I, Berndt E, Wasternack C und Feussner I (1999): Metabolic profiling of oxylipins upon salicylate treatment in barley leaves--preferential induction of the reductase pathway by salicylate¹. *FEBS Letters* 464: 133-137
- Wildermuth MC, Dewdney J, Wu G und Ausubel FM (2001): Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* 414: 562-565
- Yalpani N, Leòn J, Lawton MA und Raskin I (1993): Pathway of salicylic acid biosynthesis in healthy and virus-inoculated tobacco. *Plant Physiology* 130: 315-321
- Zeringue HJ und McCormick SP (1989): Relationship between cotton leaf-derived volatiles and growth of *Aspergillus flavus*. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 66: 581-585
- Zhu J und Park KC (2005): Methyl salicylate, a soybean aphid-induced plant volatile attractive to the predator *Coccinella septempunctata*. *Journal of Chemical Ecology* 31: 1733-1746
- Zhuang X, Fiesselmann A, Zhao N, Chen H, Frey M und Chen F (2012): Biosynthesis and emission of insect herbivory-induced volatile indole in rice. *Phytochemistry* 73: 15-22
- Ziegler J, Hamberg M, Miersch O und Parthier B (1997): Purification and characterization of allene oxide cyclase from dry corn seeds. *Plant Physiology* 114: 565-573

Ziegler J, Keinänen M und Baldwin IT (2001): Herbivore induced allene oxide synthase transcripts and jasmonic acid in *Nicotiana attenuata*. *Phytochemistry* 58: 729-738

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von der Deutschen Bundesstiftung Umwelt (DBU) gefördert. Hiermit möchte ich mich herzlich bei der DBU für die Förderung sowie für das rege Interesse an meiner Arbeit bedanken. Mein Dank gilt besonders meiner dortigen Betreuerin Frau Dr. Schlegel-Starmann, die mich fortwährend unterstützt hat.

Bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Ulrich Schurr bedanke ich mich herzlich für die Ermöglichung dieser Arbeit, für seine rege Unterstützung und für die stets gute Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Zeier danke ich für sein Interesse an dieser Arbeit und die Bereitschaft zur Übernahme des Zweitgutachtens.

Frau Prof. Dr. Ingar Janzik, Frau Dr. Shizue Matsubara und Priv. Doz. Dr. Jürgen Wildt danke ich herzlich für die hervorragende Betreuung und den daraus resultierenden Diskussionen während der gesamten Zeit meiner Promotion.

Dr. Nils Stein vom IPK Gatersleben danke ich für sein Interesse an meiner Arbeit sowie der Bereitstellung der verschiedenen Gerstensortensamen.

Bei Herrn Dr. Einhard Kleist bedanke ich mich für die freundliche Unterstützung und die zahlreichen Diskussionen.

Frau Dr. Diana Hofmann und Frau Dr. Beatrix Santiago-Schübel, BioSpec, Forschungszentrum Jülich danke ich für die Unterstützung bei der Konzeptionierung der Messtechnik für die Bestimmung der endogenen Inhaltsstoffe. Frau Dr. Beatrix Santiago-Schübel danke ich hierbei besonders für die Durchführung der Bestimmung der endogenen Inhaltsstoffe.

Bei Frau Sabine Preiskowski möchte ich mich für die Durchführung der real-time PCR Analysen und bei Frau Andrea Neuwohner für die Unterstützung bei der Durchführung der Emissionsexperimente bedanken.

Thorsten Brehm danke ich für die Hilfe bei der Auswertung der zahlreichen Chromatogramme.

Bei Beate Uhlig und Marcel Schneider bedanke ich mich für die Beratung der Anzucht sowie für die Hilfe bei der Bewässerung und Aussaat der Gerstenpflanzen.

Ingar, Jürgen, Andrea, Sabine, Anja, Manuela, Stefan, Einhard, Steffi, Monika, Lina und Tina danke ich für die angenehme, freundschaftliche Atmosphäre innerhalb und außerhalb des Labors.

Des Weiteren will ich an dieser Stelle folgenden Personen meinen herzlichsten Dank aussprechen, die mich besonders bei dem Aufbau der Anlage der Emissionsmessungen unterstützt haben:

- Priv. Doz. Dr. Jürgen Wildt, Dr. Einhard Kleist, Priv. Doz. Dr. Uwe Rascher, Dr. Siegfried Jahnke, Prof. Dr. Achim Walter, Dr. Roland Pieruschka, Thomas Hombach, Lothar Pieta und Andreas Aversch

- Priv. Doz. Dr. Astrid Kiendler-Scharr, Dr. Uwe Kuhn und Dr. Thomas Mentel (IEK, Forschungszentrum Jülich)

- Stefanie Andres, Ricarda Uerlings und Monika Springer, vor Allem für die tatkräftige Unterstützung bei der Wartung, Instandsetzung sowie für die Hilfe bei der Durchführung der Kalibrationen des GC-MS Systems

- den Mitarbeitern der Werkstatt sowie der Glasbläserei des Forschungszentrum Jülichs für die unkomplizierte Auftragsannahme und schnelle Anfertigung diverser Bau- und Glasteile

Insgesamt möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des IBG-2 für die gute und familiäre Arbeitsatmosphäre bedanken.

Meiner Familie, meinem Freund, seiner Familie sowie meinen Freunden gilt ein großes Dankeschön für die stetige Unterstützung während meines Studiums.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe, die Arbeit eigenständig, ohne unerlaubte Hilfe und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Jülich, den 06.05.2012

(Simone Gatzke)