

**Untersuchungen zum anatomischen, physiologischen und
molekularbiologischen Abwehrverhalten an gesunden und geschädigten
Buchen (*Fagus sylvatica* L.) mit der Symptomatik
„Buchenkomplexkrankheit“**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Gerlind Fiebelkorn
aus Warstein

Göttingen 2006

D 7

Referent:	Prof. Dr. A. Polle
Korreferent:	Prof. Dr. C. Leuschner
Tag der mündlichen Prüfung:	1. November 2006

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	1
1. Einleitung.....	6
1.1 Die Bedeutung der Rotbuche.....	6
1.2 Die Buchenkomplexkrankheit.....	8
1.3 Das pflanzliche Abwehrverhalten.....	13
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	19
2. Material und Methoden.....	21
2.1 Untersuchungsgebiete und Materialgewinnung.....	21
2.1.1 Paarversuch.....	21
2.1.2 Jahresverlauf.....	23
2.1.3 Froststressexperiment.....	24
2.1.4 Stichverletzungsversuch.....	24
2.2 Chemikalien.....	25
2.3 Anatomische Untersuchungen.....	25
2.3.1 Fixierung und Anfertigen von Mikrotomschnitten.....	25
2.3.2 Paraffineinbettung.....	26
2.3.3 Schneiden und Entparaffinierung.....	27
2.3.4 Anfertigen von gelatinierten Objektträgern.....	27
2.3.5 Mikroskopisch-histologische Auswertung der Präparate.....	27
2.3.6 Makroskopische Beurteilung der Bohrkerne.....	27
2.4 Physiologische Untersuchungen.....	28
2.4.1 Bestimmung des Gesamtgehalts an phenolischen Verbindungen.....	28
2.4.2 HPLC Analytik phenolischer Inhaltsstoffe.....	29
2.5 Molekularbiologische Untersuchungen.....	31
2.5.1 RNA Isolation.....	31
2.5.2 Agarose-Gelelektrophorese.....	32
2.5.3 Quantitative real-time-PCR.....	33
2.5.3.1 cDNA-Synthese.....	33
2.5.3.2 real-time-PCR.....	34

2.5.4 Micro Array Analysen.....	35
2.5.4.1 cDNA-Synthese.....	36
2.5.4.2 Markierung.....	37
2.5.4.3 Blocken und Prähybridisierung der Slides.....	37
2.5.4.4 Hybridisierung.....	38
2.6 Statistische Auswertungen.....	39
3. Ergebnisse.....	41
3.1 Morphologische Veränderungen.....	41
3.1.1 Veränderungen der Rinde.....	41
3.1.2 Kontrollbuchen und ihre anatomischen Veränderungen im Vergleich zu beschädigten Buchen.....	42
3.2 Überprüfung zweier Schadhypothesen zum neuartigen Schadbild der Buche.....	42
3.2.1 Anatomische Auffälligkeiten nach Froststresssimulation.....	43
3.2.2 Anatomische Auffälligkeiten nach Stichverletzungen.....	47
3.3 Variationen im Gesamtphenolgehalt geschädigter und gesunder Buchen .	50
3.3.1 Variationen im Gesamtphenolgehalt der Rinde.....	50
3.3.2 Jahreszeitliche phenolische Gehaltsanalysen in Buchenrinde.....	57
3.3.3 Variationen im Gesamtphenolgehalt des Holzes.....	59
3.3.4 Saisonale Fluktuation der phenolischen Inhaltsstoffe in Buchenholz..	61
3.4 Auftrennung der phenolischen Inhaltsstoffe an Rinde mittels HPLC.....	63
3.4.1 Quantifizierung einzelner Phenolsäuren.....	66
3.4.2 Quantifizierung von Catechin und Epicatechin.....	67
3.5 Regulation von Genen des pflanzlichen Abwehrverhalten.....	68
3.5.1 Analyse der Genexpression einzelner Klone mittels quantitativer Realtime- PCR.....	70
3.5.2 Genexpressionsanalyse mittels DNA Chip.....	70
4. Diskussion.....	72
4.1 Strukturelle Abwehrreaktionen.....	72
4.2 Einfluß des Pathogenbefalls auf die Physiologie	74
4.2.1 Die Rolle der Sekundärmetabolite	74
4.2.2 Veränderungen in der Genexpression.....	77

4.3 Mögliche Ursachen des Buchensterbens.....	80
4.4 Physiologische Aspekte im pflanzlichen Abwehrverhalten.....	81
5. Zusammenfassung.....	83
6. Literaturverzeichnis.....	86
Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen.....	98

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
&	und
°C	Grad Celsius
μCi	Mikrocurie
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
Abt.	Abteilung
ACC	1-Aminocyclopropan-1-carboxylsäure
Acetyl-CoA	Acetyl Coenzym A
ACS	1-Amino-cyclopropan-1-carboxylsäure-synthase
Baumnr.	Baumnummer
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	cirka
cDNA	komplementäre DNA
<i>CHS</i>	Chalkonsynthase
cm	Centimeter
<i>CM</i>	Chorismatmutase
cpm	<i>Counts per minute</i>
<i>CS</i>	Chorismat-Synthase
CTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
ct-Wert	<i>threshold cycle</i> -Wert
d	Tag
d.h.	das heißt
<i>DAHPS</i>	3'-Deoxy-D-arabino-heptulosonat-7-phosphat-synthase
dATP	Deoxyadenosin-5'-triphosphat
DEPC-Wasser	Diethylpyrocarbonat-Wasser
dGTP	Deoxyguanosin-5'-triphosphat

DMPC	Dimethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleinsäure
dNTP	Deoxynucleotidtriphosphat
<i>DQD</i>	Dehydroquinatdehydratase
<i>DQS</i>	Dehydroquinatsynthase
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Deoxythymidin-5'-triphosphat
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>EPSPS</i>	5'-Enolpyruvyl-shikimat-3-phosphat-synthase
FA	Forstamt
FÄ	Forstämter
Fa.	Firma
FAE	<i>Formaldehyde-acetic acid-ethanol</i>
Fm	Festmeter
g (Zentrifuge)	Erdbeschleunigung (<i>gravity</i>)
g	Gramm
GTE	Glucose-Tris-EDTA Puffer
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
ha	Hektar
HCl	Salzsäure
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
K ₂ HPO ₄	Dikaliumhydrogenphosphat
Kap.	Kapitel
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KPO ₄	Kaliumphosphat
kV	Kilovolt
LB-Medium	Luria Bertani-Medium

lösl.	löslich
M	Molar
m	Meter
MEA	MOPS-EDTA-Natriumacetat Puffer
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute
ml	Milliliter
Mm	Millimeter
mM	Millimolar
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MW	Mittelwert
Na	Natrium
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
Na-Acetat	Natriumacetat
NaBH ₄	Natriumborhydrid
NaCl	Natriumchlorid
NaOAc	Natriumacetat
NaOH	Natriumhydroxid
NH ₂ -Gruppe	Aminogruppe
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
NRW	Nordrhein Westfalen
NW-Exposition	Nordwest-Exposition
OD	optische Dichte
Oligo dT	Oligodeoxythymidin
p.a.	pro analysi
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEP	Phosphoenylpyruvat

pH	pondus Hydrogenii (negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration)
Pi	Pilze
<i>PR</i> -Gene	<i>pathogenesis-related genes</i>
Primer f	Primer <i>forward</i>
Primer r	Primer <i>reward</i>
PVP (K30)	Polyvinylpyrrolidone K30
Rheinl.Pf.	Rheinland Pfalz
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>Rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	real time PCR
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SAR	systemisch aktivierte Resistenz
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
sec	Sekunde
<i>SK</i>	Shikimatkinase
SO ₂	Schwefeldioxid
SO-Exposition	Südost-Exposition
sog.	sogenannt
ss	<i>single stranded</i>
SSC	<i>Saline Sodium Citrate</i>
SSTE	<i>Sodium chloride</i> -SDS-Tris HCl-EDTA
Tab.	Tabelle
TG	Trockengewicht
TM	Trockenmasse
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-amino-methan
ü. NN	über Normal Null
u.a.	unter anderem

U/ml	<i>Units</i> pro Milliliter
UV	Ultraviolett
w/v	Gewichtsvolumen, Masse/Volumen (<i>weight/volume</i>)
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D- galactopyranosid
z.B	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
zellwandgeb.	zellwandgebunden

1. Einleitung

1.1 Die Bedeutung der Rotbuche

Seit fast zwei Jahrtausenden ist die Rotbuche (*Fagus sylvatica* L.) von Natur aus unangefochten die dominierende Laubbaumart in den mitteleuropäischen Wäldern (ROLOFF 1996). Vor etwa 3000 Jahren mit der nacheiszeitlichen Klimaveränderung wurden die Bedingungen für die Buche ideal und sie konnte sich vom Gebirge im Südosten Europas her bis in die Tief- und Hügellandschaften nach Nordwesten ausbreiten. Das natürliche Verbreitungsgebiet reicht heute von Südengland über Frankreich, Nordspanien und über das gesamte mitteleuropäische Festland, inklusive Südschweden bis hin zur Westukraine und der Balkanhalbinsel. Die südlichsten natürlichen Rotbuchenbestände sind in Sizilien zu finden, die nördlichsten im norwegischen Umland Bergens (Abb. 1.1). Global gesehen haben die Rotbuchen jedoch ein geringes Verbreitungsgebiet.

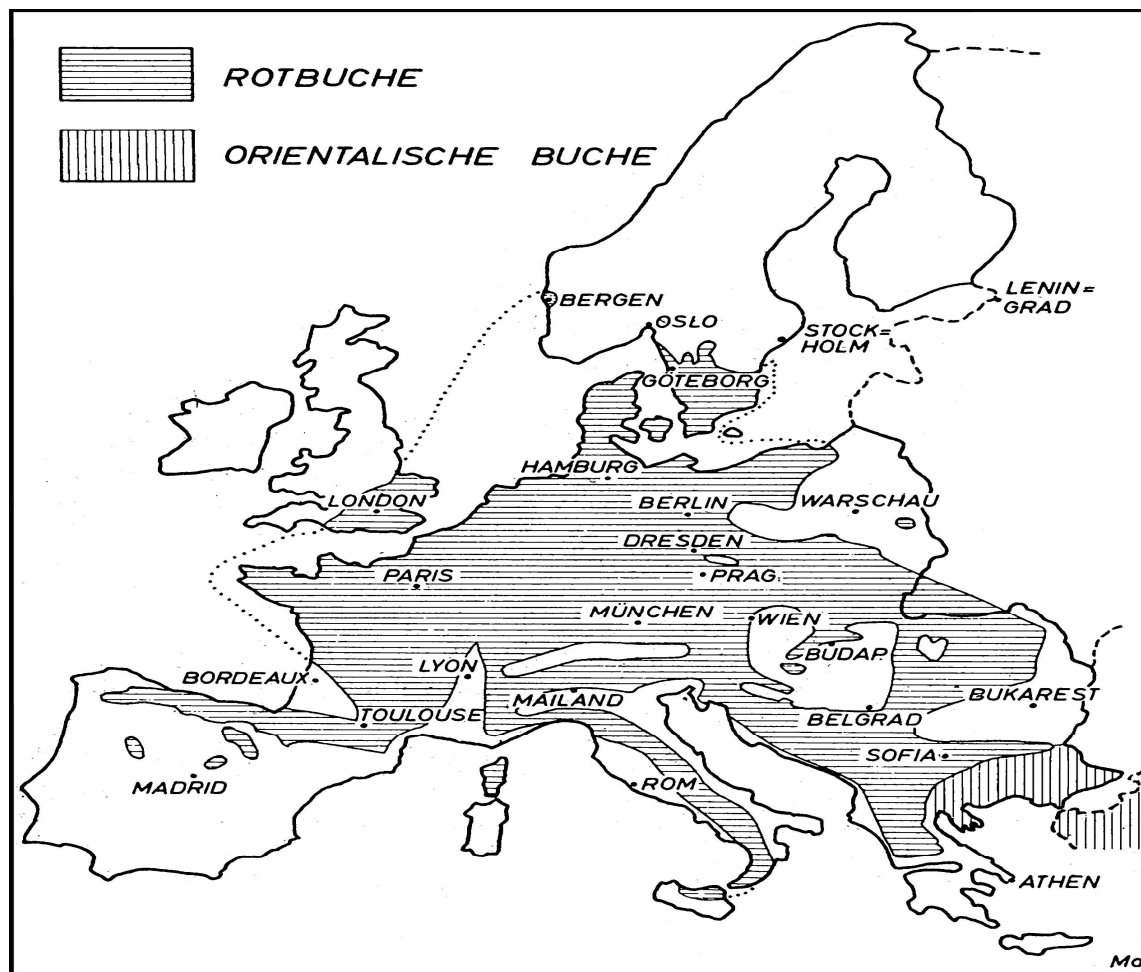


Abb. 1.1: Verbreitungskarte von *Fagus sylvatica* L. (aus: BAUER & ZIMMERMANN 1963).

Da die Rotbuche eine wichtige und potenziell dominierende Laubbaumart ist, boden- und bestandespfleglich und auch in der Bevölkerung einen hohen Stellenwert einnimmt, wird sie auch als "Mutter des Waldes" bezeichnet (SCHMIDT 2000 und KÖLLING et al. 2005). Die wirtschaftliche Bedeutung der Rotbuche schwankte vom wichtigen Energielieferanten in Form von Brennholz und Holzkohle über ein gefragtes Material in der Möbelindustrie bis hin zum ertragsarmen und nicht rentablen Holzstoff. So verdrängten in der Nachkriegszeit vor allem schnellwachsende und ertragsreichere Nadelbaumarten wie die Fichte (*Picea abies* L.) die Buche, und man zog sie nur noch zur Gewährleistung von Schutz- und Erholungsfunktionen heran (DERTZ 1996). Erst in jüngerer Zeit erfuhr die Buche in der Forstwirtschaft eine Renaissance, weil sie forstpolitisch im Anbau gefördert wurde, um den Laubholzanteil zu erhöhen, und weil sie waldbauliche Vorteile gegenüber anderen Laubbaumarten besitzt. Darum wurde sie wieder verstärkt gepflanzt. So nahm der Buchenanteil sprunghaft mit der Aufforstung der Orkanschadensflächen nach 1990 zu (in Hessen mit 75 % Buchenanteil (DERTZ 1996)). Mittlerweile liegt der Flächenanteil in Deutschland bei 14 % (HAPPACH-KUSAN et al. 2004). Aufgrund ihrer guten Schattenverträglichkeit, ihrer Anpassungsfähigkeit an das kühlfeuchte Klima und ihrer Durchsetzung im Wurzelwerk zeichnet sich die Rotbuche durch eine hohe Konkurrenzkraft aus (LEUSCHNER 1998).

Durchschnittlich werden Buchen bis 45 m hoch, haben einen Stammdurchmesser von bis zu 150 cm und können 300 Jahre alt werden. Die Borke ist grau und glatt. Die glänzend grünen Blätter sind wechselständig, eielliptisch, etwa 5 bis 10 cm lang und 3 bis 7 cm breit mit leicht gezähntem Blattrand. Die Blütezeit ist im April bis Mai. Die eingeschlechtlichen Blüten befinden sich an den jungen Trieben zum Zeitpunkt der Blattentwicklung. Desweiteren zeichnet sich die Rotbuche durch ein charakteristisches Herzwurzelsystem mit ausgesprochen hoher Feinwurzeldichte aus (KRÜSSMANN 1977, HECKER 1995).

Die Standortansprüche der Buche sind gering. Sie bevorzugt ein kühlfeuchtes Klima, wie es in Mitteleuropa anzutreffen ist, und zeigt beste Wachstumsraten bei milden Wintern und hohen Niederschlägen auf nährstoffreichen Böden im schwach sauren bis alkalischen Bereich (ELLENBERG 1978). Die Buche reagiert empfindlich auf die zunehmende Belastung durch biotische und abiotische Umwelteinflüsse. Zu den Stressfaktoren zählen beispielsweise Stickstoffbelastung, beschleunigte Bodenversauerung, erhöhte Ozonkonzentrationen, mechanische Bodenverdichtung, Sturm, Trockenheit und nicht zuletzt pathogene Organismen, wie Insekten, Pilze, Bakterien und Viren.

1.2 Die Buchenkomplexkrankheit

Seit über 100 Jahren ist das klassische Buchenrindensterben oder auch die Buchenkomplexkrankheit bekannt und wurde erstmalig von ROBERT HARTIG 1878 beschrieben. Beobachtet wurde die Krankheit an Rotbuchen in Deutschland, Dänemark, England und Polen sowie auf dem amerikanischen Kontinent an *Fagus grandifolia* Ehrh., wo sich die Krankheit durch die Einschleppung der Buchenwollschildlaus nach Nova Scotia ausbreiten konnte (EHRlich 1934). Um 1930 brach die Krankheit in den maritimen Provinzen aus und verbreitete sich von Ost- bis Südzentral Maine, über Massachusetts in den Norden hin bis nach Quebec. Eine 175 000 ha große Fläche war in West Virginia betroffen (HOUSTON & O'BRIEN 1998). Die Buchenkomplexkrankheit taucht sowohl in akuter Form als auch chronisch auf. Sie kann große Areale betreffen und zählt somit zu den bedeutendsten Krankheitserscheinungen in Buchenbeständen (WACHENDORF 1983).

Der Ablauf der klassischen Buchenkomplexkrankheit ist trotz gewisser Differenzen in vier Phasen zusammenfassbar: Anfangs findet eine Prädisponierung aufgrund extremer Klimaereignisse statt (SCHÜTT et al. 1992, BLASCHKE 2005). Anschließend stellt sich ein Massenbefall durch die Buchenwollschildlaus (*Cryptococcus fagi* Bär.) ein, der eine Infektion der Rinde durch Nectria-Pilze (beispielsweise *Nectria coccinea* var. *faginata* Lohm. Wats & Ayres) und Weißfäulepilze wie z.B. *Fomes fomentarius* (L. ex Fr.) Fr. oder *Fomitopsis pinicola* (Swartz ex Fr.) Karst. mit sich zieht. Letztendlich siedeln sich sekundär der Bohrkäfer *Hylecoetus dermestoides* L. bzw. der Nutzholzborkenkäfer *Trypodendron domesticum* L. an, die zum Absterben der Buchen führen (HARTIG 1878, SCHWERDTFEGER 1957, PETERCORD 1999 und BLASCHKE 2005). Eine Ursache des Buchenbefalls durch die Buchenwollschildlaus liegt in der charakteristischen Rindenanatomie von *Fagus* (BRAUN 1976 und 1977)(Kap. 1.1). Durch die Saugaktivität von *Cryptococcus fagi* Bär. bilden sich tiefgreifende Rindennekrosen, die nicht immer erfolgreich durch sekundäre Innenperiderme ausgeheilt werden können (PETERCORD 2002), so dass optimale Bedingungen für pathogene Organismen geschaffen werden. Die Folge sind Kambiumnekrosen, die in einem Folgestadium den Sekundärbefall durch holzzersetzende Pilze, holzbrütende Insekten und sichtbare Schleimflussflecken mit sich bringen (NIESAR 2003). Die Krankheit ist anfangs schwer erkennbar, da die Symptome latent bzw. maskiert sind und aufgrund der morphologischen Variabilität der Bäume nicht auffällig sind (MOSER 2002).

Seit Mitte 1999 tritt ein neuartiges Schadbild an Buche auf. Wie bei der klassischen Buchenkomplexkrankheit waren Schädigungen an der Rinde sichtbar, die in Folge dessen partiell abstarb. Es folgten Verwelkungen der Blätter im oberen Kronenbereich, Absterben kleinerer Äste, Schleimfluss bis hin zum Käferbefall durch *Trypodendron domesticum* L.. Diese Symptomatik der klassischen Buchenkomplexkrankheit trat bisher nur an geschwächten Buchen oder liegenden Stämmen auf. Das neue Schadbild hingegen zeigt einen *Trypodendron* Befall bei äußerlich gesund erscheinenden Buchen in Regionen über 250 m ü. NN Belgiens, Frankreichs, Luxemburgs, Rheinland-Pfalz und Nordrhein-Westfalens (DELB 2001, NIESAR 2001, PETERCORD 2002, PETERCORD 2003, SEEGMÜLLER 2003).

Die Laubnutzholzborkenkäfer *Trypodendron domesticum* L. und *Trypodendron signatum* F. sind bislang als typische Lagerholzschädlinge bekannt, die durch Alkohole, die während der anaeroben Zersetzung der Rinde als Folge durch Lagerung und Zerstörung des Wasserhaushaltes des Baumes entstehen, angelockt werden.

Durch die Bohrgänge des Käfers kollabieren die Wasserleitgefäße, was eine Verwelkung der Äste in den Unterkronen einzelner Altbuchen zur Folge hat. Neben dieser Auffälligkeit zählen zu weiteren sichtbaren Symptomen der Krankheit helle Bohrmehlhäufchen auf den Nordflanken der Stämme (HABERMANN 2001, PETERCORD 2001, SEEGMÜLLER 2003), sowie sichtbare Fruchtkörper von Weißfäulepilzen auf der Rinde. Desweiteren traten *Nectria* spec. im Kambialbereich auf, sowie Schleimflussflecken (NIESAR 2003), die eine schleimig braunschwarze Konsistenz annahmen. Schleimflussflecken sind auf zerstörte Leitungsbahnen des Xylems zurückzuführen (PETERCORD 2003), die eine Folge von Kambiumnekrosen sind. Oftmals wurde eine ausgeprägte Verborkung der ansonsten glatten Buchenrinde beobachtet.

Für die heutige Forstwirtschaft bedeutet das neuartige Auftreten der Buchenkrankheit eine besondere Herausforderung. Da die Buche ein wertvoller Holzlieferant ist und auf dem derzeitigen Holzmarkt der Festmeterpreis bei 78 Euro (Güteklasse B; Stärkeklasse 3a – 4) liegt (im Vergleich zur Fichte (Güteklasse B; Stärkeklasse: 2b): 70 Euro oder Pappel (Güteklasse B; Stärkeklasse: 3a – 4): 35 Euro (aus: Preisbericht NRW, Stand Mai 2006)) und ein gefragter Rohstoff bei den Sägewerken sowie in der Holzindustrie (Spanplattenherstellung, Möbelindustrie) ist, sind die Klärung der Befallsursache und Maßnahmen für die Sicherstellung der Buchenbestände von großer Bedeutung. Durch Schadsymptome wird das Holz schnell entwertet und kann oftmals nur noch als Brennholz verkauft werden. Das hat auch eine deutliche Imageschädigung der Buchen auf nationalen und internationalen Holzmärkten zur Folge. Im Waldzustandsbericht 2005 heißt es, dass 44 % der Buchen deutliche Schäden aufweisen (im Vergleich zum Vorjahr 2004: 55 %). Das

bedeutet zwar eine deutliche Erholung im Vergleich zum Vorjahr, jedoch bleibt im Gegensatz dazu der Schadh Holzanteil besorgniserregend. Die Stabilität der Waldbestände und die Vitalität der Waldbäume sind von allgemeinem Interesse.

Das Ausmaß der aktuellen Schäden durch die Buchenkomplexkrankheit in Mitteleuropa ist schwierig zu beurteilen, da in der forstlichen Praxis die Unterscheidung der Krankheitsursachen von geringer Bedeutung ist. Die Schadh Holz mengen beliefen sich in Rheinland-Pfalz im Jahre 2001 auf insgesamt 7580 fm, die durch die Buchenkomplexkrankheit hervorgerufen wurden. Davon waren 2290 fm durch den neuartigen Käferbefall einzuordnen (PETERCORD 2002). In Tabelle 1.1 sind die Schadh Flächen und –mengen der Jahre 2001 bis 2005 in den Forstämtern Wiltz, Saarburg und Hochwald dargestellt. Sowohl in Saarburg als auch in Hochwald war ein deutlicher Neubefall im Jahr 2003 zu beobachten.

Tab. 1.1: Schadh umfang durch die Buchenkomplexkrankheit verursacht in den FÄ Wiltz, Saarburg und Hochwald von 2001 bis 2005 (aus: Projektseite *Interreg-Buche* (www.interreg-buche.de)).

Buchenkomplexkrankheit		
Übersicht Schadh umfang 2001 -2005		
Forstamt Wiltz/Luxemburg:		
	Schadh Fläche in ha	Schadh menge in fm (jährlicher Neubefall)
Schadh umfang 2004	90,19	1145
Forstamt Saarburg:		
	Schadh Fläche in ha	Schadh menge in fm (jährlicher Neubefall)
Schadh umfang 2001	0,4	100
Schadh umfang 2002	11	505
Schadh umfang 2003	22	2650
Schadh umfang 2004	22	2293
Schadh umfang 2005	24	2970
Schadh menge gesamt		8518
Forstamt Hochwald:		
	Schadh Fläche in ha	Schadh menge in fm (jährlicher Neubefall)
Schadh umfang 2001		10
Schadh umfang 2002	0,7	110
Schadh umfang 2003	12	975
Schadh umfang 2004	49	2152
Schadh umfang 2005	44	2597
Schadh menge gesamt		5844

Anatomisch äußern sich Schäden in Form von Rindennekrosen und Holzanomalien. Im Rahmen des Interreg III A De Lux Projektes zur Entwicklung von Strategien zur Sicherung von Buchenwäldern wurden anatomische Untersuchungen an befallenen und scheinbar gesunden Buchen durchgeführt (LANGENFELD-HEYSER et al. 2005). Dabei wurde festgestellt, dass die Rinde der *Trypodendron* befallenen Proben dicker war als die Kontrollpartner. Typisch für eine gesunde Buchenrinde ist das Vorhandensein von Lenticellen. Im Widerspruch dazu stand, dass an den "gesund" eingestuften Buchen fast keine Lenticellen zu beobachten waren. Man konnte sie nur vereinzelt auf der Rindenoberfläche erkennen.

Anhand von Rindenquerschnitten konnten Rindennekrosen an allen befallenen Proben beobachtet werden. Sowohl die befallenen als auch die daneben stehenden nicht befallenen Buchen zeigten fast ausnahmslos Rindennekrosen, die unterschiedlich tief waren. Ihr Ausgangspunkt waren in den meisten Fällen die Lenticellen. Flach darunter waren Nekrosen lokalisiert (Abb. 1.2), die sich bis hin zum sekundären Phloem erstrecken konnten. Teilweise zeigten sich sogenannte Strahlbrüche, die aufgrund neu gebildeter Tiefenperiderme entstanden.

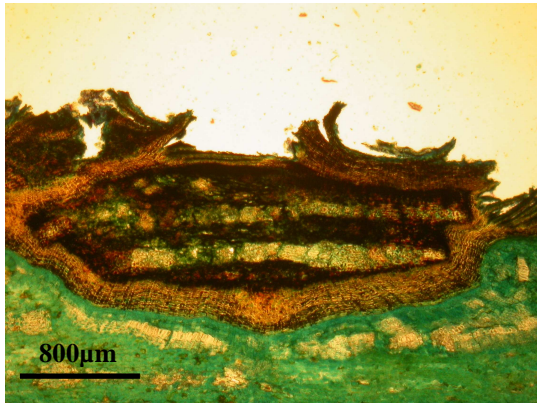
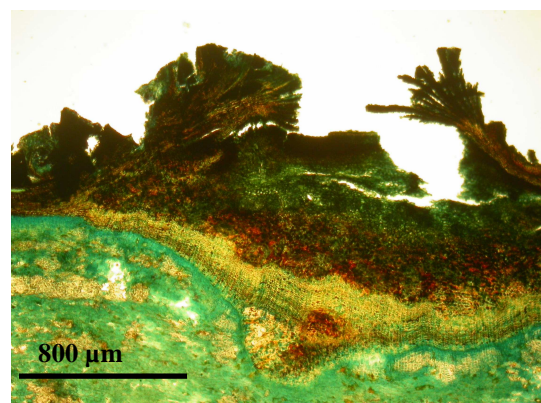
A**B**

Abb. 1.2: Entstehung einer Rindennekrose unter einer Lenticelle im Querschnitt einer *Trypodendron* befallenen Buche (**A**) und im Vergleich im Querschnitt einer als nicht befallenen eingestuften Buche (**B**) (aus: LANGENFELD-HEYSER et al. 2004).

Die augenscheinlich gesunden Kontrollproben zeigten ebenfalls Rindennekrosen, die jedoch in keinem Fall so tiefgehend vorzufinden waren, wie bei den befallenen Rindenproben. Die Nekrosen der Kontrollpaarstücke waren flach unter den Lenticellen vorzufinden oder bereits erfolgreich ausgeheilt und mit einem Überwallungsgewebe bedeckt.

Die beobachteten anatomischen Rindenveränderungen führten zu der Frage, ob sich die Abwehr auch in physiologischen und biochemischen Reaktionen, wie einer erhöhten Produktion von Abwehrmetaboliten, widerspiegelt.

Im Holz von *Trypodendron* befallenen Buchen waren mikroskopisch sogenannte Holzstrahlproliferationen zu beobachten, die entweder nur auf einen Jahrring beschränkt waren oder sich über mehrere Jahre erstreckten. Teilweise zeigten auch die Kontrollpartner solche Strahlproliferationen. Sie besitzen in ihrem Zentrum eine Anhäufung unregelmäßig angeordneter und parenchymatischer Zellen, die dicke Zellwände besitzen und Stärkekörner oder auch Gerbstoffe beinhalten. Im weiteren Verlauf der Strahlproliferation zeigt sich eine anomale Holzbildung mit zentripetalen Gefäßen mit Thyllen und Polyphenolen.

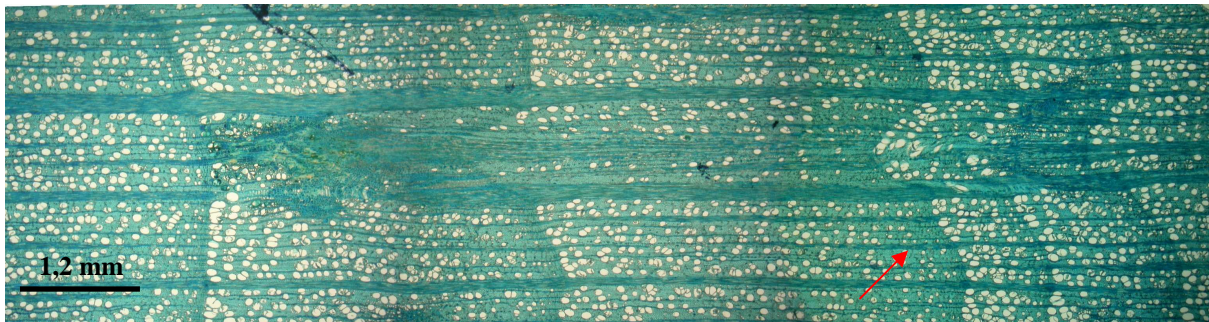


Abb. 1.3: Mehrjährige Strahlproliferation im Holzquerschnitt einer *Trypodendron* befallenen Buche mit wellenförmigen Jahrringen (Pfeil) (aus: LANGENFELD-HEYSER et al. 2004).

Abbildung 1.3 zeigt bei einer *Trypodendron* befallenen Buche eine Holzstrahlproliferation, die sich über mehrere Jahre erstreckt. Am Rande der Strahlproliferation befanden sich Gefäße mit Thyllen, die auch bei Proben mit starkem Befall im normalen Holz anzutreffen waren. Die Thyllen waren entweder rein parenchymatisch oder enthielten Gerbstoffeinlagerung (Abb. 1.4).

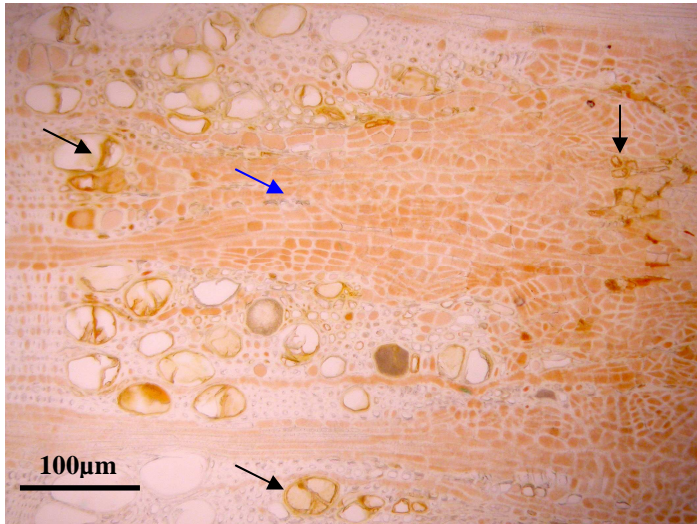


Abb. 1.4: ungefärbter Holzquerschnitt einer *Trypodendron* befallenen Buche mit dunkel gefärbten phenolhaltigen Xylemzellen (blauer Pfeil) und großlumiger parenchymatischer Zellen mit phenolhaltigen Zellwänden mit Thyllen und dunkel erscheinenden Gerbstoffeinlagerungen (schwarze Pfeile) (aus: LANGENFELD-HEYSER et al. 2004).

Die Holzstrahlproliferationen mit phenolhaltigen Xylemzellen im Kern und peripheren Polyphenoleinlagerungen könnten Zeichen für Veränderungen im biochemischen Stoffwechsel sein. Jedoch ist bislang nicht bekannt, ob und in welcher Weise die chemische Holzzusammensetzung beeinflusst wird.

1.3 Das pflanzliche Abwehrverhalten

Pflanzen sind unterschiedlichen Arten von Stress und Belastungen ausgesetzt, dabei spielt das Klima eine komplexe Rolle als abiotischer Stressor. Enorme Hitze, lange Trockenperioden, jahreszeitliche Extremverhältnisse, wie beispielsweise Früh- oder Spätfrost, Überflutungen, lange Winter, extreme Sommer sind nur ein paar Beispiele. Hinzu kommen die unterschiedlichen Bodenverhältnisse (Nährstoffmangel, erhöhte Stickstoffzufuhr, Überdüngung, zunehmende Bodenversauerung bzw. Bodenverdickung) oder erhöhte Ozonbelastung. Zu den biotischen Faktoren gehören mechanische Verletzungen, wie z.B. Verbissverletzungen, Verwundung allgemein, die natürlichen Fraßfeinde und Pathogene, wie Viren, Bakterien, Pilze und Insekten. Pflanzen sind an einem Standort fixiert und sie sind einem ständigen Selektionsdruck ausgesetzt. Gegen all diese negativen Einflüsse hat die Pflanze ein komplexes physiologisches Abwehrnetzwerk aufgebaut. Von der Entwicklung her sind Pflanzen enorm regenerationsfähig, d.h. dass sie bei Verwundung und Verlust von

Gewebe nahezu aus allen Gewebsteilen neues Zellgewebe bilden können, da die Zellen in ihrer Anlage omnipotente Eigenschaften besitzen, die das jeweilige Gewebe neu synthetisieren und/oder die Wundung durch Bildung eines Abschlussgewebes überwallen.

Unter natürlichen Bedingungen kann die Pflanze von den meisten potenziellen Pathogenen nicht befallen werden, da sie von Natur aus resistent ist und ein Krankheitsausbruch die Ausnahme darstellt (ELSTNER et al. 1996). Diese sog. Basisresistenz ist genetisch determiniert und beruht darauf, dass das Pathogen die Pflanze aufgrund struktureller Eigenschaften nicht als potentiellen Wirt erkennt oder dass die Pflanze durch präformierte bzw. aktive Abwehrmechanismen, die durch unspezifische Erkennung induziert werden, keine Infektion zulässt (HEITFUSS 1997). Einzelne Pathogene sind in der Lage, die natürlichen Barrieren zu durchbrechen und die Pflanze zu infizieren. Diese Interaktion ist demnach kompatibel.

Man unterscheidet zwischen konstitutiven Abwehrmechanismen, die permanent und unabhängig vom Befall vorhanden sind, und die induzierten Abwehrfaktoren, die durch den jeweiligen Stressimpuls erst ausgelöst werden und oftmals auch wieder eingestellt werden. Zu den konstitutiven Abwehrmechanismen zählen die strukturellen Barrieren, wie die Zellwand und ihre Einlagerungen von Suberin und Lignin. Das sind natürliche Inhaltsstoffe der Zellwand und haben eine Schutzfunktion gegenüber Stressfaktoren. Die Cutikula und das Periderm, ein sekundäres Schutzgewebe, zählen ebenfalls zu den konstitutiven Abwehrmechanismen. Lignine und Pektine können unter bestimmten Bedingungen entweder verstärkt akkumuliert oder aus den Zellwänden ausgeschieden werden und durch extrazelluläre Enzyme polymerisiert werden (SCHNEPF 1973). Die Modifikation in der Zellwand, d.h. die verstärkte Einlagerung von Lignin, ist vermutlich eine erste Abwehrreaktion auf Pathogene oder allgemeine Stresssituationen. In einem weiteren Schritt ist es wahrscheinlich für die Pflanze notwendig, auf induzierbare Mechanismen zurückzugreifen. Voraussetzung dafür ist, dass das Pathogen von sogenannten Signalmolekülen erkannt wird. Auf diese Elicitoren wird später näher eingegangen.

Von zentraler Bedeutung auf Zellebene sind zwei Örtlichkeiten: zum einen, die feste Zellwand und zum anderen, ein vom Tonoplasten umschlossener Zellsaftraum, die Vakuole. Zu den wichtigsten Aufgaben der Vakuole zählen zum einen die Funktion als Speicherraum von Nährstoffen, wie beispielsweise Zucker und Aminosäuren, auf die bei Nährstoffmangel zurückgegriffen wird. Zum anderen dient die Vakuole als Ablagerungsort für eine Vielzahl von Phenolen, Tanninen oder Flavonoiden (WINK 1999). Das können toxische Verbindungen sein, die die normalen Stoffwechselvorgänge zellulär beeinträchtigen können. Beispiele für

solche Verbindungen sind Alkaloide, pflanzeigene Abwehrstoffe gegen Fraßfeinde, Schwermetallionen oder Natriumionen bei Salzstress.

Neben diesen wichtigen Funktionen der Vakuole zur Stressabwehr spielt auch die Zellwand eine Schlüsselrolle, besonders bei der Abwehr von Pathogenen. Dort können Ionen, die manchmal für die Pflanze selbst toxisch sein können, teilweise unschädlich gemacht werden (SCHALLER 2002). Auch in der Zellwand sind wie bereits erwähnt sekundäre Pflanzenstoffe lokalisiert. Außerdem vollzieht sich hier der erste Schritt der Abwehr, durch den induzierte Abwehrmechanismen in Gang gebracht werden. Dabei werden die Pathogene durch Signalmoleküle, den sogenannten Elicitoren, an der Zelloberfläche erkannt, die von bestimmten Proteinen, den sogenannten Rezeptoren, erkannt und gebunden werden. Man unterscheidet endogene Elicitoren, die durch den enzymatischen Abbau durch Zellwandbestandteile als Oligosaccharide bekannt sind, und exogene Elicitoren, die als Proteine, Glykoproteine und Fettsäuren eine größere strukturelle Vielfalt aufweisen (PETTERS 2001). Die Folge der Signaltransduktion ist sehr komplex und spezifisch. So werden u.a. verschiedene Ionenkanäle geöffnet, reaktive Sauerstoffspezies gebildet und Enzymaktivitäten unter Beteiligung von Ethylen, Jasmonatsäure und Linolensäure geändert. Der abschließende Schritt in der Signaltransduktionskette ist die Aktivierung der Abwehrgenexpression (MALECK & DIETRICH 1999), die zur Folge hat, dass die Transaktivatoren aktiviert werden und zahlreiche Proteine mit u.a. antimikrobieller Funktion und z.B. die Familie der PR-Gene (*pathogenesis related genes*) synthetisiert werden. Desweiteren werden von der Pflanze eine große Anzahl verschiedener organischer Verbindungen produziert, die sogenannten sekundären Pflanzenstoffe. Im Gegensatz zu den primären Stoffmetaboliten, wie Aminosäuren, Chlorophyll, einfache Kohlenhydrate oder Nukleotide, die essentiell am Wachstum, an der Atmung und an den Stoffwechselprozessen der Pflanze beteiligt sind und in jeder Pflanze allgegenwärtig sind, kommen die Sekundärmetabolite nur spezifisch vor, werden oftmals nur in bestimmten Situationen gebildet und werden je nach Bedarf auch wieder abgebaut. Außerdem sind sie pflanzenspezifisch (PETTERS 2001), d.h. spezifische Sekundärmetabolite kommen nur in bestimmten Pflanzenspezies vor und haben spezifische ökologische Funktionen, wie hier fokussiert den Schutz gegen Pathogene und die Antwort auf Stress.

Jede Pflanzenzelle verfügt über einen Stoffwechsel, der für die Aufrechterhaltung der Zelle essenziell ist. Neben diesem sog. Primärstoffwechsel betreibt die Pflanzenzelle einen sog. Sekundärstoffwechsel, in dem mehr als 100 000 Metabolite gebildet werden (SCHALLER 2002). Diese Sekundärmetabolite sind für die Basisfunktionen der Zelle nicht notwendig,

jedoch bekommen sie in ihrer Interaktion der Pflanze mit ihrer Umgebung eine entscheidende Bedeutung. Wie oben bereits erwähnt, können negative Umwelteinflüsse durch sie minimiert werden. Viele dieser Sekundärmetabolite dienen der Abwehr von Pathogenen und Herbivoren. Andere Pflanzenstoffe dienen als Lockmittel für Insekten, als Signalstoffe für Symbiosenbildung mit Pilzen (HELDT 1996) oder sie regulieren physiologische Prozesse in der Zelle, wie beispielsweise den Auxinstoffwechsel (CHALLICE & WILLIAMS 1970). Sekundärmetabolite werden entweder oberirdisch von blühendem oder vegetativem Gewebe abgegeben oder unterirdisch in die Rhizosphäre und in den Boden abgegeben.

Sekundäre Pflanzenstoffe sind in drei Kategorien einteilbar (HELDT 1996): Terpene, sogenannte Lipide, die aus Metaboliten der Glykolyse oder aus Acetyl-CoA synthetisiert werden (TAIZ & ZEIGER 2000). Beispiele sind Glucoside, wie das Digitoxigenin aus *Digitalis lanata* Ehrh. (KAISER et al. 1962), oder das Menthol aus *Mentha spec.*. Die zweite Gruppe schließt die stickstoffhaltigen Sekundärmetabolite ein, wie die Alkaloide. Dazu zählen z.B. das Nikotin aus *Nicotiana tabacum* L. oder Chinin. Alkaloide bestehen überwiegend aus Aminosäuren. Schließlich beinhaltet die dritte Kategorie die phenolischen Verbindungen, wie z.B. Tannine, Cumarine, Flavonoide oder Lignine (HELDT 1996). Diese Pflanzenstoffe werden im Shikimatsäurezyklus oder über den Acetat-Malonat-Weg gebildet. Da die sekundären Pflanzenstoffe nicht nur für andere Organismen toxisch wirken können, sondern auch die Pflanze selbst negativ beeinflussen können, hat die Pflanze Strategien entwickelt, sich davor zu schützen. Die Vakuole spielt auch hierbei wieder eine entscheidende Rolle. Sie ist nicht nur ein Abwehr- und Signalkompartiment, sondern in ihr werden auch toxische Verbindungen deponiert (s.o.). Ein Beispiel dafür ist Cumarin, welches als Abwehrschutz bei Fraßfeinden genutzt wird (SCHALLER 2002). Cumarin ist für die Pflanze selbst toxisch. Deshalb wird nur eine ungiftige Vorstufe des Cumarins, das Cumarsäure-Glucosid, in den Vakuolen gespeichert. Bei Befall brechen die Vakuolen auf, die Cumarsäure wird freigesetzt, kann mit dem benötigten Enzym Glycosidase reagieren und die phenolische Verbindung Cumarin wird wirksam (MATILE 1984).

Alle phenolischen Verbindungen besitzen einen aromatischen Ring mit ein oder mehreren Hydroxylgruppen und ihren abgeleiteten Derivaten (HARBORNE 1980) in Form von Zuckern, Säuren oder Oligo- und Polymeren (FRIEND 1985). Als Beispiel ist in Abbildung 1.5 die chemische Struktur der Kaffeesäure als Vertreter der phenolischen Verbindungen mit dem gemeinsamen Grundgerüst dargestellt.

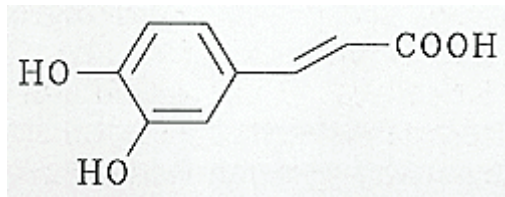


Abb. 1.5: Chemische Struktur von Kaffeensäure.

Der Shikimatstoffwechselweg kommt nur in Pflanzen, Pilzen und einigen Bakterien vor (BENTLEY 1990). Die Hauptaufgabe ist aromatische Aminosäuren zu synthetisieren. Durch die Synthese aromatischer Aminosäuren werden während des Shikimatstoffwechsels Vorstufen der meisten sekundären Pflanzenstoffe, wie Tannine, Alkaloide, Phenylpropanoide, Flavonoide oder Cumarine gebildet (HARBORNE 1980, HAHNBROCK & SCHEEL 1989 und KNAGGS 2003). In der Abfolge liegt der Shikimatweg vor dem Phenylpropanoidweg und stellt somit das Bindeglied zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel dar. Fast 20 % des Kohlenstoffs werden dort eingebunden (HASLAM 1993).

Im Shikimatstoffwechselweg (Abbildung 1.6) werden die drei lebenswichtigen aromatischen Aminosäuren gebildet: Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan, die aus dem gemeinsamen Vorläufer Chorismat synthetisiert werden (BENTLEY 1990). Die Synthese von Chorismat besteht aus sieben Schritten. Die beiden Ausgangsverbindungen für die Bildung der drei Aminosäuren sind Erythrose-4-phosphat und PEP (Phosphoenolpyruvat), die aus dem Kohlenstoffmetabolismus stammen. Die Kondensation von PEP, welches ein Intermediat aus der Glykolyse darstellt, und Erythrose-4-phosphat, das aus dem Pentosephosphatweg stammt, katalysiert die *3-Deoxy-D-arabino-heptulosonat-7-phosphat-Synthase (DAHPS)*. Da mehrere Isoformen von *DAHPS* nachgewiesen wurden (HERRMANN 1995), gibt es auch unterschiedliche Varianten ihrer Regulation. Im Gegensatz zum Isoenzym *DAHPS-Co²⁺* wird *DAHPS-Mn²⁺* durch Verwundung, Pathogenbefall oder Licht induziert (MCCUE & CONN 1990 und KEITH et al. 1991). Im zweiten Schritt dephosphoryliert die *Dehydroquinat-Synthase (DQS)* das Kondensat zu 3'-Dehydroquinat (BROWN 2003), welches von der *Dehydroquinat-Dehydratase (DQD)* und der *Shikimatdehydrogenase (SD)* über Dehydroshikimat zu Shikimat reduziert wird. In einem darauffolgenden Schritt phosphoryliert die *Shikimatkinase (SK)* Shikimat zu Shikimatphosphat, welches mit einem weiteren Molekül PEP aus dem Kohlenstoffwechselweg reagiert und mit Hilfe der *5-Enolpyruvyl-shikimat-3-phosphat-Synthase (EPSPS)* zu Enolpyruvylshikimatphosphat (EPSP) synthetisiert wird (BENTLEY 1990). Das letzte Enzym der Chorismatsynthese ist die *Chorismatsynthase (CS)*, welches die Reaktion zu Chorismat katalysiert. Auf dem Weg zur Phenylalanin- und

Tyrosinsynthese katalysiert die *Chorismatmutase (CM)* die Umwandlung des Enolpyruvatrestes am Chorismat.

Der erste Syntheseschritt von Erythrose-4-phosphat und PEP ist in den Chloroplasten lokalisiert. Unklar ist, ob der vollständige Shikimatzyklus im Zytosol stattfinden kann. Vermutlich werden über den Syntheseweg in den Chloroplasten vorrangig aromatische Aminosäuren synthetisiert und auf zytosolischem Weg Vorstufen der Sekundärmetabolite bereitgestellt (JENSEN 1985, WEAVER 1997).

Phenole können wirksam gegen pilzliche, bakterielle und virale Infektionen sein (ELSTNER et al. 1996). Die Komponenten, die hier von Interesse sind, sind die zwei wichtigsten Vertreter der Catechine oder der monomeren Flavan-3-olen, das Diastereomerenpaar (+)-Catechin und (-)-Epicatechin. Sie kommen entweder in freier Form, an Gallussäure gebunden sowie als Glycoside vor. Die Synthese der Anthocyane, der Flavan-3-ole und der Proanthocyanidine ist bislang im Detail noch nicht geklärt (FORKMANN 1993). Nach Erkenntnissen von XIE et al. (2003) wird das Epicatechin durch das Enzym *Anthocyanidinreduktase* gebildet. Sowohl Catechin als auch Epicatechin können Ketten mit über zehn Einheiten bilden aufgrund von verschiedenen Kopplungsmöglichkeiten an allen freien Wasserstoffbrücken. Daher wird die antioxidative und radikalfangende Wirkung verstärkt (BORS 2004). Allgemein besitzen Catechine astringierende Eigenschaften und besitzen eine hohe Affinität zur Komplexierung von Proteinen (HAGEMANN & BUTLER 1981). Dies stellt eine wichtige Funktion zum Schutz gegen eindringende Mikroorganismen dar. Oligomere Flavanole besitzen die Fähigkeit, Enzyme zu inhibieren (GOLDSTEIN & SWAIN 1965, MORNAU & TREUTTER 2003) und eine Veränderung von pilzlichen Enzymen hervorzurufen (SALUNKHE et al. 1990).

Desweiteren sind während dieser Arbeit 4-Hydroxybenzoesäure, Ferulasäure, Zimtsäure, Chlorogensäure, *p*-Cumarsäure und 3,4-Dihydroxybenzoesäure von besonderer Bedeutung, da sie nachweislich in höheren Pflanzen eine Rolle bei der Pathogenabwehr spielen und z.T. fungizide Wirkung nachsichrufen (ALT & SCHMIDLE 1980).

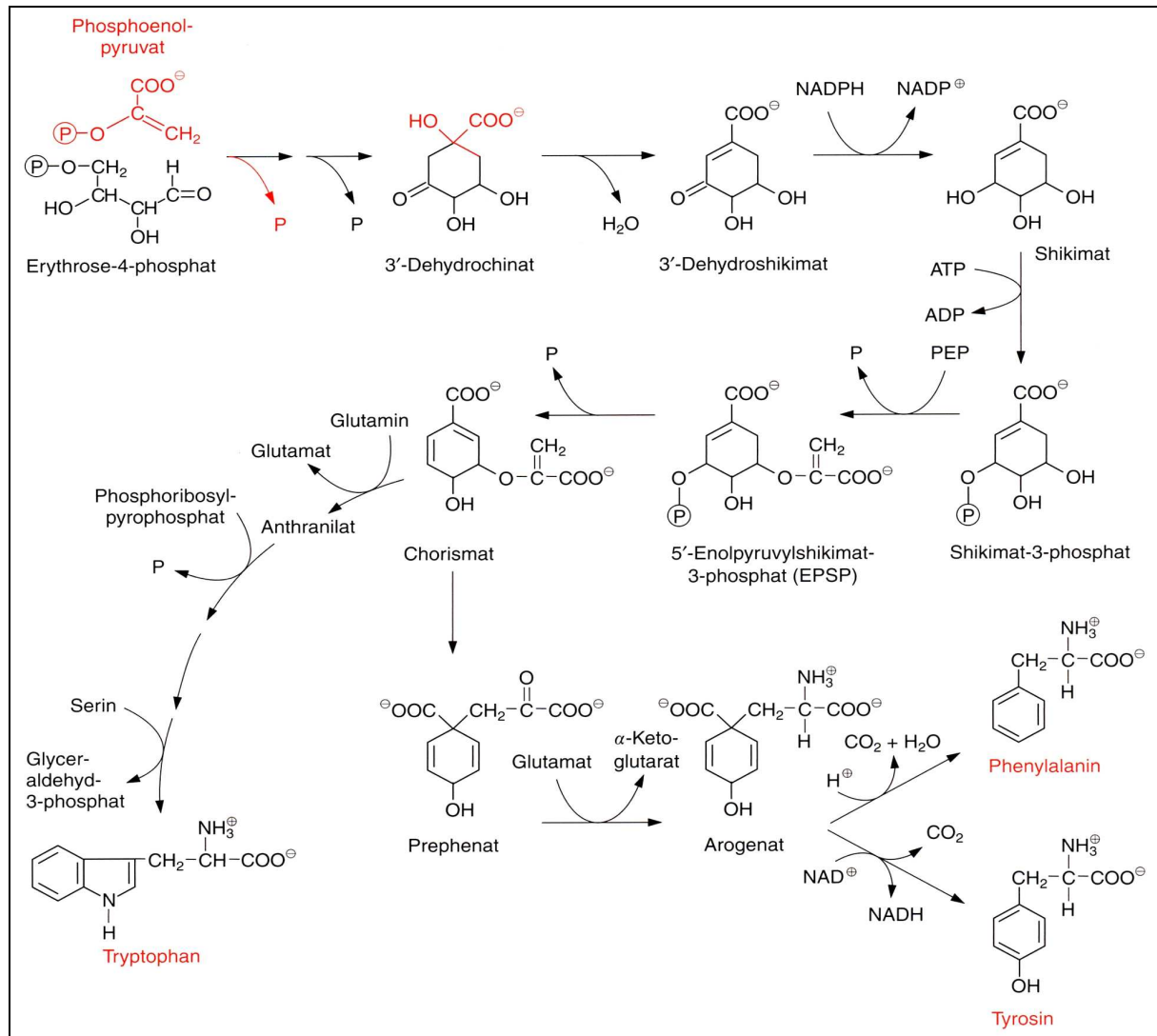


Abb. 1.6: Überblick des Shikimatstoffwechselwegs (modifiziert nach HELDT 1996).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollten unter Berücksichtigung der Buchenkomplexkrankheit anatomische, physiologische und molekularbiologische Veränderungen an geschädigten und gesunden Buchen untersucht werden.

Das neuartige Schadbild der Buche warf Fragen auf, die in dieser Arbeit geklärt werden sollten:

- Handelt es sich dabei um die bereits bekannte Erkrankung der klassischen Buchenkomplexkrankheit oder um eine neue, bisher nicht beschriebene Erkrankung?
- Können die holzbrütenden Käfer außer vorgeschädigtem Holz und Totholz auch gesunde stehende Buchen befallen?

- Liegt bei den vital aussehenden Bäumen eine von außen nicht erkennbare Schädigung vor?

Die bisherigen Untersuchungen (Kap. 1.2) führten zu Überlegungen, ob es Veränderungen im physiologischen Stoffhaushalt der Buche gibt. Ändern sich die Gehalte und die Zusammensetzung der phenolischen Verbindungen in der Rinde und im Holz?

Zur differenzierten Betrachtung sollten die Beobachtungen der anatomischen Analysen *Trypodendron* befallener Rinden- und Holzproben mit gesundem Vergleichsmaterial (Kap. 2.1) und mit den physiologischen Merkmalen in Korrelation gesetzt werden und Veränderungen heraus kristallisiert werden.

Bei Pathogenbefall an Bäumen gilt die Rinde als Eintrittsstelle und somit als erstes Gewebe, das auf die Situation reagiert. Aus diesem Grund lag der Focus der hier durchgeführten Untersuchungen auf der Rinde. Der Sekundärmetabolismus und die gebildeten phenolischen Verbindungen haben unter pflanzlichen Stressbedingungen eine zentrale Bedeutung und sollten näher betrachtet werden, indem physiologische Veränderungen in den befallenen Rindenproben aufgezeigt wurden. Die Gesamtphenolgehalte und die quantifizierte Verteilung einzelner Phenolsäuren in der Rinde sollten Aufschluss über die Rolle der Sekundärmetabolite unter Pathogenbefall an Buche geben.

Genexpressionsanalysen sollten mittels quantitativer realtime PCR und Micro Array Technik einen besseren Einblick über die Regulation der Transkripte geben, die am Abwehrverhalten an Buche maßgeblich beteiligt sind. Bisher wurden diese Techniken nur an Blattmaterial durchgeführt. Die Analysen aus Buchenrinde stellte ein Novum dar und sollte neue Aspekte über das molekularbiologische Abwehrverhalten der Buchenrinde auf Expressionsebene zeigen.

2. Material und Methoden

2.1 Untersuchungsgebiete und Materialgewinnung

2.1.1 Paarversuch

In einem Paarversuch wurden *Trypodendron* befallene und unbefallene Buchen (*Fagus sylvatica* L.) Mitte Juli 2003 und Ende November 2005 in Rheinland-Pfalz, Forstamt Saarburg (Abt. 147a, Revier Klink) für anatomische Untersuchungen (Kap. 2.3), für physiologische Untersuchungen (Kap. 2.4) sowie für molekularbiologische Untersuchungen (Kap. 2.5) beprobt. Die Buchen standen in einem Laubmischbestand und waren 123 bis 133 Jahre alt. Die Höhenlage der Fläche betrug 590 – 660 m ü. NN und hatte eine leicht geneigte NW-Exposition. Der Boden war als mittel- bis tiefgründige Braunerde mit ärmerer Nährstoffversorgung eingestuft, die aus überwiegend devonischem Tonschiefer bestand (Bestandesblatt des Forsteinrichtungswerks des Landes Rheinland-Pfalz, 2003). Die Jahresdurchschnittstemperatur lag 2003 bei 10,13 °C, die Luftfeuchte betrug 68,3 % und die durchschnittliche monatliche Niederschlagsmenge lag bei 68,6 mm (Tab. 2.1). Als befallen wurden die Buchen eingestuft, die in den Jahren 2001 und 2002 durch *Trypodendron domesticum* L. befallen waren. In der Regel war der Befall an der Nordostseite lokalisiert und anhand von kleinen Bohrlöchern und hellen Bohrmehlhäufchen erkennbar. In unmittelbarer Nachbarschaft wurde ein gesund erscheinender Baum als dazugehörige Kontrolle beprobt. Die Ernte der Rinden- und Holzstücke erfolgte in Brusthöhe jeweils an Nord- und Südseite der Bäume. Mit einem Zuwachsbohrer (Durchmesser: 1 cm) wurden für die anatomischen Untersuchungen ca. 5 cm lange Bohrkerne entnommen. Diese wurden in FAE-Lösung (JOHANSEN 1940) oder unbehandelt transportiert und bis zur weiteren Analyse gelagert. Mit einem Stechbeitel wurden für die physiologischen und molekularbiologischen Untersuchungen Rindenstücke herauspräpariert und sofort nach Entnahme auf Trockeneis tiefgefroren, nach Göttingen transportiert und bis zur weiteren Bearbeitung bei –80 °C gelagert.

Neben den Kontrollbäumen aus Rheinland-Pfalz wurde weiteres Kontrollmaterial von Kalkstandorten geerntet. Dazu wurde im März 2005 aus zwei Reinbeständen in Sachsen-Anhalt, Forstamt Halberstadt (Abt. 633 Aa1 und 768 a1, Revier Huy) Probenmaterial gesammelt. Der erste Bestand, 130jährige Buchen, lag 260 m ü. NN, hatte eine Nordhanglage von 30 % und stand auf Muschelkalk mit Lößlehmauflage. Der zweite Bestand, 160jährige

Buchen, lag 290 m ü. NN, hatte eine Südneigung von 32 %, ebenfalls auf Muschelkalk mit Lößlehmauflage. Hier lag die Jahresdurchschnittstemperatur im Jahr 2005 bei 10,02 °C, die Luftfeuchte betrug 77,42 % und die durchschnittliche monatliche Niederschlagsmenge lag bei 47,5 mm (Tab. 2.2). Es wurden Bohrkern in Brusthöhe (Durchmesser: 0,5 cm, Länge: ~ 5 cm) entnommen und Rindenstücke mit einem Stechbeitel herauspräpariert. Die Rindenstücke wurden sofort nach Entnahme auf Trockeneis gelagert, transportiert und bei –80 °C bis zur weiteren Analyse gelagert. Die Bohrkern wurden getrocknet und bei RT bis zur weiteren Analyse gelagert.

Weiteres Material stammte aus Niedersachsen, Forstamt Reinhausen (Abt. 163a, Revier Sattenhausen). Dort wurde im März 2005 Rindenmaterial an frisch gehauenen 120jährigen Buchen ohne Rotkern in einem Edellaubmischbestand geerntet. Das auf Eis gelagerte Material wurde nach dem Transport sofort bei –80 °C gelagert. Der Standort lag 351 – 400 m ü. NN auf Kalksteinverwitterungslehmboden. Die Jahresdurchschnittstemperatur lag in Reinhausen 2005 bei 9,4 °C, die relative Luftfeuchte betrug 77 % und die durchschnittliche Niederschlagsmenge lag bei 55,3 mm pro Monat (Tab. 2.3).

Tab. 2.1: Witterungsdaten der Region des FA Saarburg. Angegeben sind die jährlichen Mittelwerte der Temperatur, der monatlichen Niederschlagsmenge und der relativen Luftfeuchte bzw. die Mittelwerte der Vegetationsperioden von Mai bis einschließlich September der Jahre 2002 bis 2005 (Quelle: Deutscher Wetterdienst, Offenbach).

Datum	Temperatur [°C]	Luftfeuchte [%]	Niederschlagsmenge/Monat [mm]
2002	9,83	76,3	94,0
2003	10,13	68,3	68,6
2004	9,08	73,9	86,7
2005	9,43	73,50	74,7
05/2002 - 09/2002	15,58	70,2	54,6
05/2003 - 09/2003	17,92	60,6	66,3
05/2004 - 09/2004	15,44	66,2	107,2
05/2005 - 09/2005	15,98	64,8	73,7

Tab. 2.2: Witterungsdaten der Region des FA Halberstadt. Angegeben sind die jährlichen Mittelwerte der Temperatur, der monatlichen Niederschlagsmenge und der relativen Luftfeuchte bzw. die Mittelwerte der Vegetationsperioden von Mai bis einschließlich September der Jahre 2002 bis 2005 (Quelle: Deutscher Wetterdienst, Offenbach).

Datum	Temperatur [°C]	Luftfeuchte [%]	Niederschlagsmenge/Monat [mm]
2002	9,94	80,0	74,2
2003	10,13	73,5	40,5
2004	9,83	78,3	48,2
2005	10,02	77,4	47,5
05/2002 - 09/2002	17,00	75,8	91,7
05/2003 - 09/2003	18,22	64,0	46,2
05/2004 - 09/2004	16,08	72,8	55,4
05/2005 - 09/2005	16,62	71,2	51,2

Tab. 2.3: Witterungsdaten der Region Göttingen. Angegeben sind die jährlichen Mittelwerte der Temperatur, der monatlichen Niederschlagsmenge und der relativen Luftfeuchte bzw. die Mittelwerte der Vegetationsperioden von Mai bis einschließlich September der Jahre 2002 bis 2005 (Quelle: Deutscher Wetterdienst, Offenbach).

Datum	Temperatur [°C]	relative Luftfeuchte [%]	Niederschlagsmenge/Monat [mm]
2002	9,70	78,1	82,0
2003	9,40	72,3	45,8
2004	9,10	76,4	59,8
2005	9,40	77,0	55,3
05/2002 - 09/2002	16,7	76,2	87,8
05/2003 - 09/2003	17,2	67,9	47,7
05/2004 - 09/2004	14,9	72,8	56,5
05/2005 - 09/2005	17,7	73,3	58,6

2.1.2 Jahresverlauf

25jährige Buchen wurden während der Vegetationsperiode (von Mai bis September) regelmäßig beprobt. Dazu wurden monatlich an vier Buchen Rindenstückchen mit einem Stechbeitel entnommen und sofort auf Eis gelagert. Eine der vier Buchen wurde von Mai bis September 2004 beprobt, die übrigen wurden jeweils nur einmal beprobt, so dass gewährleistet war, dass es sich um Bäume ohne vorherige Verletzungen handelte. Der Laubmischbestand befand sich oberhalb des Forstbotanischen Gartens in Göttingen in einer Höhenlage von 215 bis 225 m ü. NN in SO-Exposition. Der Boden war ein angefüllter Boden mit Lößlehmeinlage. Dort herrschte im Jahr 2004 eine Jahresdurchschnittstemperatur von 9,10 °C, die Luftfeuchte betrug 76,4 % und die durchschnittliche monatliche

Niederschlagsmenge lag bei 59,8 mm (Tab. 2.3). Bis zur weiteren Bestimmung des Gesamtphenolgehaltes (Kap. 2.4.1) lagerte das Rindenmaterial bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.1.3 Froststressexperiment

Anfang November 2004 wurde eine halbstämmige Frostexposition an Buchenstämmen in einem Laubmischbestand oberhalb des Forstbotanischen Gartens (Kap. 2.1.2) durchgeführt. Die Frostbehandlung erfolgte mit Plastiktüten, die mit klein gehacktem Trockeneis ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) gefüllt, eine durchschnittliche Temperatur von etwa $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ an der Stammoberfläche erzielten. Der Froststressbereich wurde mittels Goldfolie (Fa. Kalff, Euskirchen) nochmals isoliert, um die Temperatur möglichst lange konstant zu halten (Abb. 2.1). Der Froststress erfolgte über ca. sechs Stunden. Die Behandlungsstellen wurden mit Filzschreiber markiert. Nach der Vegetationsphase im November 2005 wurden die dem Froststress ausgesetzten Aststücke herausgesägt und fixiert (Kap. 2.3.1). Die gegenüberliegenden Asthälften wurden als Kontrollen beprobt.

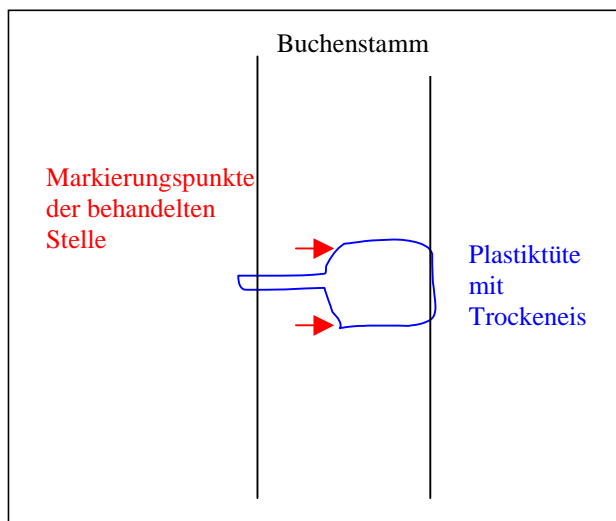


Abb. 2.1: Versuchsaufbau der Froststress-Simulation.

2.1.4 Stichverletzungsversuch

Der Versuch erfolgte an gesunden Buchen im Laubmischbestand des Forstbotanischen Gartens (Kap. 2.1.2) durch Verletzung mit Insektennadeln.

Mitte Mai 2005 wurden je drei Äste von drei Buchen mit glatter Rindenoberfläche auf einer 3 x 2 cm großen Rindenfläche mit Insektennadeln verletzt. Die Nadel (38 mm lang, Durchmesser: 0,30 mm) wurde eingestochen, bis sie auf Widerstand stieß. Dabei konnte es sich um primäre Phloemfaserbündel, um die Kambiumregion oder das neu gebildete Holz handeln. Die Abstände der Einstiche waren unregelmäßig in einem Abstand von 2 bis 8 mm. Nach der Vegetationsphase (Anfang Oktober 2005) wurden die behandelten Stücke herausgesägt und in FAE-Lösung fixiert und dort bis zur weiteren Analyse gelagert (Kap. 2.3).

2.2 Chemikalien

Soweit nicht anders erwähnt, wurden für die Versuche der vorliegenden Arbeit Chemikalien der Firma Merck (Darmstadt) und Enzyme der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) in p.a. bzw. reinst Qualität verwendet. Die molekularbiologischen Kits wurden, soweit nicht anders beschrieben, nach Herstellerprotokoll verwendet. Alle wässrigen Lösungen und Arbeitsschritte mit Wasser wurden mit MilliQ Wasser (Arium 611, Fa. Sartorius, Göttingen) angesetzt und durchgeführt.

2.3 Anatomische Untersuchungen

2.3.1 Fixierung und Anfertigen von Mikrotomschnitten

Um rinden- und holzanatomische mikroskopische Beobachtungen durchzuführen, musste das Probenmaterial nach der Ernte in FAE - Lösung (Ethanol (70 %), Formaldehyd (37 %), Eisessig im Verhältnis 18:1:1) konserviert werden und mindestens eine Woche in Ethanol (70 %) inkubiert werden. Mit einem Schlittenmikrotom (Fa. Reichert, Wien) oder mit einem Gefriermikrotom (Fa. Jung, Heidelberg) wurden 20 – 30 µm dicke Quer- und Längsschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden in Toluidinblau (0,05 % in 50 mM Phosphatpuffer, pH 7.0) (O'BRIEN et al. 1964) oder Phloroglucin/HCl für 3 min inkubiert und mit Wasser abgespült oder blieben ungefärbt. Anschließend wurden die Schnitte in 50 % Glycerin auf Objektträgern (76 x 26 mm, Fa. Menzel, Braunschweig) mit einem Deckglas (24 x 24 mm, Fa. Menzel, Braunschweig) eingedeckelt.

2.3.2 Paraffineinbettung

In einigen Fällen war es notwendig, die Rinden- und Holzstücke in Paraffin einzubetten, um saubere Mikrotomschnitte anfertigen zu können und das Reißen des Gewebes beim Schneiden zu verhindern. Dafür mußte das frisch geerntete Probenmaterial in FAE –Lösung (Ethanol (70 %), Formaldehyd (37 %), Eisessig im Verhältnis 18:1:1) mindestens eine Woche fixiert werden, damit das Gewebestück vollständig von der Lösung durchdrungen wurde. Anschließend wurden die Präparate einer Alkohollösung in steigender Konzentration ausgesetzt (Tabelle 2.4). Diese Konzentrationsreihe entzog dem Gewebe Wasser. Danach wurden den Präparaten Isopropanol/Roti-Histol (Fa. Roth, Karlsruhe) Lösungen in steigender Roti-Histol Konzentration und abnehmender Isopropanol Konzentration zugesetzt, um den Alkohol zu verdrängen und die spätere Paraffinaufnahme zu ermöglichen (HUTZSCHENREUTHER & BRUMMER 1984). Zum Ausbetten der Gewebestückchen wurden sie in Aluschälchen gelegt und auf einer Heizplatte (Fa. Schütt, Göttingen) mit flüssigem 40°C erwärmten Paraffin (Roti-Plast, Fa. Roth, Karlsruhe) übergossen. Nach Abkühlung der Paraffinblöckchen wurden sie auf passende Holzklötzchen präpariert, um eine bessere Handhabung beim späteren Schneiden (Kap. 2.3.3) zu ermöglichen.

Tab. 2.4: Inkubationsschema zur Paraffineinbettung.

Lösung	Temperatur	Inkubationszeit
70 % Ethanol	RT	1 - 2 h
80 % Ethanol	RT	30 min
90 % Ethanol	RT	30 min
96 % Ethanol	RT	30 min
96 % Ethanol/Isopropanol (1:1)	RT	30 min
Isopropanol	RT	30 min
Isopropanol/Roti-Histol (3:1)	RT	30 min
Isopropanol/Roti-Histol (1:1)	RT	30 min
Isopropanol/Roti-Histol (1:3)	RT	30 min
Roti-Histol	RT	30 min
Roti-Histol	RT	30 min
Roti-Histol	RT	30 min
Kaltgesättigte Roti-Plast-Lösung in Roti-Histol	RT	1 - 2 h
Warmgesättigte Roti-Plast-Lösung in Roti-Histol	40 °C	1 - 2 h
Reines geschmolzenes Roti-Plast	60 °C	1 - 2 h
Reines geschmolzenes Roti-Plast	60 °C	8 - 12 h

2.3.3 Schneiden und Entparaffinierung

Nach Aushärtung der Paraffinblöcke wurden mit einem Schlittenmikrotom (Fa. Reichert, Wien) 20 – 30 µm dicke Querschnitte angefertigt und auf gelatinierte Objektträger (Kap. 2.3.4) aufgenommen. Diese wurden 3 x in Roti-Histol, 1 x in Roti-Histol/Isopropanol (1:1) und 2 x in Isopropanol jeweils für 5 Minuten inkubiert, über absteigende Alkoholkonzentrationen (96 %, 70 %, 50 %, 30 %) in Wasser gebracht und fakultativ mit Toluidinblau oder Phloroglucin gefärbt (Kap. 2.3.1). Zum Schluß wurden die Schnitte mit Euparal (Fa. Roth, Karlsruhe) unter einem Deckglas eingedeckt und konnten als Dauerpräparate verwendet werden.

2.3.4 Anfertigung von gelatinierten Objektträgern

Um gelatinierte Objektträger herzustellen, wurden die Objektträger mit Aceton und Seifenwasser gründlich gereinigt und mit Wasser abgespült. In einem Glasträger wurden sie zwei Tage in Detergens (Extran AP 15) bei RT inkubiert und anschließend zwei Stunden unter fließendem Leitungswasser gespült. Nach erneutem Abspülen mit Wasser wurden die Objektträger in eine frisch angesetzte und filtrierte Gelatinelösung (0,05 % KaliumchromIII-sulfat, 0,5 % Gelatine, 99,45 % Wasser) getaucht und für zwei Stunden getrocknet.

2.3.5 Mikroskopisch-histologische Auswertung der Präparate

Die mikroskopische Analyse und Beurteilung der gefärbten und ungefärbten auf dem Objektträger fixierten Präparate erfolgte am Lichtmikroskop (Axioplan, Fa. Zeiss, Oberkochen) und am Fluoreszenzmikroskop (Fa. Zeiss, Oberkochen) und wurde mit einer aufgesetzten Digitalkamera (Coolpix 990, Fa. Nikon, Tokio) festgehalten.

2.3.6 Makroskopische Beurteilung der Bohrkerne

Getrocknete Bohrkerne wurden mit einer Langbandschleifmaschine (LBSM 2505, Fa. Holzkraft, Hallstadt) mit einem Schleifband der Körnung 600 geschliffen und mit Hilfe einer Stereolupe (Stemi SV 11, Fa. Zeiss, Oberkochen) optisch beurteilt, um Unregelmäßigkeiten im Holzaufbau zu erkennen.

2.4 Physiologische Untersuchungen

2.4.1 Bestimmung des Gesamtgehalts an phenolischen Verbindungen

Zur Bestimmung des Gesamtgehalts an löslichen und an zellwandgebundenen phenolischen Verbindungen wurde das gefrorene Rindenmaterial mit Hilfe einer Retschmühle (MM 2000, Fa. Retsch, Haan) durch Kühlung mit flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver gemahlen und je 200 mg zur weiteren Methanolextraktion (PRITCHARD et al. 1997) eingesetzt. Dazu wurden die Proben mit 5 ml 50 % Methanol eine Stunde bei 40 °C im Ultraschallwasserbad (Sonorex Super RK 510H, Fa. Bandelin, Berlin) inkubiert, anschließend 10 Minuten (4500 rpm, 4 °C) zentrifugiert (Rotanta 96 R, Fa. Hettich, Tuttlingen) und erneut mit 2 ml 50 % Methanol für 10 Minuten bei RT im Dunkeln extrahiert. Die photometrische Bestimmung der löslichen phenolischen Inhaltsstoffe erfolgte mit der Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz (LOWRY et al. 1951). Dazu wurden 100 µl des Methanolextraktes mit 500 µl einer 10 % Folin-Ciocalteus-Phenolreagenzlösung und 400 µl 7,5 % Natriumcarbonat versetzt. Nach einer Inkubation von 30 Minuten im Dunkeln bei RT wurde die Extinktion bei 765 nm mittels Spectrophotometer (DU 640, Fa. Beckman, Fullerton) gemessen. Als Referenz wurde eine Eichgerade anhand einer Catechin-Messreihe (Abbildung 2.2) erstellt. Je Probe wurden drei Wiederholungen durchgeführt.

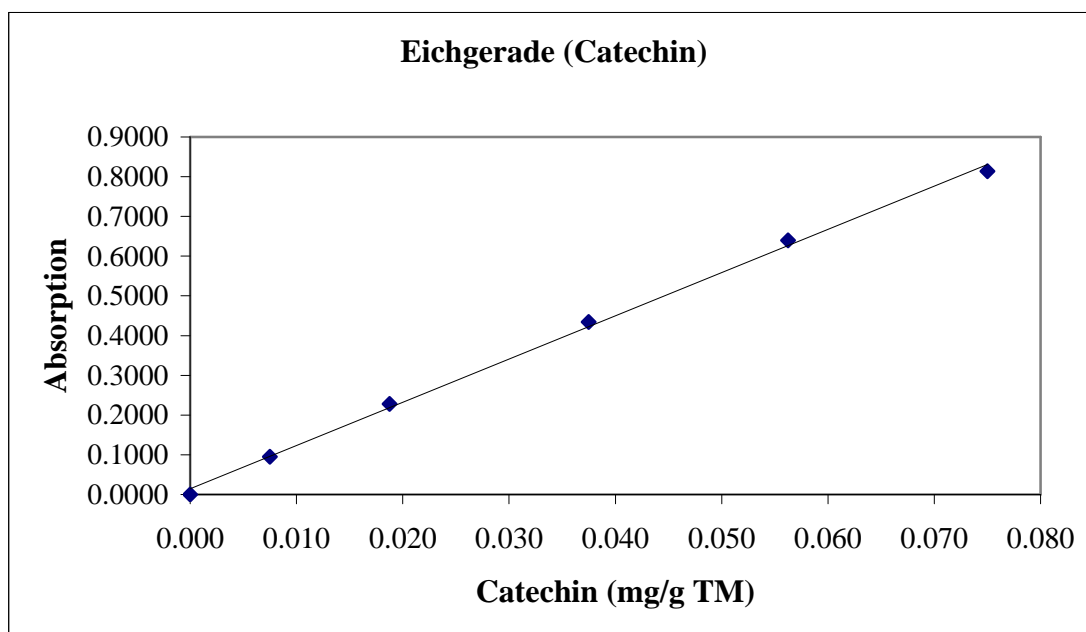


Abb. 2.2: Catechin-Messreihe als Referenz für die photometrische Bestimmung der löslichen phenolischen Inhaltsstoffe aus Buchenrinde und -holz.

Das Pellet aus der Methanolextraktion wurde bei 60 °C im Trockenschrank (Fa. Heraeus, Hanau) zwei Tage getrocknet und daraufhin einer NaOH-Extraktion unterzogen. Dazu wurde das Pellet mit 4 ml 1 M NaOH eine Stunde bei 40 °C im Ultraschallwasserbad (Sonorex Super RK 510H, Fa. Bandelin, Berlin) inkubiert, anschließend 10 Minuten (4500 rpm, 4 °C) zentrifugiert und erneut mit 2 ml 1 M NaOH für 10 Minuten bei RT im Dunkeln extrahiert. Zur Bestimmung der Gehalte an zellwandgebundenen phenolischen Inhaltsstoffen wurden 100 µl der Überstände mit 500 µl 10 % Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz und 400 µl 7,5 % Natriumcarbonat versetzt. Nach einer Inkubation von 30 Minuten im Dunkeln bei RT wurde die Extinktion bei 765 nm gemessen. Auch hier wurden je Probe drei Wiederholungen durchgeführt und als Referenz diente eine *p*-Cumarsäure-Eichgerade (Abb. 2.3).

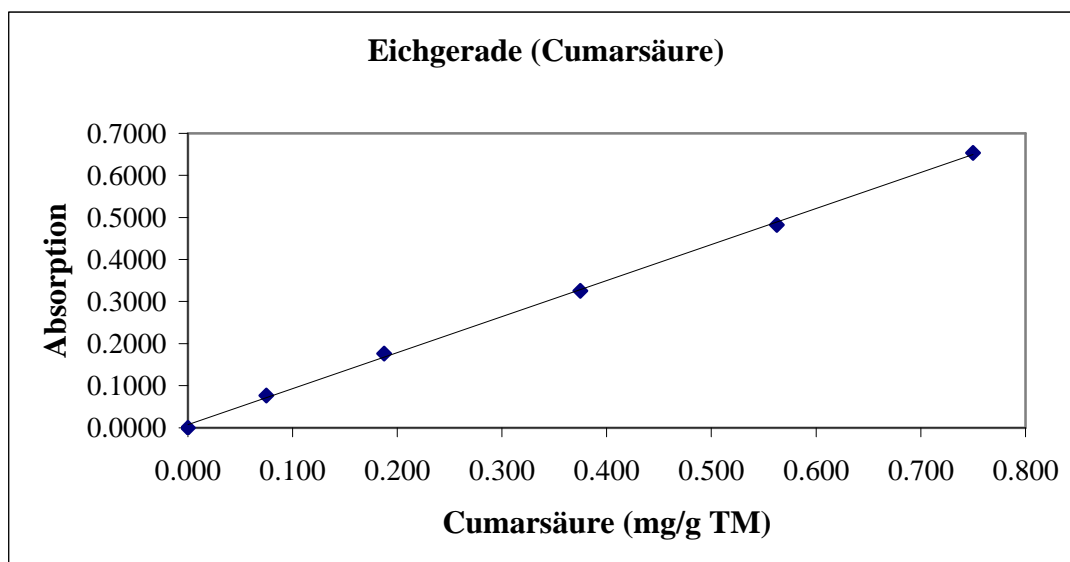


Abb. 2.3: *p*-Cumarsäure-Messreihe als Referenz für die photometrische Bestimmung der zellwandgebundenen phenolischen Inhaltsstoffe aus Buchenrinde und -holz.

2.4.2 HPLC Analytik phenolischer Inhaltsstoffe

Zur Bestimmung der löslichen Phenolgehalte in Buchenrinde wurde ein Hochleistungsflüssigkeitschromatograph (Fa. Beckman Coulter, Fullerton), bestehend aus einem binären Pumpensystem, automatischem Probengeber, heizbarem Säulenraum, Dioden-Array-Detektor und einem Auswertesystem eingesetzt. Die Auftrennung der Sekundärmetabolite erfolgte über eine "reversed phase" 18-Säule (5 µm, 250 x 4,6 mm, Ultrasphere, Fa. Beckman, Fullerton).

Um die Gehalte verschiedener phenolischer Inhaltsstoffe (s.u.) aus Buchenrinde zu bestimmen, wurden 20 µl des filtrierte Methanolextrakte (Kap.2.4.1) auf die Säule injiziert und mit einer Flussrate von 1ml/min mittels Zweischnittgradienten eluiert (SCHÜTZENDÜBEL 2000).

Laufmittelgradient:

<u>Laufzeit (min):</u>	<u>Laufmittel B (in %):</u>	<u>Gradientenprofil:</u>
0,0 – 1,0	10	isokratisch
1,0 – 46,0	10 → 60	linear
46,0 – 56,0	60 → 100	linear
56,0 – 59,0	100 → 10	linear
59,0 – 60,0	10	isokratisch

Die eingesetzten Laufmittel (A: 1,5 % Phosphorsäure, pH 2.5 und B: Wasser/Methanol/Acetonitril im Verhältnis 1:1:1, pH 2.5) wurden zuvor filtriert (Porengröße: 0,45 µm, Fa. Sartorius, Göttingen) und 30 Minuten im Ultraschallwasserbad (Sonorex Super RK 510H, Fa. Bandelin, Berlin) entgast. Die Detektion erfolgte bei 280 nm. Es wurden folgende Substanzen als Standards verwendet 4-Hydroxybenzoesäure, Ferulasäure, Zimtsäure, Chlorogensäure, (+)-Catechin, ρ-Cumarsäure und 3,4-Dihydroxybenzoesäure, von denen je vier Referenzstammlösungen mit Konzentrationen von 0,01 mM, 0,05 mM, 0,08 mM und 0,1 mM eingesetzt wurden. Die Identifizierung der Einzelstoffe erfolgte durch den Vergleich der Retentionszeiten der zu analysierenden Substanzen in der Probe mit denjenigen der Referenzsubstanzen.

Zur Bestimmung einzelner Catechinderivate ((+)-Catechin und (-)-Epicatechin) in Buchenrinde wurden 50 µl der Methanolextrakte (Kap. 2.4.1) auf die Säule injiziert und mit einer Flußrate von 1 ml/min eluiert.

Laufmittelgradient:

<u>Laufzeit (min):</u>	<u>Laufmittel A (in %):</u>	<u>Laufmittel B (in %):</u>
0 – 36	92	8
36 – 40	22	78

Die hierbei eingesetzten Laufmittel waren A: 0,1 % Phosphorsäure und B: Acetonitril. Die Detektion erfolgte bei 280 nm.

Es wurden (+)-Catechin und (-)-Epicatechin als Standards verwendet, von denen je drei Referenz-Stammlösungen mit Konzentrationen von 0,01 mM, 0,05 mM und 0,1 mM eingesetzt wurden.

2.5 Molekularbiologische Untersuchungen

2.5.1 RNA Isolation

Die Isolation von Gesamt-RNA aus Buchenrinde erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von CHANG et al. (1993). Das bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerte Pflanzenmaterial wurde mit Hilfe einer Retschmühle (MM 2000, Fa. Retsch, Haan) durch Kühlung mit flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver gemahlen. Aliquots von je 500 mg Rindenmaterial wurden in 3 ml $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ warmen Extraktionspuffer (s.u.) mit $60\text{ }\mu\text{l}$ β -Mercaptoethanol resuspendiert. Nach 15minütiger Inkubation bei $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Wasserbad und 15minütigem Schütteln (3018, Fa. GFL, Burgwedel) bei RT erfolgte eine zweimalige Extraktion mit je 3 ml Chloroform/Isoamylalkohol (24:1). Die Phasentrennung wurde jeweils durch Zentrifugation 11 000 rpm für 15 Minuten bei RT (Minifuge RF, Fa. Heraeus, Hanau) erreicht. Anschließend wurde die RNA mit dem 4fachen des Volumens an 10 M Lithiumchlorid über Nacht auf Eis im Kühlschrank gefällt und durch Zentrifugation (10 000 rpm, 20 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) sedimentiert. Die RNA wurde in $400\text{ }\mu\text{l}$ SSTE (s.u.) gelöst, 2 Minuten bei $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Thermomixer (Comfort, Fa. Eppendorf, Hamburg) aufgeschüttelt und einer weiteren zweimaligen Extraktion mit je $400\text{ }\mu\text{l}$ Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) unterzogen. Durch Zusatz von 2facher Volumenmenge 96% Ethanol wurde die RNA erneut gefällt (2 h, $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$), mit 70 % Ethanol zweimal gewaschen, in der Speedvac (Concentrator 5301, Fa. Eppendorf, Hamburg) bei $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingedampft und in $50\text{ }\mu\text{l}$ DMPC-Wasser gelöst.

Die Quantifizierung der präparierten RNA erfolgte durch photometrische Messung bei 260 nm (BioPhotometer V1.32, Fa. Eppendorf, Hamburg). Die Reinheit der RNA wurde durch die Quotienten OD 260/280 nm und 260/230 nm bestimmt. Die Faktoren sollten im Bereich von 1,8 und 2,1 liegen. Weiter wurde die Qualität der extrahierten RNA durch Darstellung in einem Agarosegel überprüft (Kap. 2.5.2).

Extraktionspuffer:

2 % CTAB

100 mM	Tris HCl (pH 8.0)
25 mM	EDTA
2 M	NaCl
2 %	PVP (K30)

SSTE:

0,5 %	SDS
10 mM	Tris HCl (pH 8.0)
1 mM	EDTA (pH 8.0)
1 M	NaCl

2.5.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der RNA durch Agarose-Gelelektrophorese diente zur Quantifizierung, Reinheitsüberprüfung und Immobilisierung, Fragment-Größenbestimmung, Kontrolle von Restriktionsverdau, Detektion von PCR-Produkten und zur gezielten Isolierung einzelner Fragmente. Die Gele bestanden aus 1,2 % (w/v) Agarose (SeaKem LE Agarose, Fa. Cambrex, Nottingham) in 10 % MEA-Puffer (10 x), die durch Aufkochen geschmolzen, in die Gelkammer gegossen wurde und nach 1minütigem Abkühlen mit 25 % Formaldehyd (37 %) versetzt wurde. Die Gelkammer und Gießvorrichtung wurden zuvor 1 h in 1 % SDS eingelegt, um RNasen zu inaktivieren. Vor dem Probenauftrag wurde den Proben jeweils 1 Volumen an 2 x Loading dye (s.u.) zugesetzt und es erfolgte eine Inkubation für 10 min bei 70 °C, um die RNA zu strecken. Als Größenstandard diente RNA- Ladder High Range (Fa. Fermentas, St. Leon-Rot). Die Elektrophorese erfolgte bei 60 Volt in 1 x MEA-Puffer. Die RNA-Banden konnten dann durch UV-Licht sichtbar gemacht und photographiert werden (Fluor-S MultiImager, Fa. BioRad, München).

MEA-Puffer (10 x):

0,2 M	MOPS
0,05 M	Na-Acetat
0,01 M	EDTA

pH 7.0

Loading dye (2 x):

660 µl	Formamid
140 µl	H ₂ O
100 µl	MEA-Puffer (s.o.)
80 µl	Formaldehyd (37 %)
10 µl	Bromphenol Blau
10 µl	Ethidiumbromid

2.5.3 Quantitative real-time-PCR

Die quantitative RT-PCR basiert auf den Eigenschaften des kinetischen Verlaufs der DNA-Synthese. Charakteristisch dafür sind die exponentielle Phase der Amplifikation, die limitierende Phase und die Plateauphase der Reaktion. Der Verlauf der Kinetik wird durch den Fluoreszenzfarbstoff SYBRGreen (Fa. ABgene, Hamburg), welches proportional zum amplifizierten PCR-Produkt vervielfältigt wird, mit Hilfe eines Detektors aufgezeichnet (HEID et al. 1996).

2.5.3.1 cDNA-Synthese

Die Synthese von cDNA für die anschließende RT-PCR erfolgte mit 5 µg Gesamt-RNA (Kap. 2.5.1) gelöst in 11 µl DEPC-Wasser, die mit 1 µl Oligo dT-Primer (Fa. Invitrogen, Karlsruhe) versetzt war. Zur Auflösung von Sekundärstrukturen wurde der Ansatz 10 Minuten auf 70 °C im Thermocycler (Fa. AppliedBiosystems, Foster City) erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt. Ein Reaktionsansatz bestand aus 4 µl Firststrand Puffer, 1 µl dNTP Mix (10 mM), 2 µl DTT, 0,5 µl RNase Inhibitor und 1 µl Superscript II (alles Fa. Invitrogen, Karlsruhe). Nach 90minütiger Inkubation bei 70 °C wurde die Reverse Transkriptase und die restliche RNA durch Zugabe von 1 µl RNase H (Fa. Amersham Biosciences, München) und 5 µl RNase A (Fa. Promega, Mannheim) bei 20minütiger Inkubation (Thermocycler: 37 °C) beseitigt.

2.5.3.2 real-time-PCR

Neun Enzymtranskripte wurden über die RT-PCR erfasst: das pflanzliche Stressgen *PRI* und aus dem Shikimatweg *DAHPS*, *DQS*, *DQD*, *SK*, *EPSPS*, *CS*, *CM* und *ACS2*. Die Analysen wurden mit dem Perkin Elmer TaqMan 7700 (Fa. AppliedBiosystems, Foster City) durchgeführt. Als Fluorophor kam SYBRGreen (ABSolute QPCR SYBR Green ROX Mix, Fa. Abgene, Hamburg) zum Einsatz. Die Primer wurden von GUNTER BETZ (Institut für Biochemische Pflanzenpathologie, GSF, Neuherberg) hergestellt. Die Sequenzen der Primer waren wie folgt:

PRI f: AGAGGAAGTT AAGGCTGGTA

PRI r: ACACAAGGTT TAGTTGTAGG

DAHPS f: GACATCCCAT GAATGCTTGC

DAHPS r: CCAGATAAAA TGGGCTGAGC

DQS f: GGCTAAGTTG CCTACTTCC

DQS r: GAGCCTTAGT AGTCCATCAG

DQD f: CTGGTAAGCT CTTTGTGGTC

DQD r: GTGCGATTGG CAATCACAAC

SK f: GGTTTCCTTG GAAGACGTTG

SK r: GCCCTCGATT TGTTC AAGTG

EPSPS f: GCTGTAGTTG CCCTTTTTC

EPSPS r: GTTCTGTGCA AACGGCAATC

CS f: GTTGACCTTG ACAGAAGGAG

CS r: CATTCTTCA GAAACGCCTG

CM f: GGCCAAA ACT TATGCCCAAG

CM r: CCCCATATAG ATCAGCAACC

ACS2 f: TCCAAACCGC ATAGTCATGG

ACS2 R: TGGTGAGGGC ACAAGAAAAG

Bei dieser Methode ist der Fluoreszenzfarbstoff an eine Sonde gebunden, die zwischen dem Forward- und Reverse-Primer bindet. Neben der Fluoreszenzmarkierung enthält die Sonde einen sog. Quencher, der das Aussenden des Fluoreszenzsignals verhindert, solange der Farbstoff und Quencher dicht beieinander sind. Erst wenn die Sonde durch Exonucleaseaktivität der TaqDNA Polymerase zerstört wird und Quencher und Farbstoff räumlich getrennt werden, wird ein Fluoreszenzsignal emittiert (GROVE 1999). Durch einen Vergleich mit bei jedem PCR Lauf mitgeführten Kontrollen ohne Template-DNA wurde ein Schwellenwert (threshold) ermittelt, der Rauschen von Signal trennt. Die Nummer des PCR-Zyklus, der diesen Schwellenwert erstmals überschreitet, wurde als ct-Wert bezeichnet, woraus anschließend die Kopienzahlen berechnet wurden.

Alle RT-PCR Untersuchungen (Tab. 2.5) wurden in 96-well Platten (Fa. AppliedBiosystems, Hamburg) in je 25 μ l Volumen durchgeführt, wobei 12,5 μ l auf SYBRGreen Mix, je 0,5 μ l auf die Primer, 10,5 μ l auf nukleasefreies Wasser und 1 μ l auf die cDNA entfielen.

Tab. 2.5: Programm für die RT-PCR.

Initiierung	2 min bei 50,0 °C	
Aktivierung der TaqPolymerase	15 min bei 95,0 °C	
Denaturierung	15 sec bei 95,0 °C	} 40 Zyklen
Polymerisation	1 min bei 60,0 °C	

2.5.4 Micro Array Analysen

Die Micro Array Technik basiert auf der Hybridisierung von Nukleinsäuren. Dabei lagern sich zwei komplementäre Nukleinsäuren-Einzelstränge über Wasserstoffbrückenbindungen zwischen ihren hydrophoben Purin- und Pyrimidin-Basen zusammen, um den Wasserkontakt zu minimieren. Die ersten Hybridisierungsversuche von DNAs und später RNAs unter Verwendung dieser Eigenschaften entwickelte ED SOUTHERN (1975). Micro Arrays bestehen aus einer definierten geometrischen Anordnung von Probenmolekülen (DNA-Moleküle mit definierter Sequenz), die auf einem Objektträger immobilisiert und fixiert wurden. Bei den hier durchgeführten Expressionsanalysen sollten die Untersuchungen Aufschluss über die

Auswirkungen des Genexpressionsmusters in den geschädigten und gesunden Buchenrinden (Kap. 2.1.1) geben.

Die in dieser Arbeit verwendeten Arrays wurden im Institut für Biochemische Pflanzenpathologie der GSF in Neuherberg hergestellt. Dazu wurden 1139 isolierte Oligonukleotide mechanisch auf Objektträger gespottet (Kap. 2.5.4.3). 578 PCR-Produkte davon waren nicht näher bekannt, die übrigen sind in funktionelle Gruppen eingeteilt worden (OLBRICH et al. 2005).

2.5.4.1 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurden 30 µg extrahierte Gesamt-RNA (Kap. 2.5.1) gelöst in 40 µl LiChroSolv-Wasser (Fa. Merck, Darmstadt) eingesetzt und mit 2 µl poly T-Primer (Fa. Invitrogen, Karlsruhe) versetzt. Zur Auflösung von Sekundärstrukturen wurde der Ansatz 10 min auf 70 °C im Thermocycler (Fa. AppliedBiosystems, Foster City) erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt. Der Reaktionsansatz bestand aus 16 µl Firststrand Buffer, 8 µl aa-dNTPs (10 x dUTP : dTTP = 4:1), 8 µl DTT, 4 µl Superscript und 1 µl RNase Out (alles Fa. Invitrogen, Karlsruhe). Nach Inkubation bei 42 °C über Nacht erfolgte die Zugabe von 26,6 µl 1 M NaOH und 26,6 µl 500 mM EDTA mit anschließender 15minütiger Inkubation bei 65 °C. Zur Neutralisation der Reaktion wurden 26,6 µl 1 M HCl zugegeben. Der Ansatz wurde mit 700 µl PB Puffer (QIAquick PCR Purification Kit, Fa. Qiagen, Hilden) versetzt, abzentrifugiert und auf Qiagen Säulchen (QIAquick PCR Purification Kit, Fa. Qiagen, Hilden) aufgetragen, 2 min bei 14 000 rpm zentrifugiert und die Membran 2 x mit 700 µl Phosphatwaschpuffer (s.u.) gewaschen. Nach 2maligem Eluieren mit je 35 µl Elutionspuffer (4 mM KPO₄) wurden die Proben in der Speedvac eingedampft und später zum Markieren eingesetzt.

Phosphatwaschpuffer:

0,5 %	95 % K ₂ HPO ₄ –Lösung (1 M), 5 % KH ₂ PO ₄ –Lösung (1 M) (pH 8.5 –8.7)
84,25 %	Ethanol (95 %)
15,25 %	H ₂ O bidest

2.5.4.2 Markierung

Beim Markieren der cDNA wurde das Nukleotid dUTP in der cDNA-Synthese (Kap. 2.5.4.1) eingesetzt, das eine reaktive NH₂-Gruppe enthält. In der Markierungsreaktion geht diese funktionelle Gruppe eine kovalente Bindung mit dem Fluoreszenzfarbstoff (Cy-3 bzw. Cy-5) ein. Dazu wurde ein Eppendorfgefäß Cy-Farbstoff (Cy-3 und Cy-5 Mono-Reactive Dye Pack, Fa. Amersham Biosciences, Freiburg) mit 20 µl DMSO versetzt, je 2 µl in Eppendorfgefäße aliquotiert und anschließend in der Speedvac eingedampft. Die getrocknete cDNA (Kap. 2.5.4.1) wurde in 11,5 µl 0,1 M Natriumcarbonat Puffer (Na₂CO₃, pH 9.0) aufgenommen und auf den getrockneten Aliquot-Farbstoff gegeben und mindestens eine Stunde im Dunkeln bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 35 µl 100 mM NaOAc (pH 5.2) wurde die Reaktion gestoppt. Die Aufreinigung erfolgte mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Fa. Qiagen, Hilden). Nach dem Vereinen der zu vergleichenden Cy-3- bzw. Cy-5-markierten cDNAs (*Trypodendron* befallene Probe und Kontrolle) konnte der Ansatz nach Eindampfen in der Speedvac bis zur weiteren Bearbeitung im Dunkeln gelagert werden.

2.5.4.3 Blocken und Prähybridisierung der Slides

Nachdem die PCR-Produkte durch den Spotter (Microgrid II, Fa. Biorobotics, Cambridge) auf den Slide (Aldehyde Coated Arraying Slides, Fa. Genetix, München) transferiert wurden, wurden die Slides zwei Tage getrocknet. Der Spotter, die Mikrotiterplatten mit den resuspendierten PCR-Produkten und die Objektträger befanden sich in einem geschlossenen Raum, in der die Luftfeuchtigkeit bei 70 % gehalten wurde.

In allen folgenden Arbeitsschritten wurde auf eine ununterbrochen gleichmäßige Benetzung der Slides geachtet und durch zügiges Arbeiten ein Trocknen der Oberfläche vermieden. So wurde gewährleistet, dass die Qualität der Arrays nicht durch störende Salzablagerungen oder ungleichmäßige Aktivierung der Slides verschlechtert wurde.

Um noch vorhandene Bindungsstellen zu besetzen und damit nicht mehr für unspezifische Hybridisierung zur Verfügung zu stehen, wurden die Slides vor der Hybridisierung geblockt. Dazu wurden die Slides 2 x für 2 min in 0,1 % SDS heftig geschüttelt, 2 min in Wasser geschüttelt und anschließend in frischem Wasser nochmals abgewaschen. Zur Denaturierung der DNA wurden die Slides 2 min in kochendes Wasser gegeben. Anschließend erfolgte der eigentliche Blockingschritt mit einer frisch angesetzten Natrium-Borhydridlösung (s.u.) für 5

min. Nach einem 2 x 1minütigen Waschschrift mit 0,1 % SDS und 1 min mit Wasser wurden die Slides kurz in vergälltem Alkohol inkubiert und auf Papier getrocknet.

Zur Prähybridisierung wurden 62 µl des 42 °C vorgewärmten Hybridisierungspuffer (s.u.) auf den Slide gegeben, mit einem Deckglas luftblasenfrei bedeckt und in Hybridisierungskammern (Vers Array, Fa. Biorad, München) bei 42 °C für eine halbe Stunde prähybridisiert. Die Slides wurden mit Wasser abgewaschen und für 10 min bei RT mit 900 rpm trocken zentrifugiert.

Natrium-Borhydridlösung:

0,75 g	NaBH ₄
200 ml	PBS (Phosphate Buffered Saline; 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na ₂ HPO ₄ • 7 H ₂ O, 0,24 g KH ₂ PO ₄ , H ₂ O auf 1 l; pH 7.2, autoklaviert)
75 ml	Ethanol (reinst)

Hybridisierungspuffer:

50 %	Formamid
5 x	SSC (0,075 M Natriumcitrat/HCl, 0,75 M NaCl; pH 7.0)
0,1 %	SDS
2 %	ssDNA (Salmon Sperm DNA, Fa. Sigma, Steinheim)

2.5.4.4 Hybridisierung

Die markierten und eingedampften Proben (Kap. 2.5.4.3) wurden mit 63 µl Hybridisierungspuffer (Kap. 2.5.4.3) aufgenommen und für 3 min bei über 90 °C denaturiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (14 000 rpm, 1 min, RT) wurden die vereinten Proben (30 µl Cy-3 und 30 µl Cy-5) auf den Slide gegeben, luftblasenfrei mit einem Deckglas abgedeckt und die Hybridisierungskammer in Alufolie eingepackt. Die Hybridisierung erfolgte für 16 bis 20 Stunden bei 42 °C.

Das Waschen erfolgte in 4 Schritten in abgedunkelten Falcontubes (Fa. Sarstedt, Nümbrecht): 4 min mit 1 x SSC und 0,2 % SDS, 4 min mit 0,1 x SSC und 0,2 % SDS und 2 x 2 min mit 0,1 x SSC ohne SDS. Nachdem die Slides nochmals mit Wasser kurz abgewaschen wurden,

wurden sie 10 min bei RT mit 900 rpm trocken zentrifugiert und bis zum Scannen im Dunkeln gelagert.

2.6 Statistische Auswertungen

Um statistisch abgesicherte Aussagen über die Ergebnisse treffen zu können, wurden bei den Phenolgehaltsbestimmungen und den Ligninbestimmungen immer dreifache Messungen durchgeführt und Mittelwerte sowie Standardabweichungen gebildet. Die Eichgeraden wurden ebenfalls dreifach bestimmt, gemittelt und nach linearer Regression als Referenz für die Gehaltsbestimmungen herangezogen.

Die HPLC Untersuchungen wurden pro Probe dreifach durchgeführt mit jeweils einem zusätzlichen Lauf mit internem Standardgemisch aller zu analysierenden Substanzen. Die quantitative Bestimmung erfolgte nach der Methode des externen Standards durch Integration der Peakflächen. Zur weiteren Auswertung der Ergebnisse wurde mit den Mittelwerten und den Standardabweichungen gearbeitet. Zur Quantifizierung wurden anhand der Referenzchromatogramme einfache lineare Regressionsgleichungen berechnet.

Das Einscannen der Micro Array Slides erfolgte mit dem Gene Pix 4000 A Scanner (Fa. Axon Instruments, Union City). Dieses Gerät basierte auf der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie und erzeugte zwei quantitative Fluoreszenzbilder unterschiedlicher Wellenlängen, die jeweils den Farbstoffen Cy-3 (Wellenlänge: 532 nm) und Cy-5 (Wellenlänge: 635 nm) entsprachen und zur weiteren Auswertung übereinander gelegt wurden.

Die weitere Datenanalyse erfolgte mit der Software Gene Pix Pro 6.0 (Fa. Axon Instruments, Union City). Dazu wurden im ersten Schritt das gescannte Bild den Spots zugeordnet. Grundlage dafür war ein idealisiertes Modell, welches von MAREN OLBRICH aus dem Institut für Biochemische Pflanzenpathologie, GSF, in Neuherberg zur Verfügung gestellt wurde. Bei der Segmentierung wurden die Pixel durch im Radius individuell manuell angepasste Kreise als Spot klassifiziert. Das Programm fügte jedem Spot alle relevanten Oligonukleotidinformationen hinzu, die zur weiteren Analyse benötigt wurden. Die normalisierten Werte wurden mit Hilfe des Statistikprogramms Acuity 4.0 (Fa. Molecular Devices, Ismaning) weiter ausgewertet.

Die Datenverarbeitung aller Untersuchungen erfolgte, wenn nicht anders angegeben, mit der Daten- und Graphiksoftware Excel (Fa. Microsoft Corp., Redmond) und Origin (Fa. OriginLab Corp., Northampton). Die durchgeführten Signifikanzprüfungen erfolgten mit dem

Statistikprogramm Statgraphics (Fa. Statpoint Inc., Herndon, Virginia). Dabei wurde eine einfache Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt mit anschließendem Multiple Range Test. Die ermittelten Irrtumswahrscheinlichkeiten wurden mit einem Wert von $p \leq 0,05$ als signifikant eingestuft.

3. Ergebnisse

3.1 Morphologische Veränderungen

Um *Trypodendron* befallene Buchen mit den gesund eingestuften Buchen zu vergleichen, wurden „Paarversuche“ durchgeführt. Das bedeutet, dass jeweils eine als krank eingestufte Buche mit einer direkt daneben stehenden als gesund eingestuften verglichen wurde. Hierdurch wurde der Einfluss weiträumiger Standortfaktoren minimiert. Zunächst wurden die anatomischen Veränderungen photographisch festgehalten und dokumentiert.

3.1.1 Veränderungen der Rinde

Als erste Auffälligkeit wurde eine stark zerklüftete Rinde (Abb. 3.1) beobachtet. Besonders an der Nordseite des Stammes war die sonst typisch glatte Buchenrinde durch eine grobe verborkte Rinde ersetzt worden. Die starke Verborkung war nicht nur auf die *Trypodendron* befallenen Stämme des Paarversuchs beschränkt. Allerdings trat *Trypodendron*befall nur bei Buchen mit verborkter Rinde auf (LANGENFELD-HEYSER et al. 2003).



Abb. 3.1: Rindenbeschaffenheit, links: gewöhnliche Buchenrinde aus einem Bestand ohne Schädigungen des FA Halberstadt, rechts: zerklüftete Rinde aus dem Bestand des FA Hochwald *Trypodendron* befallener Buchen.

3.1.2 Kontrollbuchen und ihre anatomischen Veränderungen im Vergleich zu beschädigten Buchen

Da sich die Kontrollpartner des Paarversuchs bezüglich der Rinde und Holzbeschaffenheit nicht als echte Kontrollen zum befallenen Partner erwiesen, wurden nicht befallene Buchen anderer Standorte (Kap. 2.1.1) und einzelne Buchen des Einschlagsversuches für anatomische Untersuchungen herangezogen und mit den befallenen Proben aus dem Paarversuch verglichen. Im Gegensatz zu den befallenen Proben konnte man bei den Kontrollbuchen aus Halberstadt eine glatte Rinde (Abb. 3.1) beobachten mit deutlichen Lenticellen. Dies stand im Gegensatz zu den befallenen Proben aus dem Paarversuch, bei dem das Vorhandensein von Lenticellen die Ausnahme darstellte. Es gab keine morphologisch sichtbaren Unterschiede zwischen der Nord- und Südseite der Stämme aus Halberstadt. Die Gesamtrindendicke war im Vergleich zu den befallenen Proben aus dem Paarversuch deutlich dünner. Die Gesamtphenoluntersuchungen werden im Kapitel 3.3 näher erläutert.

3.2 Überprüfung zweier Schadenshypothesen zum neuartigen Schadbild der Buche

Zur Diskussion möglicher Schadursachen des *Trypodendron*-Stehendbefalls standen abiotische Faktoren, wie extreme Frühfrostereignisse (HUART & RONDEUX 2003). Um die Hypothese zu überprüfen, sollten Frühfrostveränderungen an Buche festgestellt werden.

Zur Überprüfung dieser Hypothese sollte in Versuchen ein Frostereignis simuliert und dessen Auswirkungen anatomisch analysiert und mit den beobachteten Schadmerkmalen der *Trypodendron* befallenen Buchen des Paarversuches verglichen werden. Des Weiteren sollte in einem Versuch, bei dem Buchen mit Insektennadeln verletzt werden, Reaktionen von Rinde und Holz auf solche Verletzungen der Buchenrinde anatomisch analysiert werden. Zudem ist bekannt, dass Verletzungen den Phytohormonspiegel verändern (JUNGHANS et al. 2004).

3.2.1 Anatomische Auffälligkeiten nach Froststresssimulation

Nach einer kurzfristigen (6h) Frostbehandlung bei $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ an drei glattrindigen Buchenästen eines Kalkstandortes (Kap. 2.1.3) konnte auch ein Jahr später weder Rindenrisse noch Rindennekrosen festgestellt werden (Abb. 3.2 A/B). Die Rinde des frostgestressten Astes (Abb. 3.2 A) war dicker als die der Kontrolle.

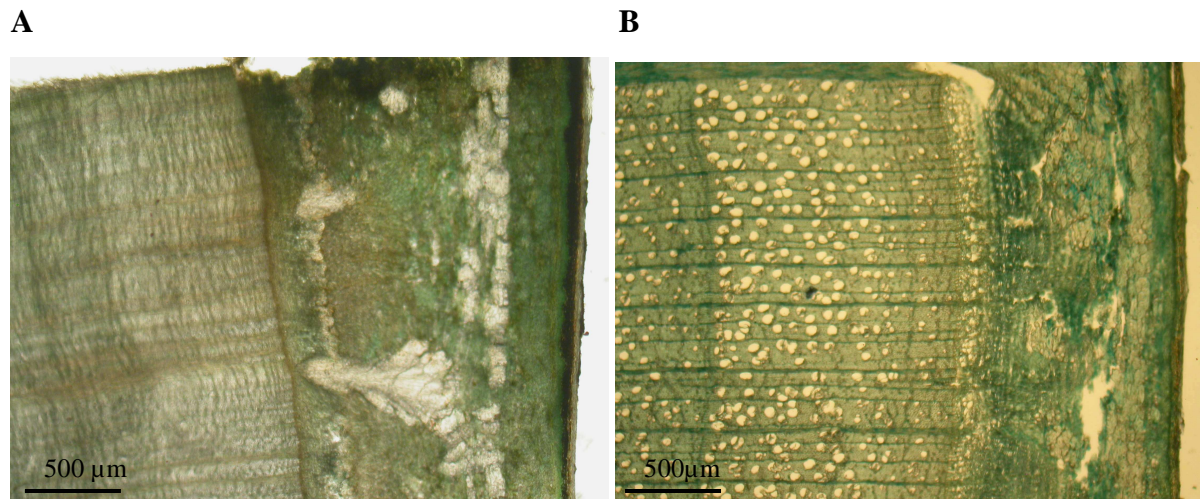


Abb. 3.2: Querschnittsübersicht der Rinde und des Holzes eines Buchenastes nach Frostbehandlung (Toluidinblau gefärbt). **A:** Frostbehandlung mit verbräuntem Kambium und verbräunten Strahlen. Am Rande des leitenden Phloems befindet sich ein anomaler Sklerenchymring und eine Parenchymproliferation im nicht leitenden sekundärem Phloem. **B:** Kontrolle mit einer Reihe großlumiger Siebröhren im Bereich des Kambiums.

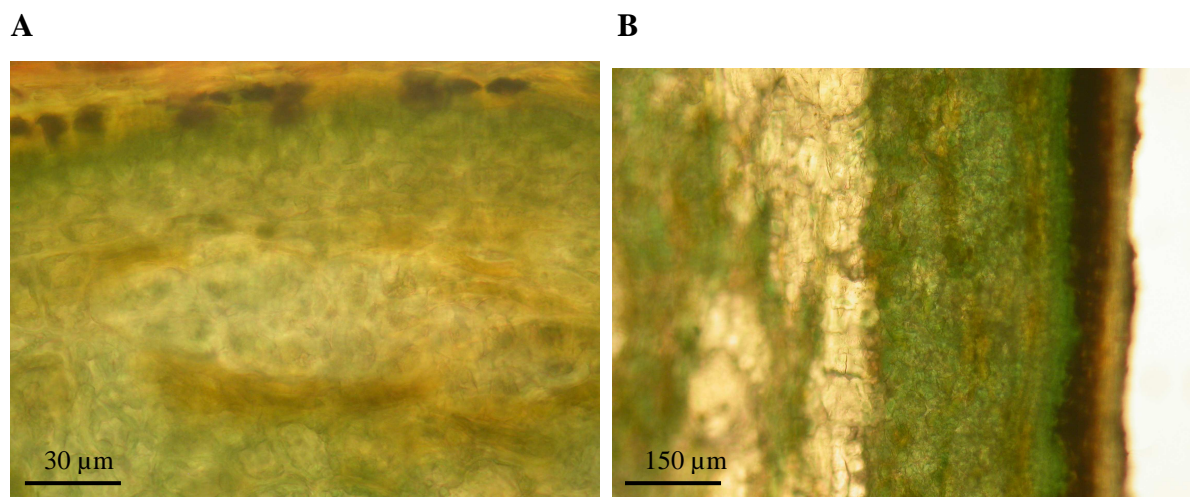


Abb. 3.3: Querschnitt aus der Region der primären Rinde eines Buchenastes nach Frostbehandlung (Toluidinblau gefärbt). **A:** Kältegestresster Buchenast mit verbräunten Zellen in der primären Rinde. **B:** Sklerenchymband an der Grenze von primärer Rinde und sekundärem Phloem eines Buchenastes nach Frostbehandlung und verbräunte Zellen in der primären Rinde.

Die primäre Rinde des frostgestressten Astes zeigte parallel zur Rindenoberfläche verlaufende Ketten verbräunter Zellen (Abb. 3.3 A/B), die ein Zeichen für Gerbstoffeinlagerungen sein könnten. Im Cortex waren außerdem Zellgruppen mit verdickten Zellwänden entstanden (Abb. 3.3 B), die zudem eine deutliche Anreicherung von Polyphenolen in den Zellwänden zeigten (Abb. 3.4).

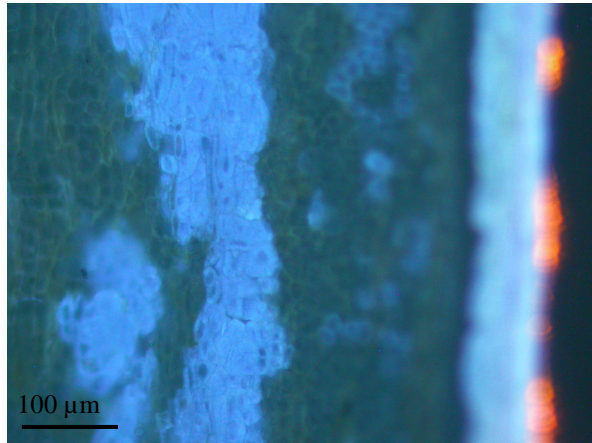


Abb. 3.4: Ausschnitt aus Abb. 3.3 B unter dem Fluoreszenzmikroskop. Polyphenolhervorhebung. Der Sklerenchymring zeigt eine starke Autofluoreszenz, ebenso wie die Wände der dickwandigen Zellen der primären Rinde und das Phellem.

Außerhalb der Strahlen waren verdickte Zellwände mit Polyphenol-Einlagerung zu erkennen (Abb. 3.5 A/B).

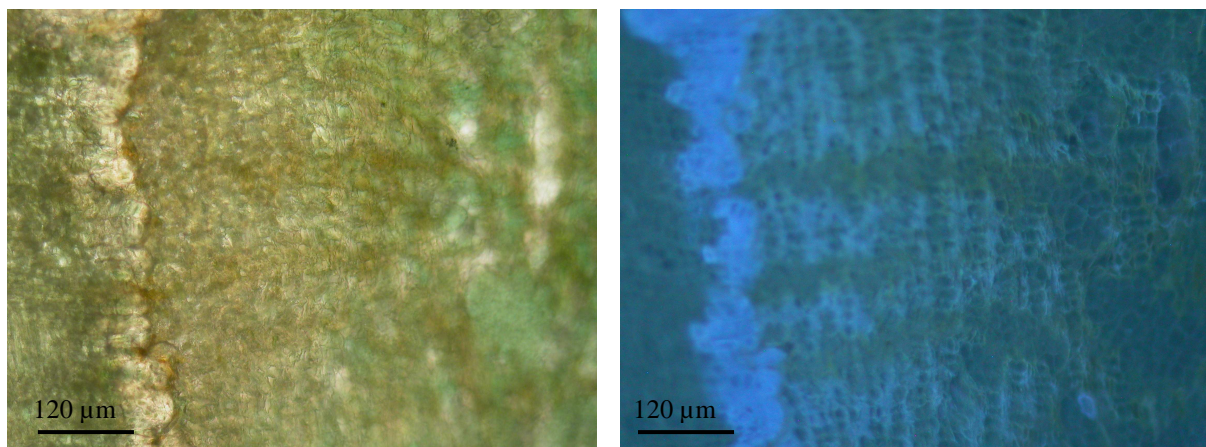


Abb. 3.5: Querschnitt aus der Region des sekundären Phloems mit anomalem Sklerenchymring an der Grenze von nicht leitendem zu leitendem sekundären Phloem eines Buchenastes nach Frostbehandlung. **A:** Toluidinblau gefärbter Querschnitt. **B:** Autofluoreszenz der Polyphenole. Neben dem anomalen Band von Sklerenchymzellen mit starker Polyphenolautofluoreszenz an der inneren Grenze des sekundären Phloems kann man im nicht leitenden Phloem außerhalb der Strahlen verdickte Zellwände mit erhöhtem Polyphenolgehalt erkennen.

Des Weiteren war an der inneren Grenze des nicht leitenden sekundären Phloems ein anomales Band von Sklerenchymzellen mit deutlichem Polyphenolgehalt in den Zellwänden entstanden (Abb. 3.5 A/B).

Das Kambium zeigte Verbräunungen (Abb. 3.2 A). Nach Frosteinwirkung gab das Kambium nach außen weitgehend parenchymatische Zellen ab (Abb. 3.7 A), die im älteren Teil schwache Konzentrationen von Polyphenolen in den Zellwänden zeigten (Abb. 3.7 B).

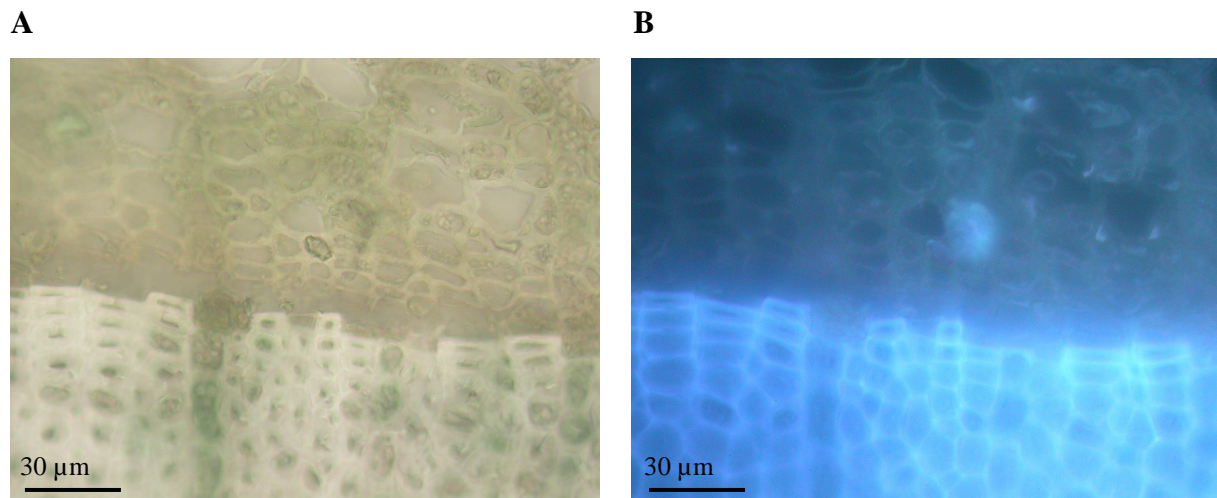


Abb. 3.6: Querschnitt der Region aus dem jüngsten sekundären Phloem, Kambium und jüngsten sekundären Xylem an der Peripherie der Frostbehandlung. **A:** Toluidinblau gefärbter Querschnitt. Kambium und Strahlen zeigen Verbräunungen. Das jüngste Phloem ist weitgehend parenchymatisch. **B:** Autofluoreszenz der Polyphenole. Es zeigt einen schwachen Polyphenolgehalt in den Zellwänden.

Am Rande des Frostreizes (Abb. 3.6 A) zeigte das leitende Phloem wieder einen ähnlichen Bau wie die Kontrolle (Abb. 3.6 B), mit weitleumigen Siebröhren und geringem Parenchymanteil ohne Gerbstoffe.

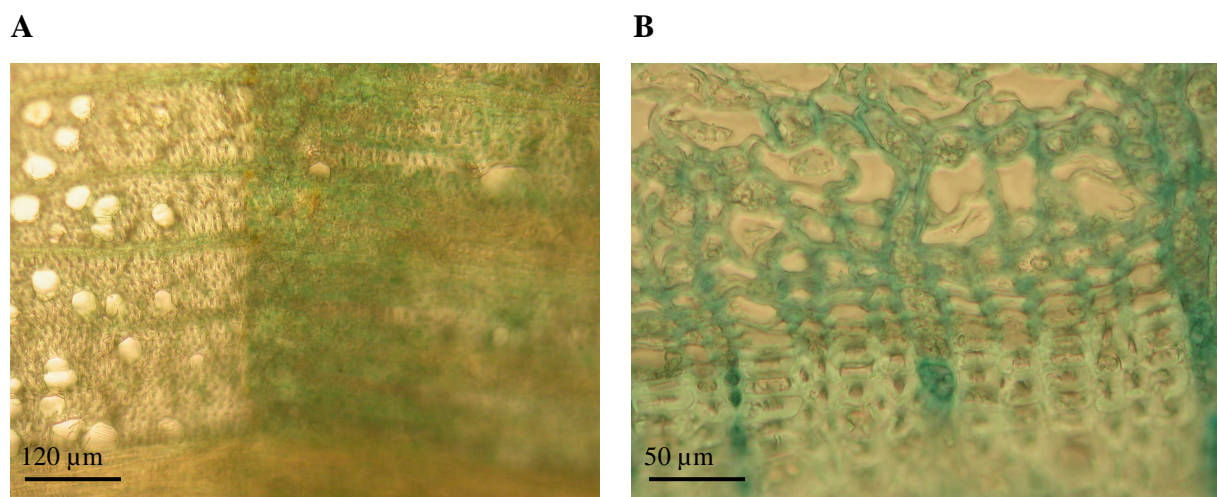


Abb. 3.7: Querschnitt aus der Region des jüngsten sekundären Phloems, Kambiums und jüngsten sekundären Xylems im Bereich der Frostbehandlung (Toluidinblau gefärbt). **A:** Das jüngste Phloem gleicht im Bau einer Kontrolle. Die Strahlen zeigen noch leichte Verbräunungen. **B:** Kontrolle. Das Strahlparenchym zeigt Verbräunungen durch Gerbstoffe.

Im Laufe der Vegetationsperiode normalisierte sich der Aufbau des jüngsten Xylems (Abb. 3.8 A und B). Das Holz des Vorjahres zeigte eine sehr starke Einlagerung von Polyphenolen. Bis weit ins ältere Holz hinein zeigten die Strahlen Verbräunungen durch Gerbstoffe (Abb. 3.2 A und 3.9).

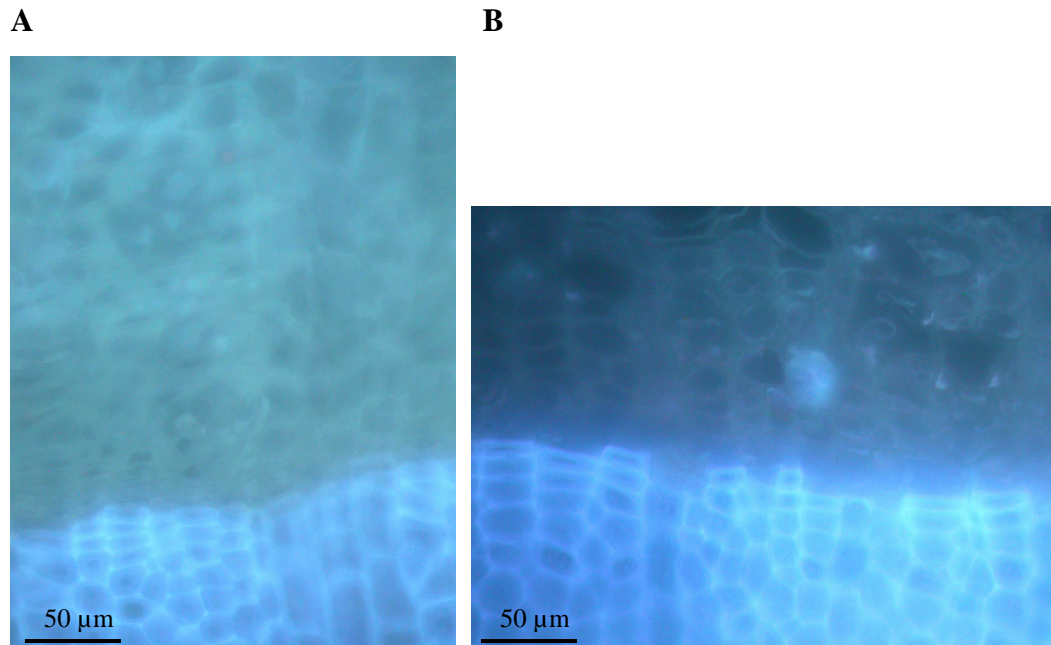


Abb. 3.8: Autofluoreszenz der Polyphenole in den Zellen eines Querschnitts der Region aus dem jüngsten sekundären Phloem, Kambium und jüngsten sekundären Xylem **A:** Querschnitt aus dem Zentrum der Frostbehandlung. Aufbau des jüngsten Xylems. **B:** Querschnittsauschnitt aus der Peripherie der Frostbehandlung. Das jüngste Xylem gleicht im Bau im wesentlichen einer Kontrolle.

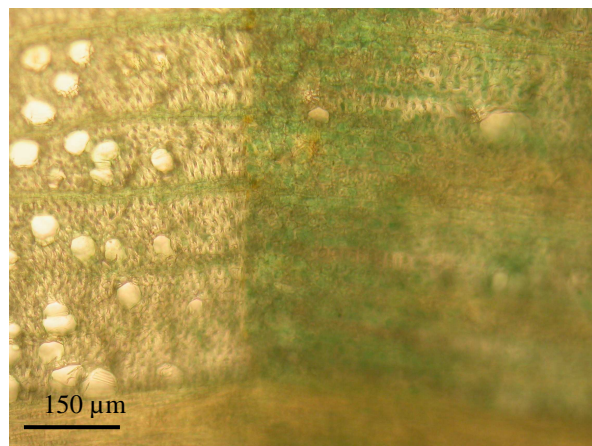


Abb. 3.9: Ausschnitt aus dem Beginn des jüngsten sekundären Xylems im Querschnitt mit Übergang zum Spätholz des Vorjahres (links im Bild). Toluidinblau gefärbt. Das nach Frosteinwirkung im Spätherbst gebildete sekundäre Xylem zeigt ein breites Band parenchymatischer Zellen mit wenigen kleinlumigen Gefäßen. Die Wände von Fasern und Gefäßen des letztjährigen Xylems zeigen im Spätholz eine verstärkte Einlagerung von Polyphenolen.

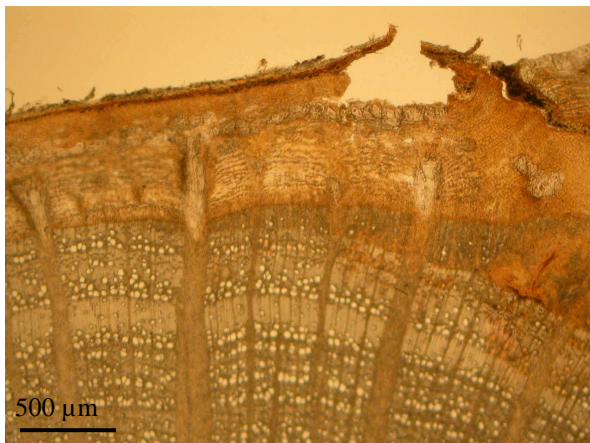
3.2.2 Anatomische Auffälligkeiten nach Stichverletzungen

Um Verletzungen, die die Buchenwollschildlaus in der Buchenrinde verursacht, zu simulieren und die Veränderungen aufzuzeigen, wurden drei glattrindige Buchen mit einer Insektennadel verletzt (Kap. 2.1.4). Die Insektennadeln hinterließen im Periderm deutliche Löcher (Abb. 3.10 und Abb. 3.11 B).



Abb. 3.10 : ungefärbter Querschnitt von Rinde und Holz eines Buchenastes mit Stichverletzungen. Deutliche Löcher sind zu erkennen. Eine T-förmige braune Zone ist im jüngsten Holz im Einstichszentrum der Insektennadel zu sehen.

A



B

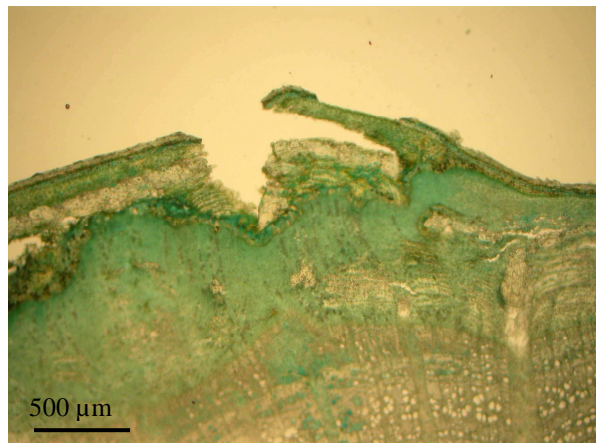


Abb. 3.11: Querschnitt von Rinde und Holz einer Buchenastes mit Stichverletzungen. **A:** Eine T-förmige braune Zone ist im jüngsten Holz im Einstichszentrum zu sehen. Links davon sieht man eine keilförmige Zone im jüngsten Holz, in der die Wundwirkung des Nadelstiches mit Entfernung von der Einstichsstelle geringer wird (ungefärbt). **B:** Toluidinblau gefärbter Querschnitt im peripherern Bereich des Nadeleinstichs. Deutlich grün gefärbt ist das proliferierte Parenchym der Rinde, das parenchymatische Zentrum im jüngsten Holz und der verthyllte Bereich im Holz des Vorjahres.

Ein Wundperiderm mit seitlichem Kontakt zum Oberflächenperiderm wurde eingezogen, um das Rindeninnere gegen die Außenluft abzuschotten (Abb. 3.10 und Abb. 3.11 B). Dadurch wurde im Einstichbereich sekundäres Phloem nach außen abgespalten. Das Wundperiderm (Abb. 3.12 A) zeigte Polyphenole in den Zellwänden (Abb. 3.12 B).

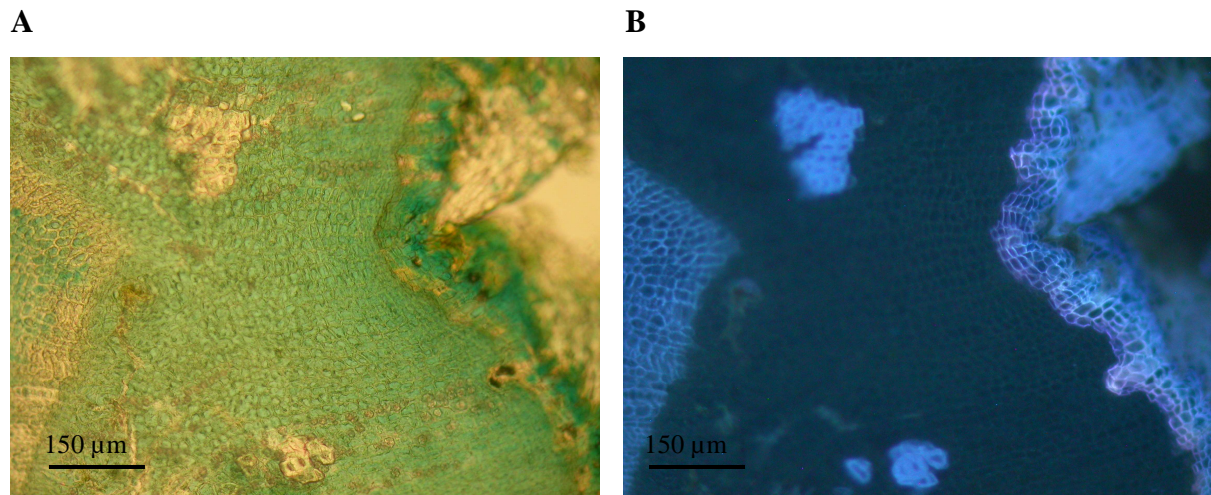


Abb. 3.12: Querschnitt der nahen Peripherie eines Nadeleinstichs eines Buchenastes nach Stichverletzung. **A:** Toluidinblau gefärbter Querschnitt. Rechts: V-förmige Einbuchtung der äußeren Rinde, die durch ein polyphenolhaltiges Wundperiderm gegen die Innenrinde abgeschottet ist. Mittig: proliferiertes Parenchym. Links: V-förmiges nach außen gerichtetes Kambium als breiteres beige-farbenes Band. In der Nähe des Einstichzentrums wird xylemseits vom Kambium Parenchym gebildet (grüne Anfärbung des Zellinhaltes) **B:** Autofluoreszenz der Polyphenole. Die Zellwände zeigen Polyphenole.

Vom Wundperiderm nach innen gelegen befand sich proliferiertes parenchymatisches Gewebe (Abb. 3.12 A), das vom Kambium nach außen abgegeben sein könnte, woran aber auch proliferierte Parenchymzellen des sekundären Phloems beteiligt sein könnten. Im Zentrum des Einstichs war die Parenchymproliferation dicker als an seinem Rand (Abb. 3.11 A). Das leitende Phloem bestand im Zentrum des Einstichs hauptsächlich aus Parenchym mit wenigen kleinlumigen Siebröhren (Abb. 3.13).

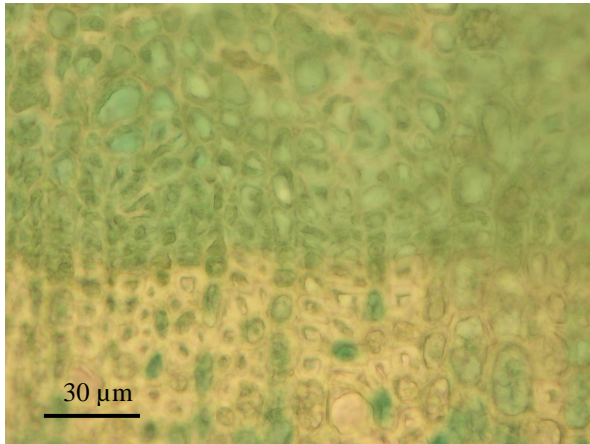
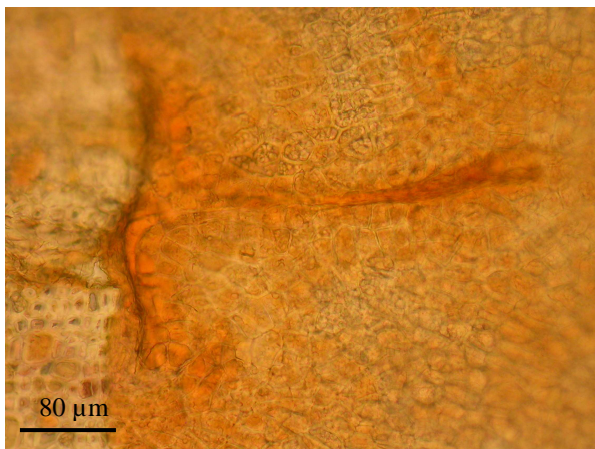


Abb. 3.13: Toluidinblau gefärbter Querschnitt von der Grenze des letztjährigen Xylems zum jüngsten Phloem im Zentrum des Einstichbereichs mit kleinlumigen Siebröhren.

Der in Abb. 3.14 gezeigte Stichkanal ging bis in das im Mai 2005 bereits angelegte jüngste Xylem. In diesem Bereich füllte sich der Stichkanal mit relativ großen Parenchymzellen. Im reifen Holz wurde der Stichkanal durch proliferierenden Kallus aus Holzstrahlen angefüllt. Abb. 3.14 A und B zeigen, dass der Insektennadelstich noch im jüngsten Xylem sichtbar bleibt und eine T-förmige Verbräunung entstand.

A



B

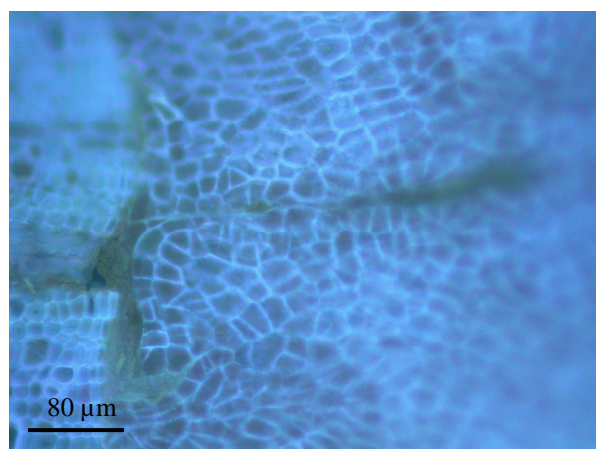


Abb. 3.14: Querschnitt eines Buchenastes aus der Region des Überganges von Spät- und Frühholz. **A:** Phloroglucin gefärbter Querschnitt mit T-förmiger Struktur im Zentrum der Stichverletzung, im nach dem Einstich gebildeten Xylem. Das jüngste Xylem besteht aus isodiametrischen Zellen rings um den Einstichkanal **B:** Autofluoreszenz der Polyphenole. Die isodiametrischen Zellen lagern Polyphenole in die Zellwände ein.

Das verletzte Kambium bildete proliferiertes Parenchym rings um den überwallenden Einstich (Abb. 3.15 A). Das vom Kambium nach innen abgegebene Parenchym zeigte Gerbstoffe in den Zellwänden (Abb. 3.15 B).

Im Xylem des Jahres 2004 und im bis Mai 2005 gebildeten neuen Xylem wurden im Einstichbereich Verthyllungen (Abb. 3.15 A) beobachtet und auch eine verstärkte Einlagerung von Gerbstoffen in den Zellwänden, besonders der Gefäße (Abb. 3.15 B).

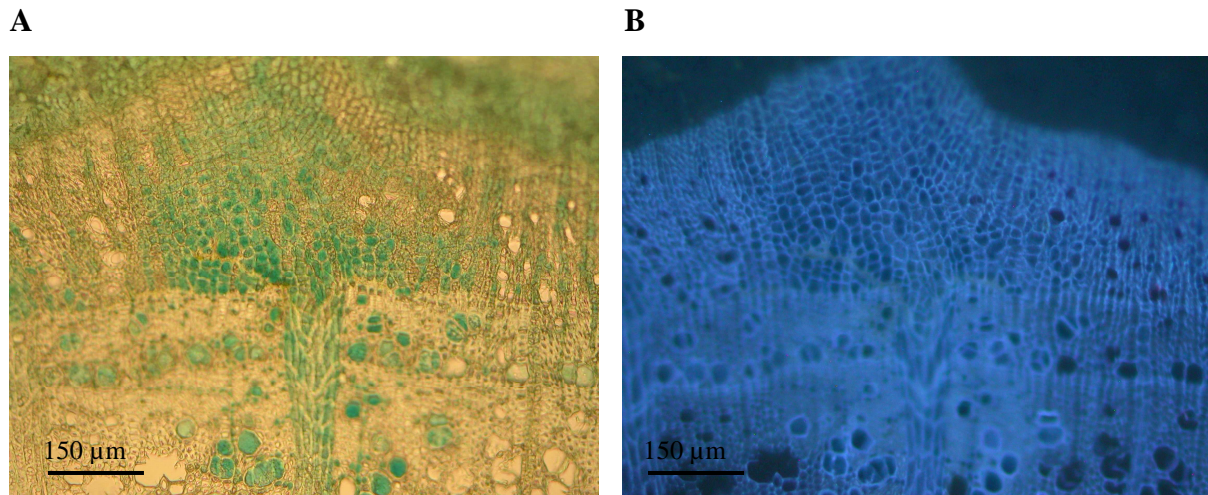


Abb. 3.15: Querschnitt des jüngsten und letztjährigen Xylems nahe des Zentrums der Stichverletzung. **A:** Toluidinblau gefärbter Querschnitt mit proliferiertem Parenchym rings um den überwallenden Einstich und Verthyllungen im Einstichsbereich. **B:** Autofluoreszenz der Polyphenole.

3.3 Variationen im Gesamtphenolgehalt geschädigter und gesunder Buchen

Sowohl in der Rinde als auch im Holz wurden Einlagerungen von Gerbstoffen in Phloemparenchymzellen und in Zellen von Strahlproliferationen beobachtet. Das führte zu der Überlegung, den Gesamtphenolgehalt von Rinden und Holz zu analysieren (Kap. 2.4.1), da diese Verbindungen auch als Indikatoren für Befallssituationen herangezogen werden. Ihre Konzentration ändert sich in Abhängigkeit von standortbedingten Einflüssen.

3.3.1 Variationen im Gesamtphenolgehalt der Rinde

Vergleicht man die Gesamtgehalte der löslichen phenolischen Verbindungen in der Rinde des Paarversuchs, so fällt ein schwankendes Muster auf (Abb. 3.16). Die absoluten Werte waren von Paar zu Paar unterschiedlich und lagen in einem Bereich von 33 bis 59 mg/g TG (Mittelwert: 46 mg/g TG, Tab. 3.1).

Auf den ersten Blick erschien der Eindruck, dass Rinden der befallenen Bäume höhere Gesamtphenolgehalte an phenolischen Inhaltsstoffen enthalten als die nicht befallenen. Neun von zwölf Baumpaaren besaßen höhere Gehalte an löslichen phenolischen Inhaltsstoffen in den befallenen Rindenproben als in den Kontrollpartnern. Ein besonders hoher Gehalt im Vergleich zum nicht befallenen Partner zeigten die Paare 163/167, 10/9, 219/221 und 52/44.

Auch bei den zellwandgebundenen phenolischen Verbindungen (Abb. 3.17) zeigten sieben von zehn Baumpaaren in der Rinde höhere Gehalte in den befallenen Proben als in den nicht befallenen. Zwei Paare (10/9 und 18/VB) zeigten einen höheren Gehalt zellwandgebundener phenolischer Inhaltsstoffe in den nicht befallenen Proben und bei einem Paar (156/155) waren gleich hohe Gehalte von 33 mg/g TG in der befallenen Probe und in der nicht befallenen Probe vorzufinden. Auch hier differierten die absoluten Einzelwerte und lagen in einem Bereich von 14 bis 37 mg/g TG. Im Vergleich zum Mittelwert (Tabelle 3.1) der befallenen Proben von 25 mg/g TG mit dem der nicht befallenen Partner von 24 mg/g TG erschien eine Veränderung des Gehaltes an zellwandgebundenen phenolischen Inhaltsstoffen in der Rinde durch einen Befall mit *Trypodendron* nicht so deutlich, wie bei den Gehalten an löslichen phenolischen Inhaltsstoffen. Es wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt (Tab. 3.1).

Vergleicht man die Gehalte der zellwandgebundenen phenolischen Verbindungen aus der Rinde (Abb. 3.17) mit dem prozentualen Anteil lebender Rinde zu abgestorbener Rinde (Abb. 3.18), so zeigte sich eine Korrelation zwischen dem Anteil an Borke und der Gehalte der phenolischen Verbindungen. Bei einem hohen Gehalt an zellwandgebundenen phenolischen Inhaltsstoffen wurde ein hoher prozentualer Anteil an abgestorbener Rinde verzeichnet. Ein niedriger prozentualer Anteil abgestorbener Rinde zeigte auch einen niedrigen Gehalt an zellwandgebundenen phenolischen Inhaltsstoffen: die Tendenz stimmte überein.

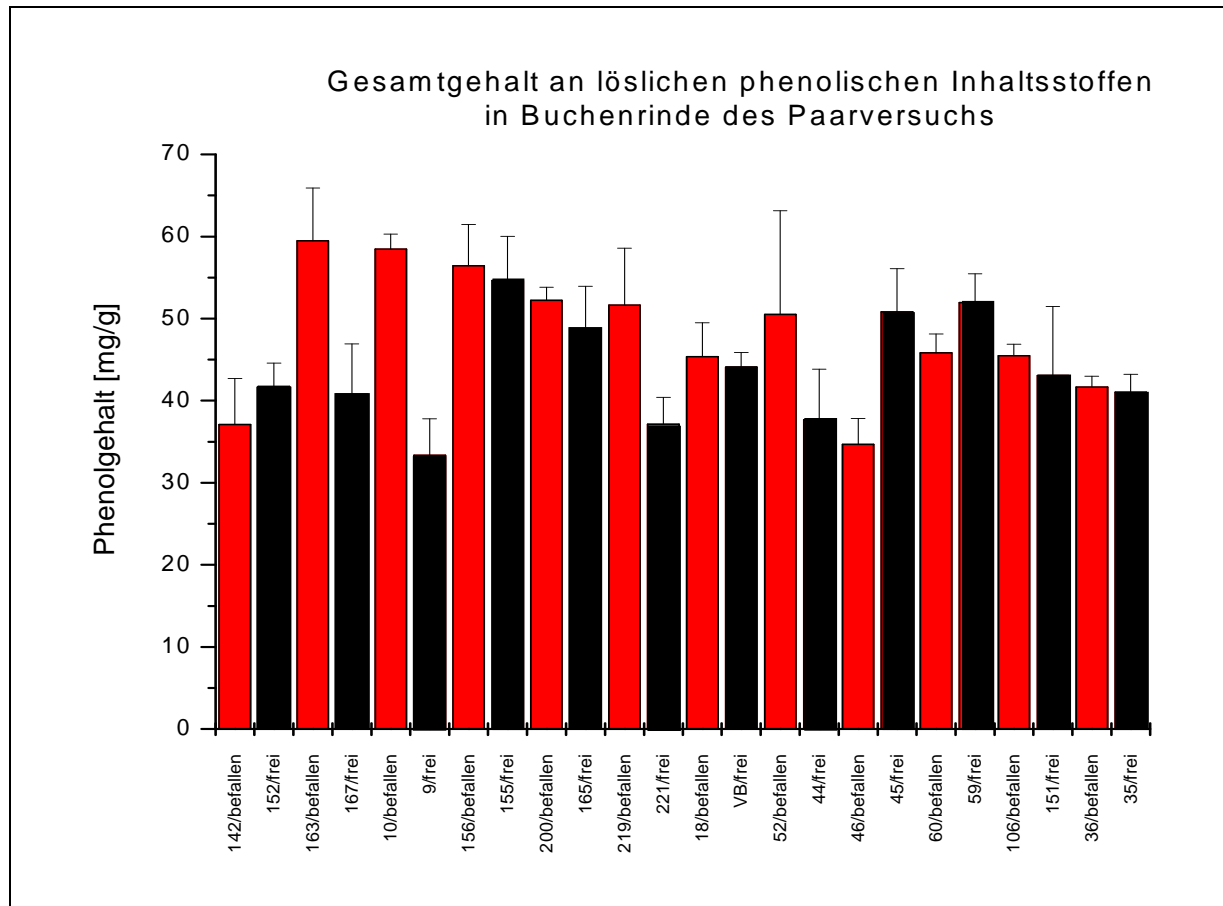


Abb. 3.16: Gesamtgehalte an löslichen phenolischen Inhaltsstoffen aus Rindenproben des Paarversuchs. Rot: *Trypodendron* befallene Buchen, schwarz: nicht befallen eingestufte Buchen.

Tab. 3.1: Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzprüfungen (Irrtumswahrscheinlichkeiten, $p \leq 0,05 = \text{signikant}$).

		Mittelwert	SD +/-	p (Irrtumswahrscheinlichkeit)
lösl. Phenolgehalte	Paarversuch (Rinde)	45,988	2,494	0,101
	Paarversuch (Holz)	103,244	0,982	0,242
	geschädigte Proben (Rinde)	32,032	2,432	0,336
	Kontrollen (Rinde)	30,152	2,675	
	Jahresverlauf (Rinde)	50,649	0,786	
	Jahresverlauf (Holz)	5,711	0,411	
zellwandgeb. Phenolgehalte	Paarversuch (Rinde)	25,425	3,837	0,337
	Paarversuch (Holz)	56,914	2,747	0,197
	geschädigte Proben (Rinde)	115,570	8,396	0,021
	Kontrollen (Rinde)	123,396	1,676	
	Jahresverlauf (Rinde)	13,107	0,581	
	Jahresverlauf (Holz)	12,850	1,879	

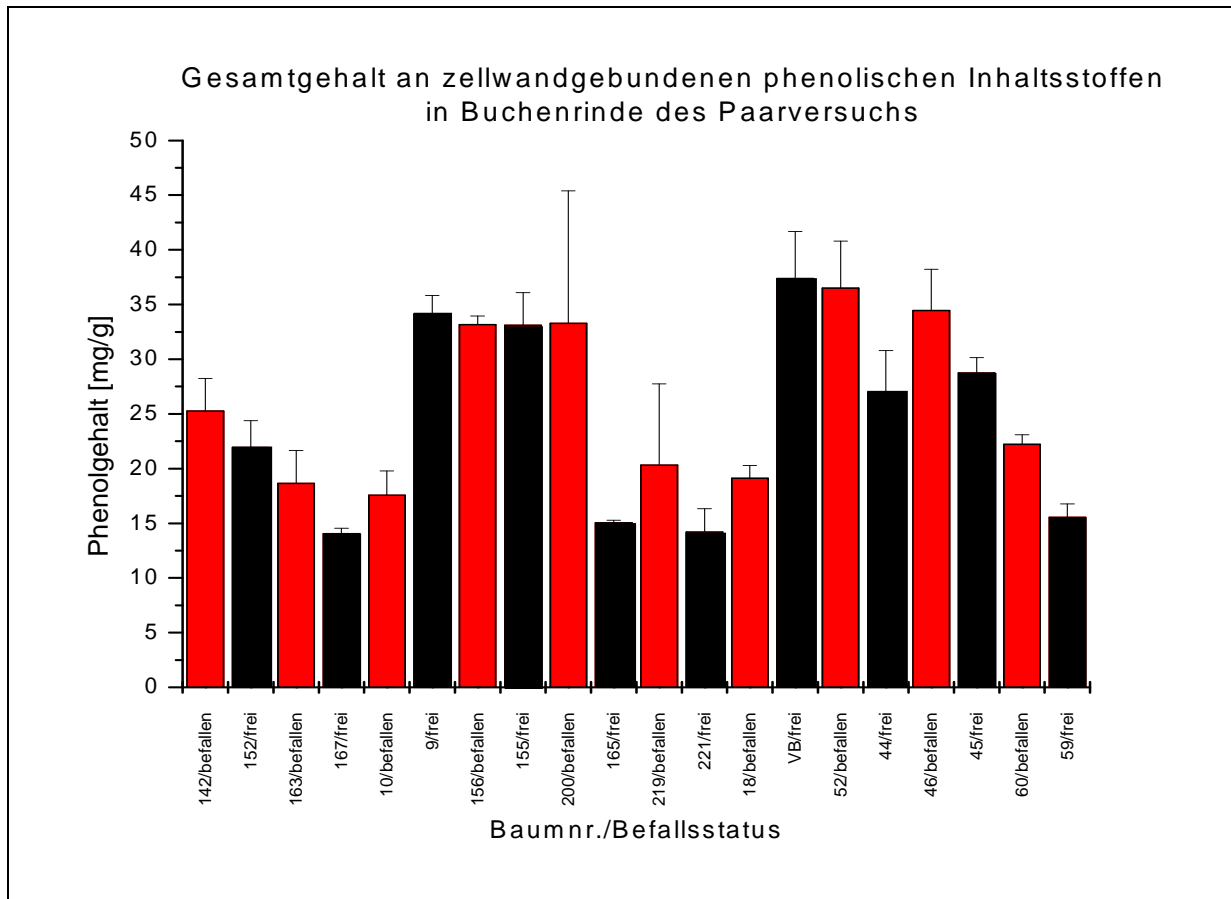


Abb. 3.17: Gesamtgehalte an zellwandgebundenen phenolischen Inhaltsstoffen aus Rindenproben des Paarversuchs. Rot: *Trypodendron* befallene Buchen, schwarz: nicht befallen eingestufte Buchen.

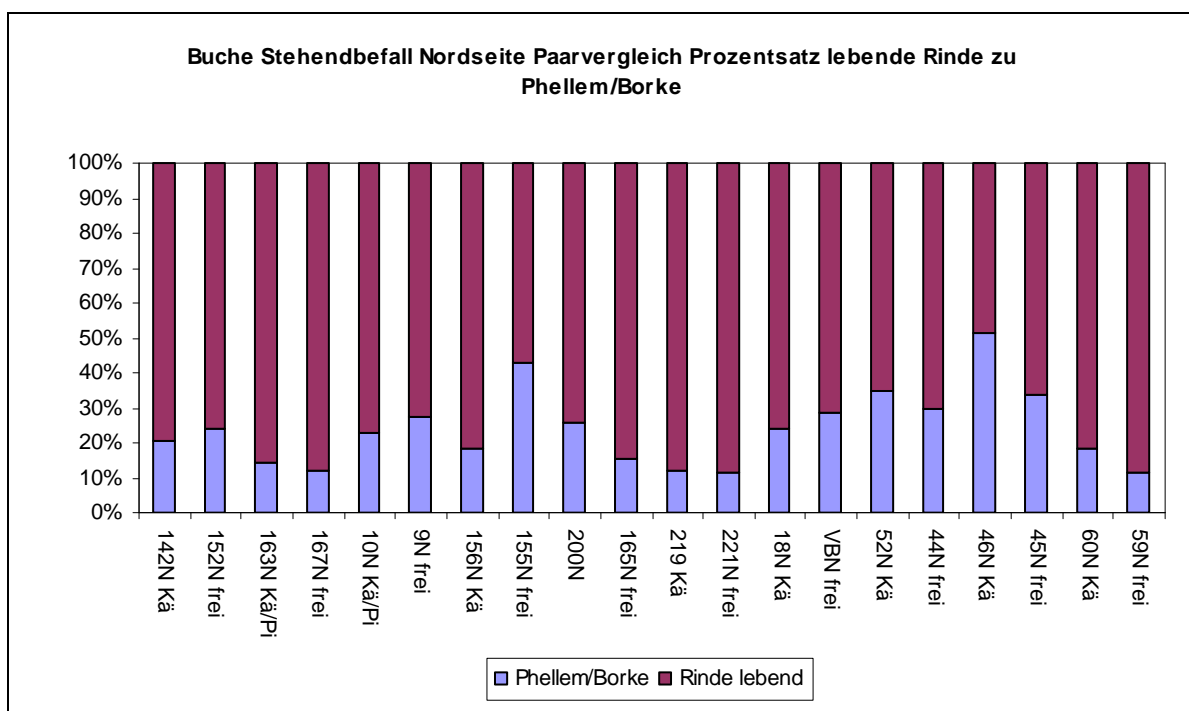


Abb. 3.18: Anteil lebender Rinde zu abgestorbener Rinde (Phellem/Borke). Blau: prozentualer Anteil der abgestorbenen Rinde, violett: prozentualer Anteil der lebenden Rinde.

In Abb. 3.19 sind die Gehalte der löslichen phenolischen Verbindungen weiterer Einzelproben mit unterschiedlichen Schädigungen dargestellt. Die Gehalte der Proben mit den anomal dunklen Flecken im Holz und die mit dem Käferbefall zeigten Werte von 32 mg/g TG löslicher Phenole. Die Buche aus Reinhausen mit den dunklen Flecken wies den höchsten Gehalt an löslichen phenolischen Inhaltsstoffen auf mit 61 mg/g TG. Der geringste Gehalt zeigte die Probe mit Pilzbefall. Vergleicht man die Werte der Gehalte der löslichen mit den zellwandgebundenen phenolischen Inhaltsstoffen (Abb. 3.20), so zeigte sich ein gegensätzliches Bild: die höchsten Gehalte waren bei der Pilzbefallprobe anzutreffen und die niedrigsten Gehalte der zellwandgebundenen phenolischen Inhaltsstoffe zeigten sich bei den Proben, die die höchsten Gehalte an löslichen phenolischen Verbindungen besaßen.

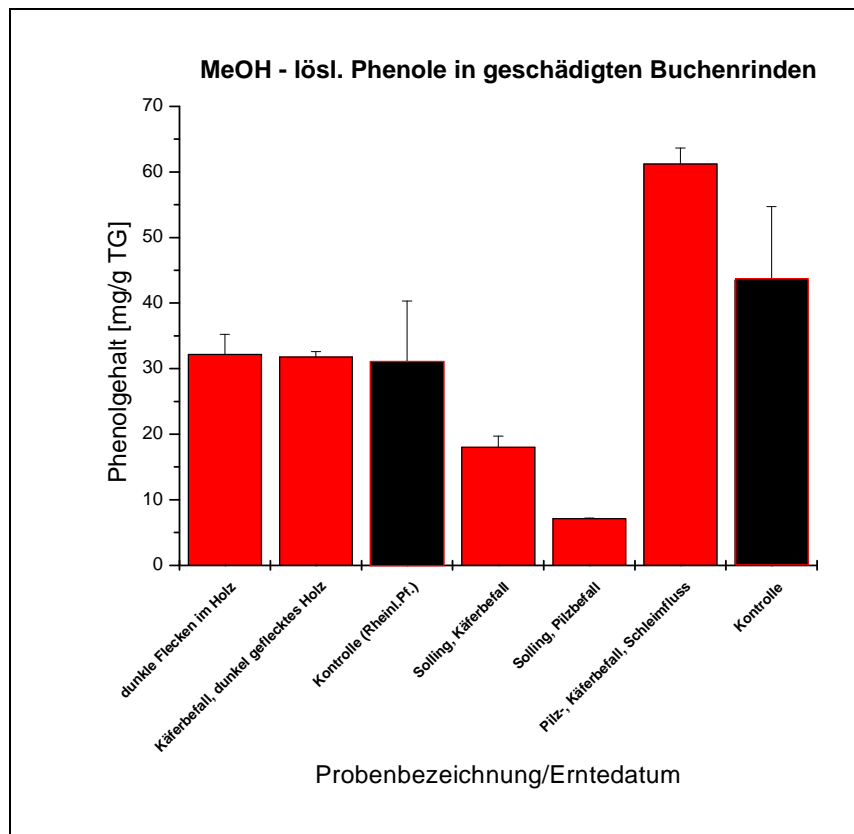


Abb. 3.19: Gesamtgehalte löslicher phenolischer Inhaltsstoffe geschädigter Rindenproben. Rot: geschädigte Proben, schwarz: als Referenz Kontrollproben (n =3).

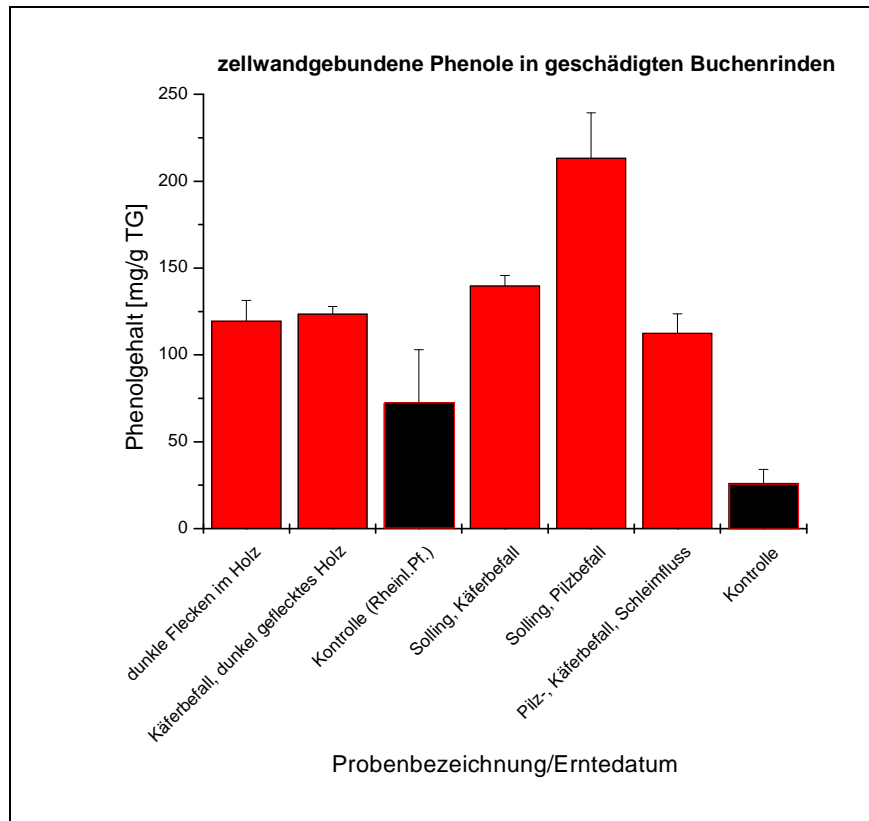


Abb. 3.20: Gesamtgehalte zellwandgebundener phenolischer Inhaltsstoffe geschädigter Rindenproben. Rot: geschädigte Proben, schwarz: als Referenz Kontrollproben.

Wie auch schon bei den anatomischen Analysen wurde auch hier weiteres gesundes Vergleichsmaterial herangezogen. Insgesamt sind Werte aus drei unterschiedlichen Standorten zusammengeführt worden (Kap. 2.1.1). Abbildung 3.21 zeigt, dass die Gehalte der löslichen phenolischen Inhaltsstoffe aus den Kontrollproben aus Halberstadt die niedrigsten Konzentrationen von Mittelwerten von 18 bis 28 mg/g TG aller Kontrollproben zeigte. Die Proben aus Reinhausen zeigten Mittelwerte von 27 bis 37 mg/g TG an Gehalten löslicher phenolischer Verbindungen und lagen damit immer noch deutlich unter den Werten der Kontrollbuchen aus dem Paarversuch. Dort schwankten die Konzentrationen in einem Bereich von 33 bis 55 mg/g TG. Die Einzelwerte der einzelnen Kontrollen aus Halberstadt und Reinhausen schwankten nicht so stark, wie die Einzelproben der Kontrollen aus dem Paarversuch.

Die Konzentrationen zellwandgebundener phenolischer Inhaltsstoffe (Abb. 3.22) zeigten starke Schwankungen zwischen den einzelnen Proben in Halberstadt und Reinhausen. Die höchsten Konzentrationen an zellwandgebundenen phenolischen Verbindungen konnte in Halberstadt beobachtet werden. Dort lagen die Werte in einem Bereich von 120 bis 275 mg/g TG. Vergleicht man diese Gehalte mit denen der Kontrollproben aus dem Paarversuch, so fallen die deutlich niedrigen Werte in einem Bereich von 14 bis 37 mg/g TG auf (vgl. Abb.

3.17). Die Proben aus Reinhausen lagen in einem Bereich von 48 bis 138 mg/g TG. Sowohl die Gehalte der zellwandgebundenen phenolischen Verbindungen aus Reinhausen, als auch die aus Halberstadt, lagen weitaus über den Konzentrationen zellwandgebundener phenolischer Inhaltsstoffe befallener Proben aus dem Paarversuch (Abb. 3.17).

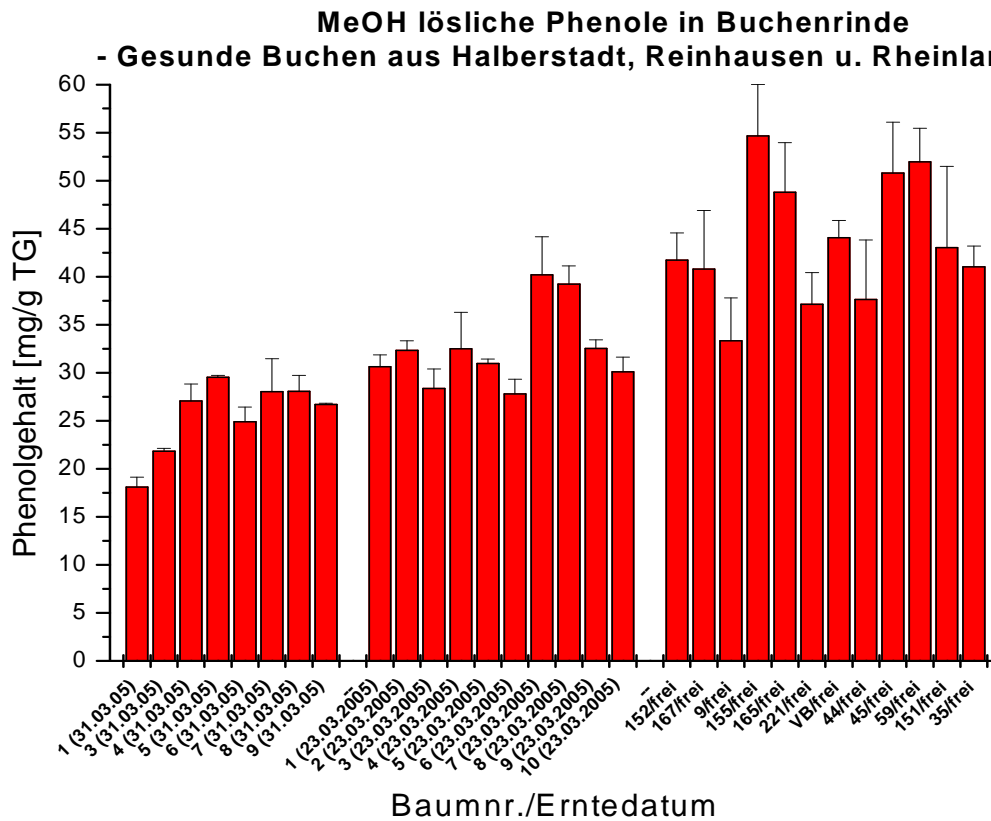


Abb. 3.21: Gesamtgehalte löslicher phenolischer Verbindungen aus Rindenproben ohne Schädigungen aus drei verschiedenen Standorten. Die ersten Proben sind aus Halberstadt, die darauffolgenden 10 Proben aus Reinhausen (beides Kalkstandorte) und die letzten 12 Proben entstammen aus dem Paarversuch (Gegenstück ohne sichtbare Schädigungen).

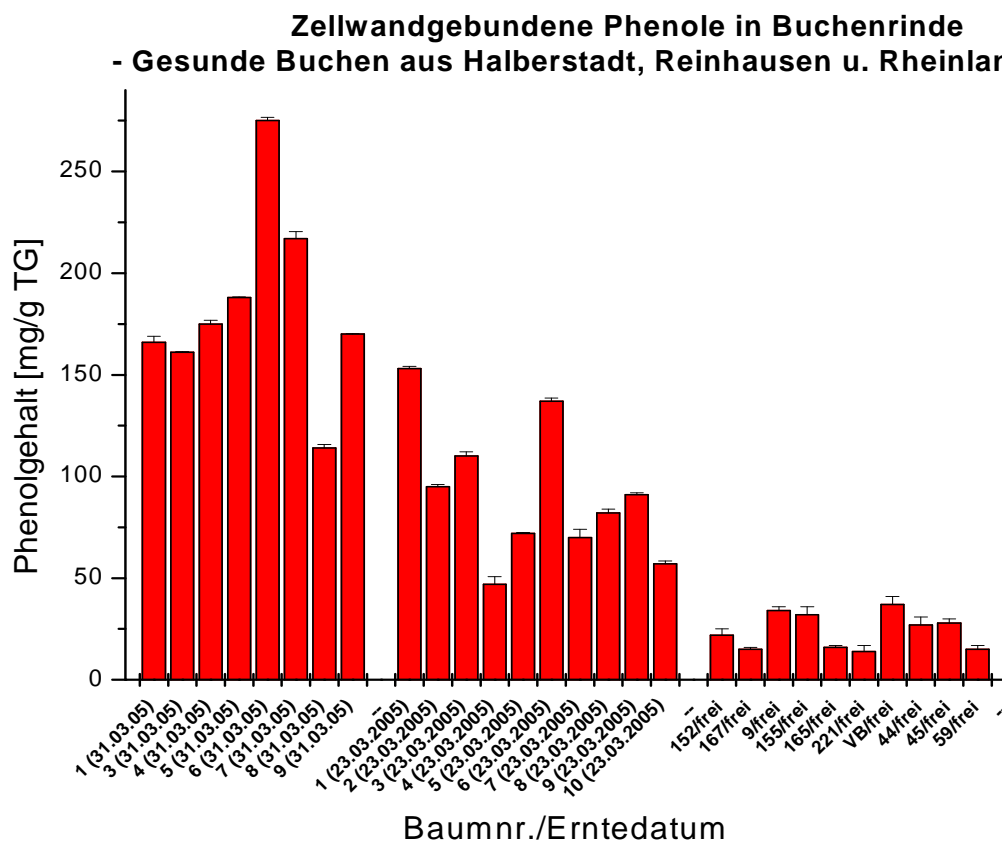


Abb. 3.22: Gesamtgehalte zellwandgebundener phenolischer Verbindungen aus Rindenproben ohne Schädigungen aus drei verschiedenen Standorten. Die ersten Proben sind aus Halberstadt, die darauffolgenden 10 Proben aus Reinhausen (beides Kalkstandorte) und die letzten 12 Proben entstammen aus dem Paarversuch (Gegenstück ohne sichtbare Schädigungen).

3.3.2 Jahreszeitliche phenolische Gehaltsanalysen in Buchenrinde

Neben den Analysen der geschädigten Buchenrindenproben wurden jahreszeitliche Gehaltsanalysen durchgeführt (Kap. 2.1.2) um herauszufinden, wie sich die Gesamtphenolgehalte an löslichen und zellwandgebundenen phenolischen Inhaltsstoffen im Jahresverlauf verhalten. Die ermittelten Werte sollten dann mit den Gesamtphenolgehalten des Paarversuches verglichen werden und eventuelle Unterschiede aufgezeigt werden. Die Proben des Paarversuchs wurden im Juli geerntet und konnten mit den entsprechenden Monatswerten aus den Jahresverlauf-Analysen verglichen werden. In der Rinde zeigten sich nur geringe Unterschiede in den Gehalten löslicher und zellwandgebundener phenolischer Verbindungen (Abb. 3.23 und Abb. 3.24). Wie auch schon bei der Auswertung des Paarversuchs zeigten die Gehalte der löslichen Verbindungen (Mittelwert aller Werte im Jahresverlauf) höhere Werte

als die der zellwandgebundenen Verbindungen (Mittelwert aller Werte im Jahresverlauf). Nimmt man den Wert der Baumnr. 20 (Mai) aus der Wertung heraus, so war lediglich im August eine leichte Depression der Phenolgehalte sowohl bei den löslichen als auch bei den zellwandgebundenen Verbindungen zu beobachten. Dort konnte man einen Gehalt von nur 41 mg/g TG an löslichen und einen Gehalt von 9 mg/g TG an zellwandgebundenen phenolischen Inhaltsstoffen beobachten.

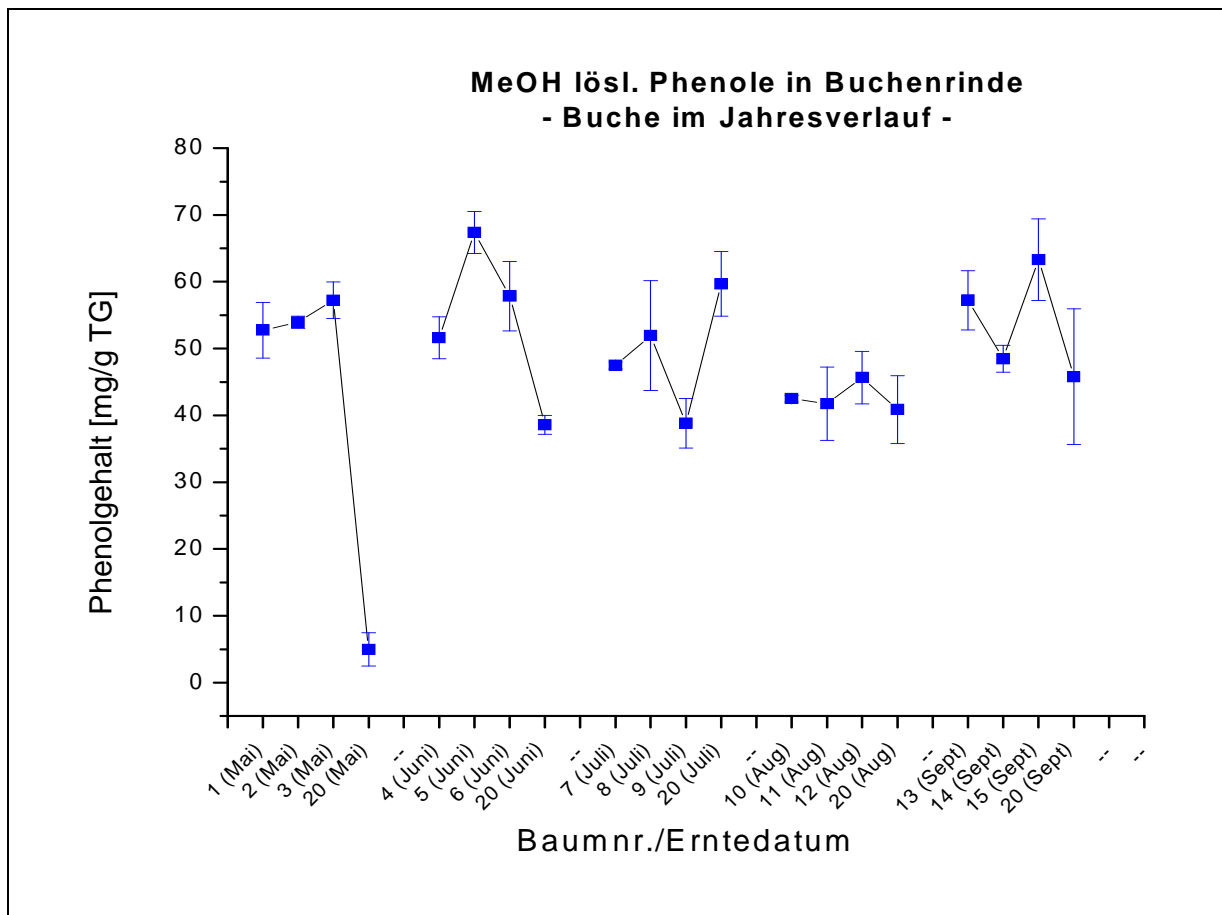


Abb. 3.23: Jahreszeitliche Variationen im Gesamtgehalt löslicher phenolischer Inhaltsstoffe in der Rinde gesunder Buchen. Probennahme war von Mai (1. Probe) bis September (letzte Probe). Die Baumbezeichnungen entsprechen den Zahlen 1 bis 15 (Einzelproben) und 20 (Dauerprobe).

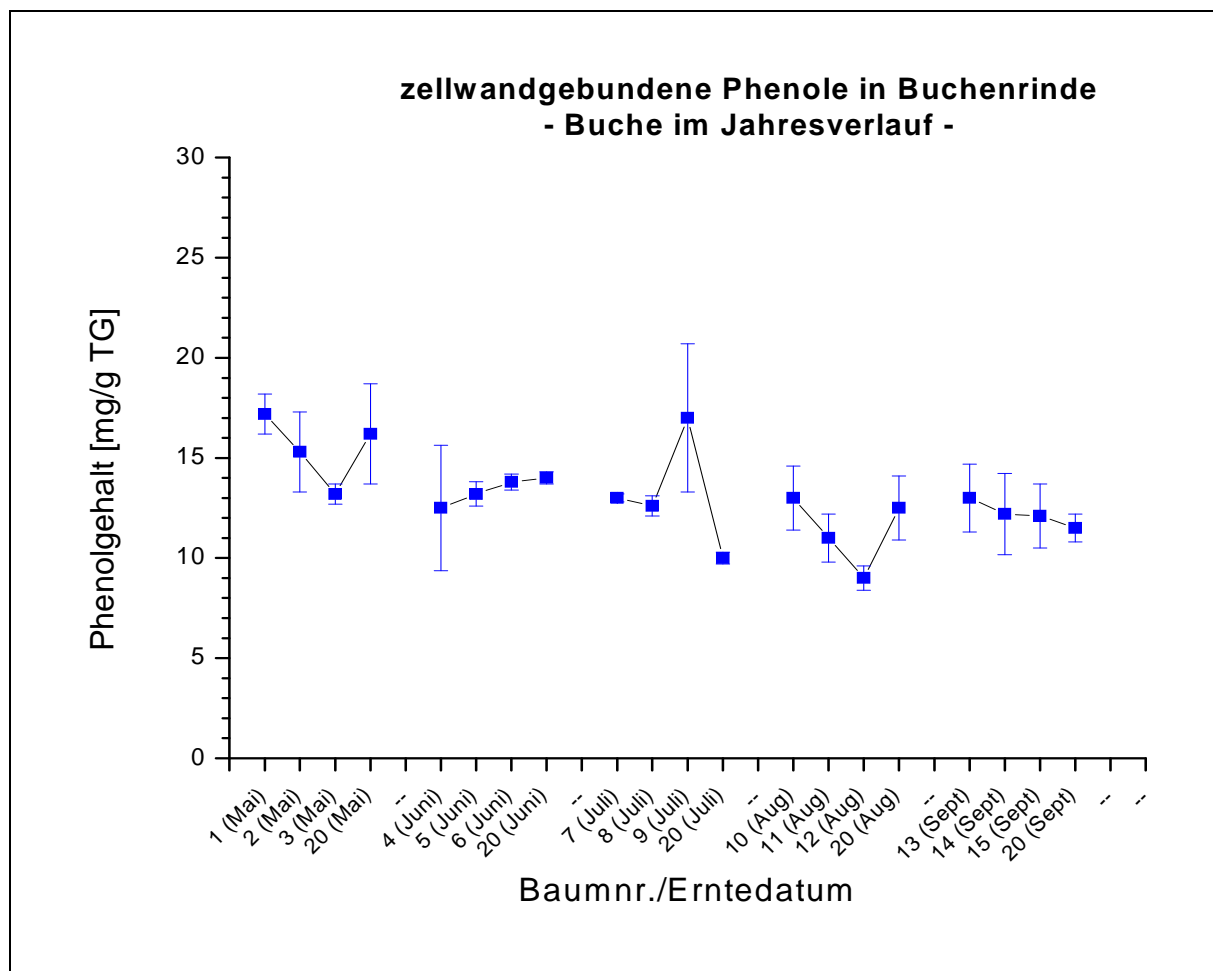


Abb. 3.24: Jahreszeitliche Variationen im Gesamtgehalt zellwandgebundener phenolischer Inhaltsstoffe in der Rinde gesunder Buchen. Probenahme war von Mai (1. Probe) bis September (letzte Probe). Die Baumbezeichnungen entsprechen den Zahlen 1 bis 15 (Einzelproben) und 20 (Dauerprobe).

3.3.3 Variationen im Gesamtphenolgehalt des Holzes

Neben der Rinde, die eine Eintrittspforte für Schaderreger darstellt und erwartungsgemäß die ersten Abwehrreaktionen zeigt, wurden auch Veränderungen im Gehalt an löslichen und zellwandgebundenen phenolischen Inhaltsstoffen im Holz analysiert. Wie zuvor die anatomischen Analysen zeigten, gab es Veränderungen im Holz, die auch Gerbstoffeinlagerungen mit sich zogen. Abbildung 3.25 zeigt die löslichen phenolischen Inhaltsstoffkonzentrationen in gesunden und befallenen Buchen des Paarversuchs im Holz. Auch hier ist wieder ein schwankendes Muster zu erkennen. Die absoluten Werte schwankten in einem Bereich von 50 bis 215 mg/g TG. Fünf von zehn Baumpaare zeigten deutlich erhöhte Gehalte an löslichen Phenolen in den befallenen Holzproben. Bei zwei Baumpaaren (10/9 und 200/165) zeigten die nicht befallenen Partner höhere Gehalte an löslichen Phenolen als die befallenen. Die Mittelwerte zeigten insgesamt bei den befallenen Proben etwas höhere

Gehalte als die nicht befallenen (Tabelle 3.1). Ähnlich verhielt es sich mit den Gehalten der zellwandgebundenen phenolischen Verbindungen (Abb. 3.26). Dort lagen die Gehalte in einem Bereich von 25 bis 110 mg/g TG und lagen damit wie bei den vorherigen Analysen unter denen der löslichen Phenolgehalte. Fünf Baumpaare zeigten erhöhte Gehalte an zellwandgebundenen phenolischen Inhaltsstoffen bei den befallenen Holzproben. Auch hier zeigten die Paare 10/9 und 200/165 höhere Konzentrationen zellwandgebundener phenolischer Inhaltsstoffe in den Holzproben der nicht befallenen Partner.

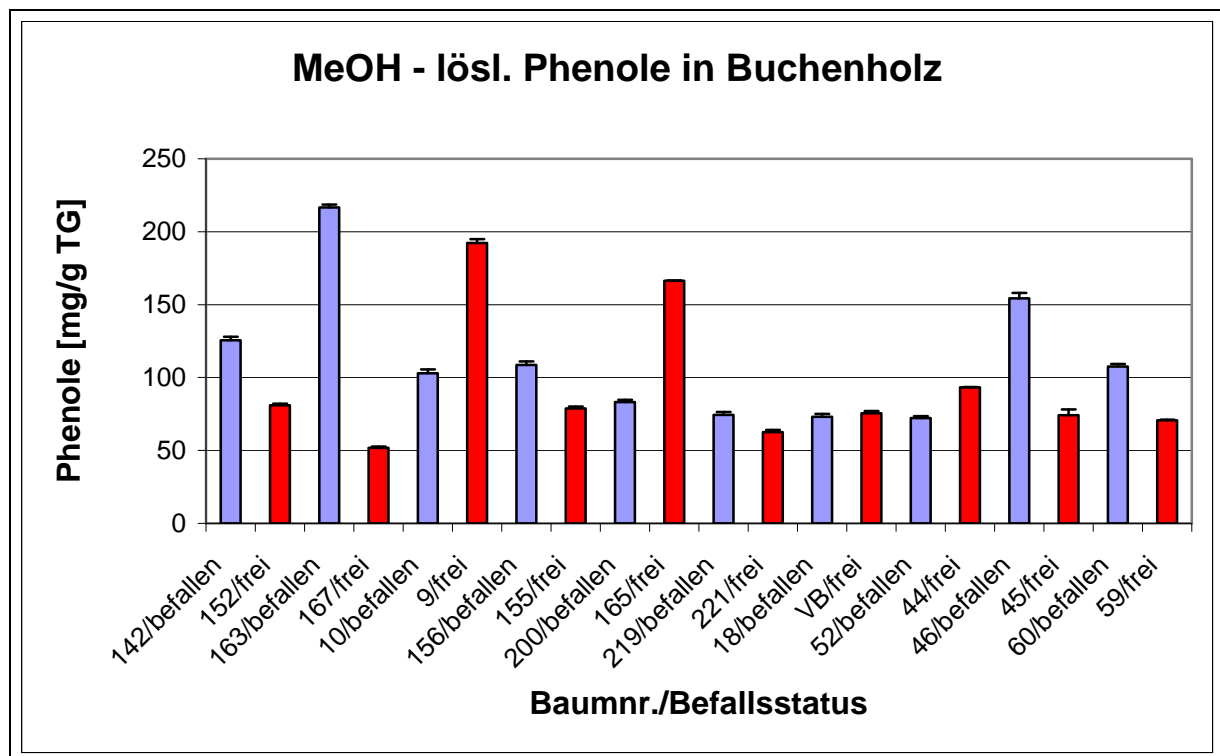


Abb. 3.25: Gesamtgehalte löslicher phenolischer Inhaltsstoffe in Holzproben aus dem Paarversuch. Blau: *Trypodendron* befallene Holzproben, rot: gesund eingestufte Holzproben.

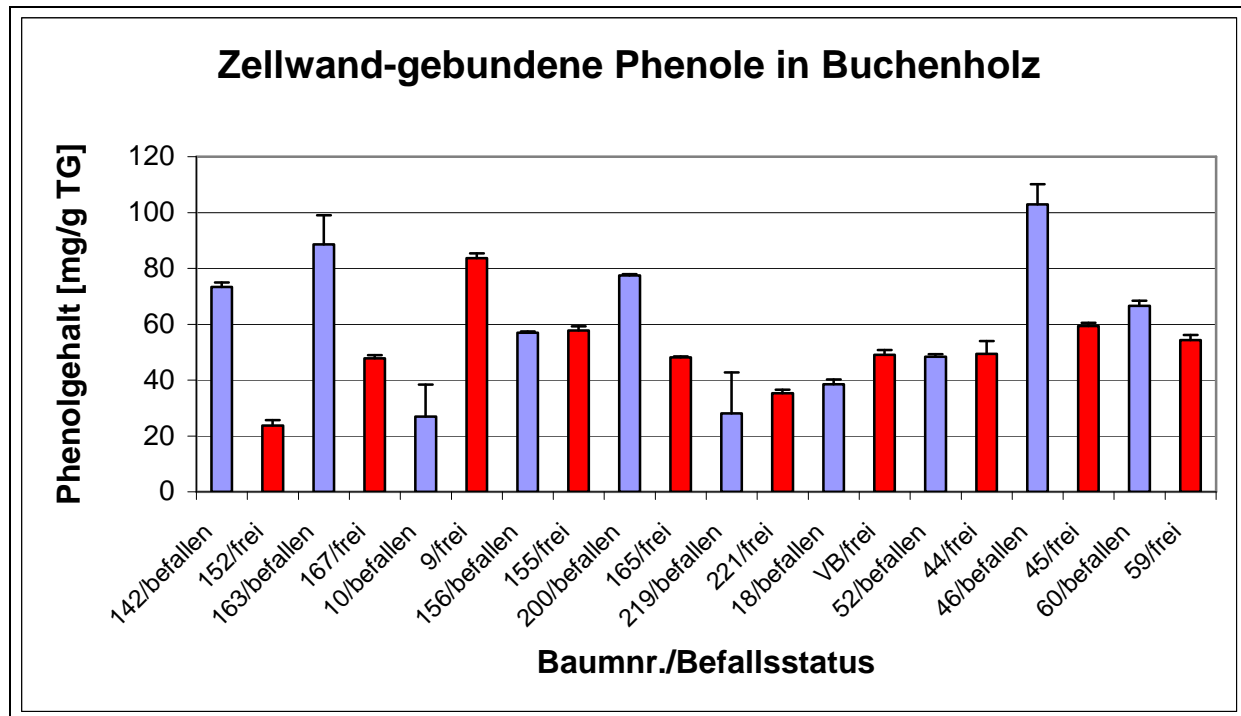


Abb. 3.26: Gesamtgehalte zellwandgebundener phenolischer Inhaltsstoffe in Holzproben aus dem Paarversuch. Blau: *Trypodendron* befallene Holzproben, rot: gesund eingestufte Holzproben.

3.3.4 Saisonale Fluktuation der phenolischen Inhaltsstoffe in Buchenholz

Zieht man die Gehalte der Holzproben des Jahresverlaufs (Abb. 3.27 und 3.28) hinzu, so fällt auf, dass die Gehalte der löslichen phenolischen Verbindungen der Buchen aus dem Jahresverlauf im Holz deutlich geringer ausfielen als die Gehalte im Holz des Paarversuches. Andererseits ist die Konzentration der zellwandgebundenen phenolischen Verbindungen auf dem gleichen Niveau wie die des Paarversuchs. Nimmt man den Wert des Baumes 5 aus der Wertung bleibt die Konzentration der löslichen Verbindungen im Holz im Jahr über auf dem Level von 4,6 mg/g TG konstant. Nicht wie in der Rinde, dort wurden niedrigere Gehalte im August beobachtet. Die Konzentration der zellwandgebundenen Phenole lag etwas schwankender bei einem Mittelwert von 13,1 mg/g TG. Die Mai-Werte lagen über dem ermittelten Jahresdurchschnittswert und die August-Werte lagen leicht unter dem Jahresdurchschnittswert.

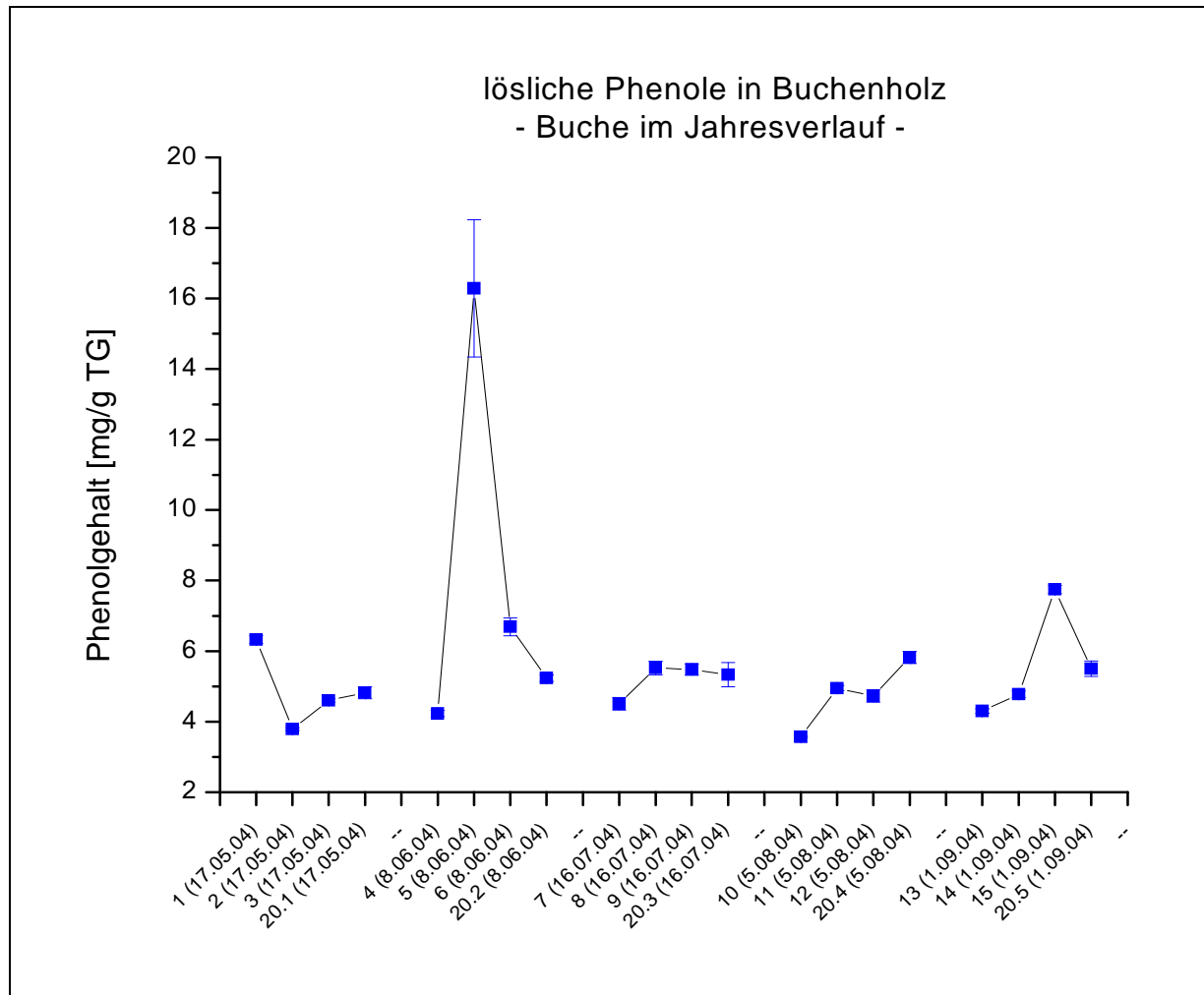


Abb. 3.27: Jahreszeitliche Variationen im Gesamtgehalt löslicher phenolischer Inhaltsstoffe im Holz gesunder Buchen. Probenahme war von Mai (1. Probe) bis September (letzte Probe). Die Baumbezeichnungen entsprechen den Zahlen 1 bis 15 (Einzelproben) und 20 (Dauerprobe).

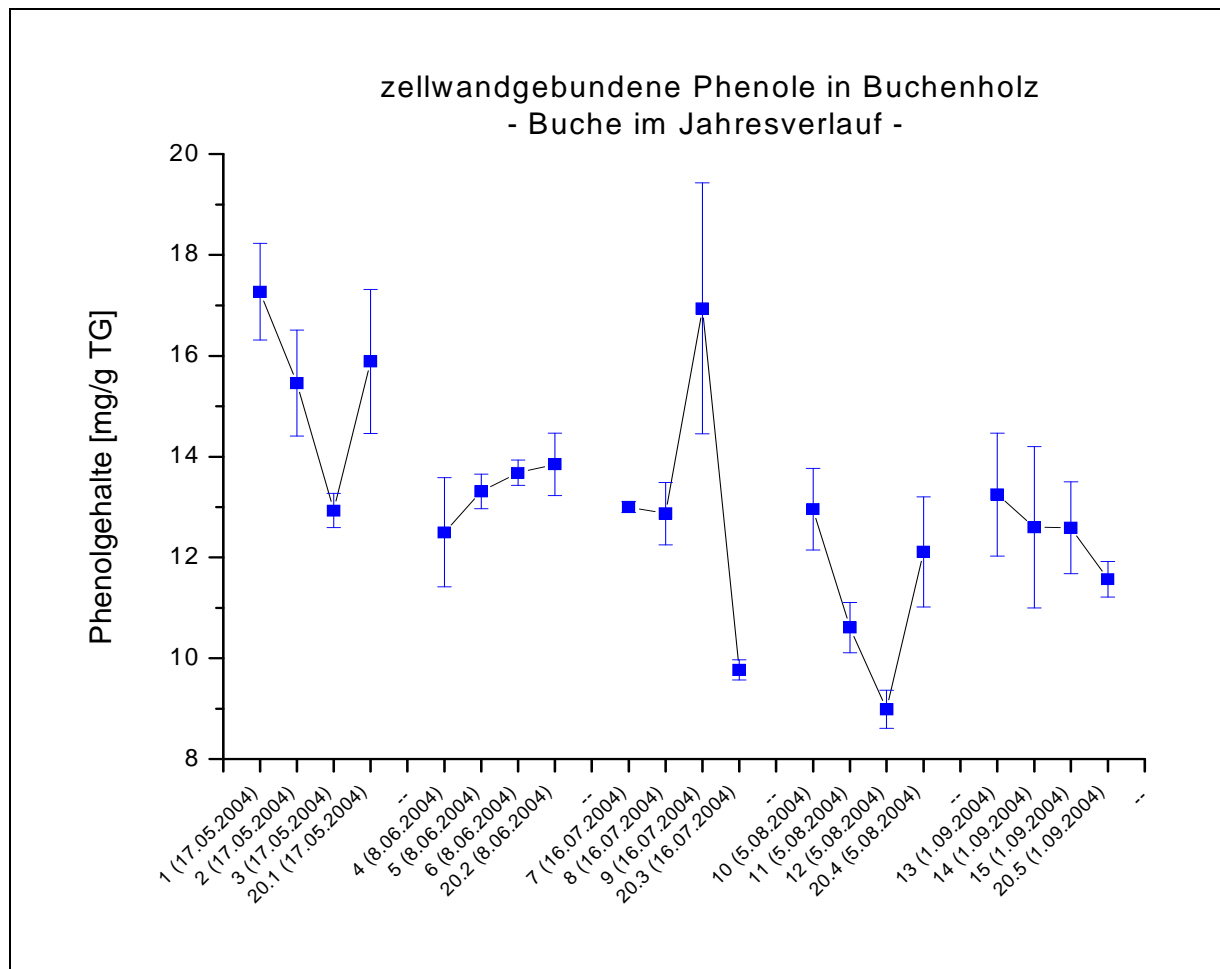


Abb. 3.28: Jahreszeitliche Variationen im Gesamtgehalt zellwandgebundener phenolischer Inhaltsstoffe im Holz gesunder Buchen. Probennahme war von Mai (1. Probe) bis September (letzte Probe). Die Baumbezeichnungen entsprechen den Zahlen 1 bis 15 (Einzelproben) und 20 (Dauerprobe).

3.4 Auftrennung der phenolischen Inhaltsstoffe an Rinde mittels HPLC

Mit den Extraktionsmethoden zur Analyse löslicher und zellwandgebundener phenolischer Verbindungen (Kap. 2.4.1) konnten nur Gesamtphenolgehalte erfasst werden. Um zu prüfen, ob spezielle phenolische Verbindungen mehr in den Geweben bei Befall vorzufinden sind, wurden Rindenextrakte chromatographisch aufgetrennt und sieben verschiedene phenolische Substanzen quantitativ bestimmt (Kap. 2.4.2). Auf diesem Weg sollte ein detaillierterer Einblick über die Verteilung der einzelnen Phenolsäuren erlangt werden. Befallene Proben wurden mit Material gesunder Buchen verglichen und die Unterschiede der phenolischen Zusammensetzung aufgezeigt, um die Rolle des Sekundärmetabolismus für das Pathogenabwehrverhalten der Buche besser zu verstehen. Um die phenolischen Inhaltsstoffe in Rindenproben zu quantifizieren, wurden die Absorptionsspektren der HPLC-Analysen ausgewertet. Abbildung 3.29 B zeigt ein Spektrum der löslichen Phenole in der Rinde einer

geschädigten Buche im Vergleich zu einer Referenzprobe (Abb. 3.29 A). Die Abbildungen 3.30 A und B zeigen das entsprechende Chromatogramm zur Bestimmung von (+)-Catechin und (-)-Epicatechin im Vergleich zur Referenzprobe.

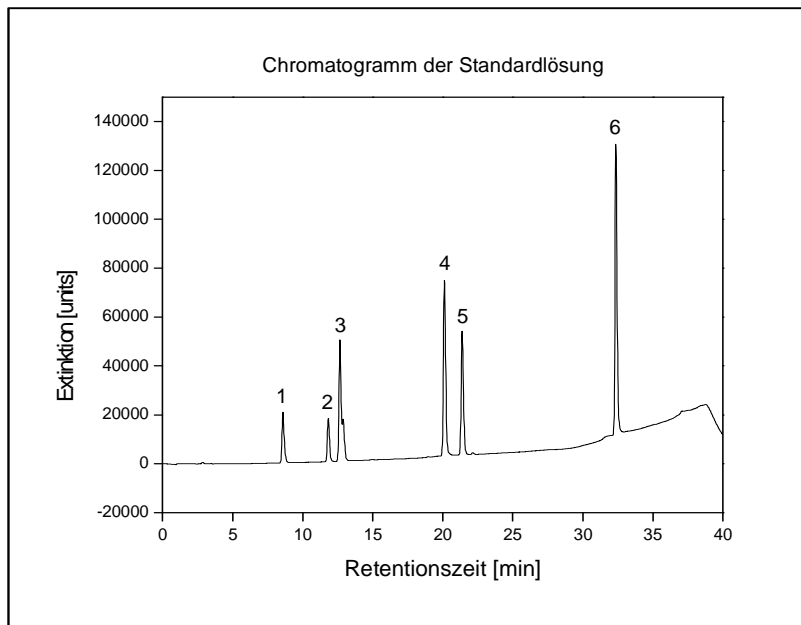
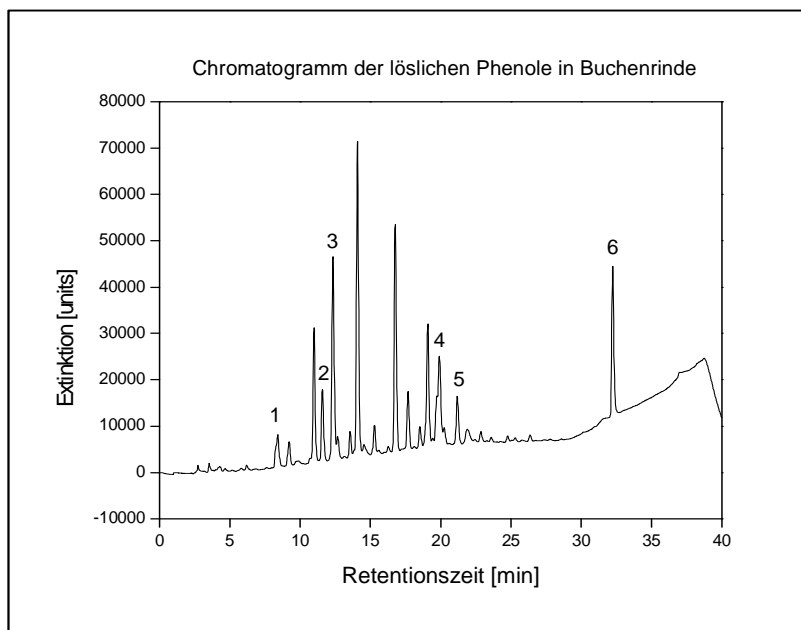
**A****B**

Abb. 3.29: HPLC-Profil der phenolischen Inhaltsstoffe einer Referenzmischung und eines Extraktes, der aus der Rinde geschädigten Buchen gewonnen wurde. 1 = 3,4-Dihydroxybenzoesäure, 2 = Catechin, 3 = Chlorogensäure, 4 = Cumarsäure, 5 = Ferulasäure, 6 = Zimtsäure.

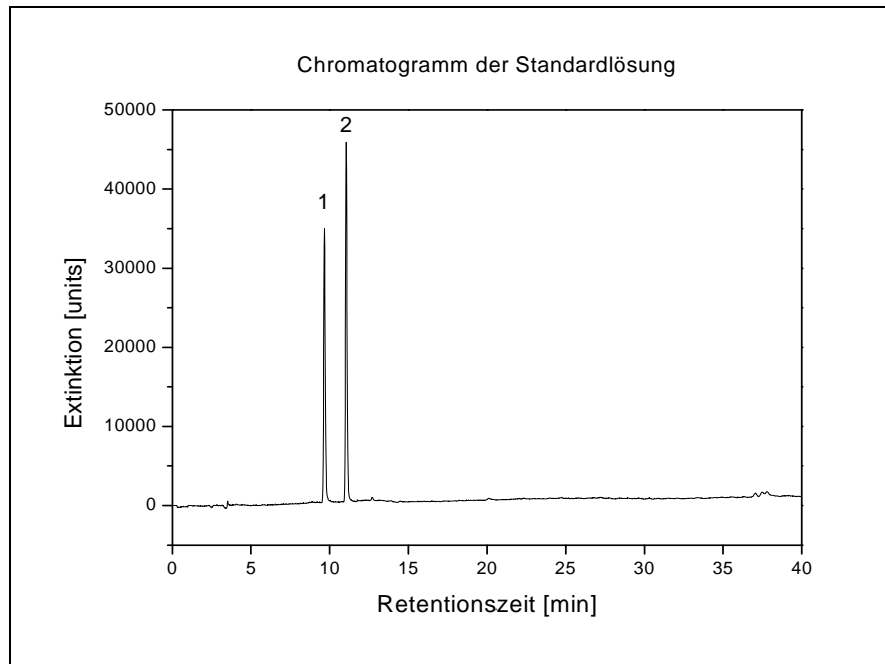
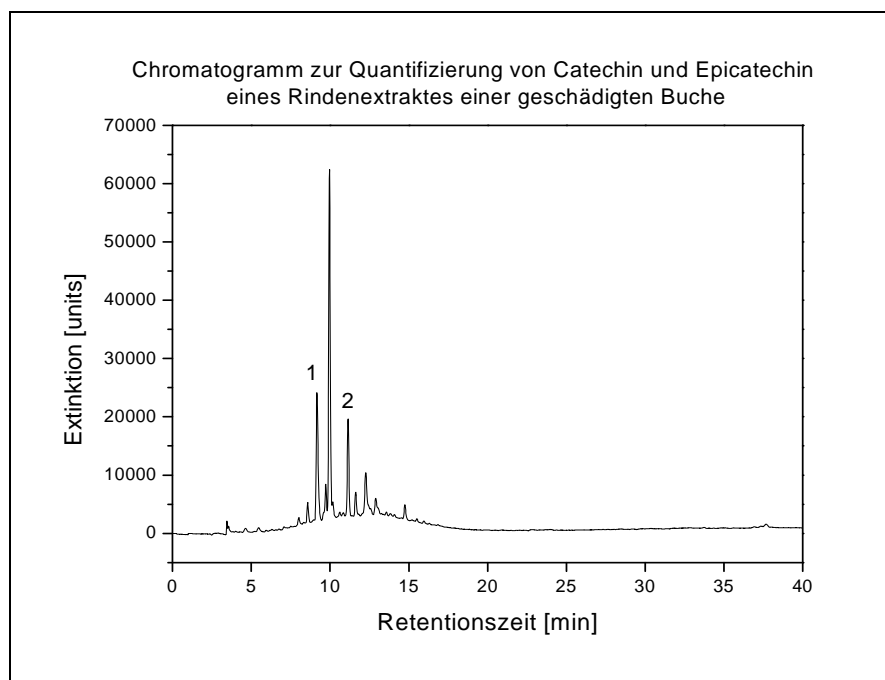
**A****B**

Abb. 3.30: Catechin/Epicatechin-Profil einer Referenzmischung und eines Extraktes, der aus der Rinde geschädigter Buchen gewonnen wurde. 1 = (+)-Catechin, 2 = (-)-Epicatechin.

3.4.1 Quantifizierung einzelner Phenolsäuren

In den Buchenproben konnten fünf Peaks des Chromatogramms aufgrund der Übereinstimmung mit Referenzverbindungen identifiziert werden. Die phenolischen nachgewiesenen Hauptkomponenten in den untersuchten Rindenproben waren Catechin, Chlorogensäure, und Cumarsäure (Tabelle 3.2). Vereinzelt konnte auch Ferulasäure und bei einer Kontrolle auch 3,4-Dihydroxybenzoesäure (nicht dargestellt) nachgewiesen werden. Zimtsäure und 4-Hydroxybenzoesäure konnten nicht nachgewiesen werden. Die Gehalte an Catechin lagen bei den untersuchten Rindenproben durchschnittlich bei 7 nmol/g TG und stellte damit die Hauptkomponente der phenolischen Inhaltsstoffe in Rinde dar. Die zweitgrößte identifizierte Komponente war die Chlorogensäure mit einem durchschnittlichen Gehalt von 5 nmol/g TG. Cumarsäure und Ferulasäure zeigten Mittelwerte von 1,5 nmol/g TG bzw. 0,7 nmol/g TG. Vergleicht man die befallenen Proben mit den Kontrollen, konnte festgestellt werden, dass die befallenen Rindenproben mit 7 nmol/g TG eine 25 % höhere Akkumulation an Catechin aufweisen konnten als die Kontrollen. Die Ferulasäuregehalte lagen bei den befallenen Proben mit 0,79 nmol/g TG ebenfalls leicht höher als bei den Kontrollen mit durchschnittlich 0,65 nmol/g TG. Nicht so die Gehalte der Chlorogensäure und Cumarsäure. Dort war ein höherer Anteil in den Kontrollen zu beobachten, nämlich durchschnittlich 5 % höhere Chlorogensäuregehalte bzw. 12 % höhere Cumarsäuregehalte gegenüber den befallenen Proben. Aufgrund der starken Variabilität wurden weder für die einzelnen Komponenten noch für die Gesamtheit aller Peaks signifikante Unterschiede zwischen den geschädigten und gesunden Bäumen nachgewiesen. Wurde jedoch das Baumpaar 46/45, das auch für den scheinbar gesunden Baum sehr hohe Catechinwerte aufwies, aus der Analyse ausgeschlossen, zeigte Catechin mit $p = 0,0014$ ein erhöhtes Signifikanzniveau gegenüber gesunder Bäume. Das führte zu den Überlegungen zu analysieren, welche Catechinderivate im einzelnen für die Akkumulation verantwortlich sind. Dazu wurden die Rindenextrakte nochmals chromatographisch aufgetrennt mit einem speziell abgestimmten Programm für (+)-Catechin und (-)-Epicatechin (Kap. 2.4.2).

Tab. 3.2: Vergleich der Gehalte von phenolischen Inhaltsstoffen aus Rindenextrakten. B = befallen; F = frei von Krankheitssymptomen. Zusammengehörende Baumpaare stehen jeweils untereinander (z.B. 163/167; 10/9; etc.)

Probenname	Gehalte [nmol/g TG]				
	Catechin	Cumarsäure	Ferulasäure	Chlorogensäure	Gesamt
163B	8,54	1,12	0,00	7,09	84,95
167F	3,57	0,68	0,00	7,24	36,88
10B	10,22	1,14	0,57	6,02	48,91
9F	1,42	0,00	0,00	2,09	22,83
156B	8,22	0,62	0,00	5,02	50,06
155F	7,22	0,50	0,00	5,31	39,00
200B	5,68	0,76	0,85	5,84	50,58
165F	5,77	0,74	0,71	7,11	47,92
219B	7,79	0,72	0,56	7,38	56,29
221F	4,16	0,94	0,63	7,98	45,22
18B	6,49	0,67	1,31	5,13	50,66
VB F	7,72	1,37	0,00	3,98	39,99
52B	4,99	2,76	0,00	3,46	35,62
44F	3,77	3,48	0,00	3,34	36,03
46B #	4.84 #	2,04	0,66	2,14	28,12
45F #	7.80 #	1,71	0,00	3,35	46,58
60B	6,95	3,59	0,00	2,32	34,42
59F	7,54	4,70	0,62	7,01	36,18
B (MW +/- SD)	7.08 +/- 1.79	1.49 +/- 1.07	0.44 +/- 0.47	4.93 +/- 1.92	48.85 +/- 16.50
K (MW +/- SD)	5.44 +/- 2.31	1.57 +/- 1.54	0.22 +/- 0.33	5.27 +/- 2.15	38.96 +/- 7.58
p (probability)	0,001	0,295	0,134	0,345	0,151
B - geschädigte Proben F - Kontrollen (nicht geschädigt) # - Analyse ohne 46B/45F					

3.4.2 Quantifizierung von Catechin und Epicatechin

Die Untersuchungen zeigten dass die Werte von (+)-Catechin wie bei den vorherigen Untersuchungen kein homogenes Bild ergaben (Tabelle 3.3). Bei den Proben des Paarversuchs lagen die Werte zwischen 2 und 10 nmol/g TG. Vergleicht man die Werte mit denen der vorhergehenden Analysen lagen die Werte im selben Bereich (1 bis 11 nmol/g TG (Tab. 3.3). Die befallenen Proben zeigten keine erhöhten Epicatechingehalte, bis auf das Paar 163/167, dort war ein 2fach erhöhter (-)-Epicatechingehalt zu verzeichnen als in der dazugehörenden Kontrolle. Somit ergab sich für Epicatechin ein ähnliches Bild wie bei (+)-Catechin. Jedes Baupaar verhielt sich individuell unterschiedlich im Gehalt von (-)-Epicatechin unter Stresseinwirkung. Durch die Untersuchungen der Catechin und Epicatechingehalte konnte ausgeschlossen werden, dass die zuvor beobachtete signifikante

Erhöhung an Catechin auf eine Erhöhung des Catechinderivats (-)-Epicatechin beruhte. (+)-Catechin kam durchschnittlich 4mal mehr in der Rinde vor als (-)-Epicatechin.

Tab. 3.3: Vergleich der normalisierten Peakflächen von (+)-Catechin und (-)-Epicatechin aus Rindenextrakten. B = befallen; F = frei von Krankheitssymptomen, die Proben aus dem Jahresverlauf sind Kontrollen, n.d. = nicht detektiert.

Probenname	Gehalt [nmol/g TG]	
	Catechin	Epicatechin
152 F	4,27	0,01
163 K	9,98	1,51
167 F	4,49	n.d.
10 K	3,96	
9 F	6,71	
156 K	9,60	0,24
155 F	4,69	n.d.
200 K	4,38	n.d.
165 F	9,68	n.d.
Jahresverlauf 1		n.d.
Jahresverlauf 4	2,31	n.d.
Jahresverlauf 7	2,23	n.d.
Jahresverlauf 10		
Jahresverlauf 13	2,56	n.d.
K - MW +/- SD	6.98+/- 3.25	0.37 +/- 1.08
F - MW +/- SD	4.62 +/- 2.55	0.43 +/- 0.38
p (probability)	0,39	0,20
K - geschädigte Proben F - Kontrollen (nicht geschädigt)		

3.5 Regulation von Genen des pflanzlichen Abwehrverhaltens

3.5.1 Analyse der Genexpression einzelner Klone mittels quantitativer Realtime-PCR

Eine weitere Abwehrreaktion stellt die Veränderung in der Genaktivität dar. Expressionsstudien auf Transkriptebene sollten Veränderungen des Transkriptlevels bei Enzymen des Shikimatstoffwechselwegs und ausgesuchter Enzyme die nachweislich eine wichtige Rolle beim Abwehrverhalten an Pflanzen spielen. Als Hauptkomponente der Genexpressionsstudien wurde der Shikimatstoffwechsel ausgewählt aufgrund seiner zentralen

Bedeutung bei der Synthese aromatischer Vorstufen vieler stressinduzierter Sekundärmetabolite. Zur Genexpressionsanalyse der Gene des Shikimatstoffwechselweges und ausgewählter weiterer Gene wurde die quantitative Realtime PCR (Kap. 2.5.3) verwendet. Die relative Genexpression der einzelnen Gene ist in Abbildung 3.31 dargestellt. Die höchste relative Genexpression wurde bei dem Transkript *PR1*, ein Marker für die Aktivierung der Pathogenabwehr, ermittelt. Dieses Gen war in den Proben der *Trypodendron* befallenen Buchen signifikant induziert und erreichte mit 16facher Induktion die höchste relative Expressionsphase aller hier untersuchten Gene. Ein Beweis für eine hohe Abwehrreaktion der Buche auf Insekten und Pilze. In denselben Proben wurde eine dreifache Hochregulierung des ACS2 Transkripts beobachtet. Dieses regulatorische Gen spielt eine entscheidende Rolle beim Biosyntheseweg von Ethylen. Die übrigen sechs untersuchten Gene des Shikimatstoffwechselweges wiesen eine schwache Herunterregulierung auf.

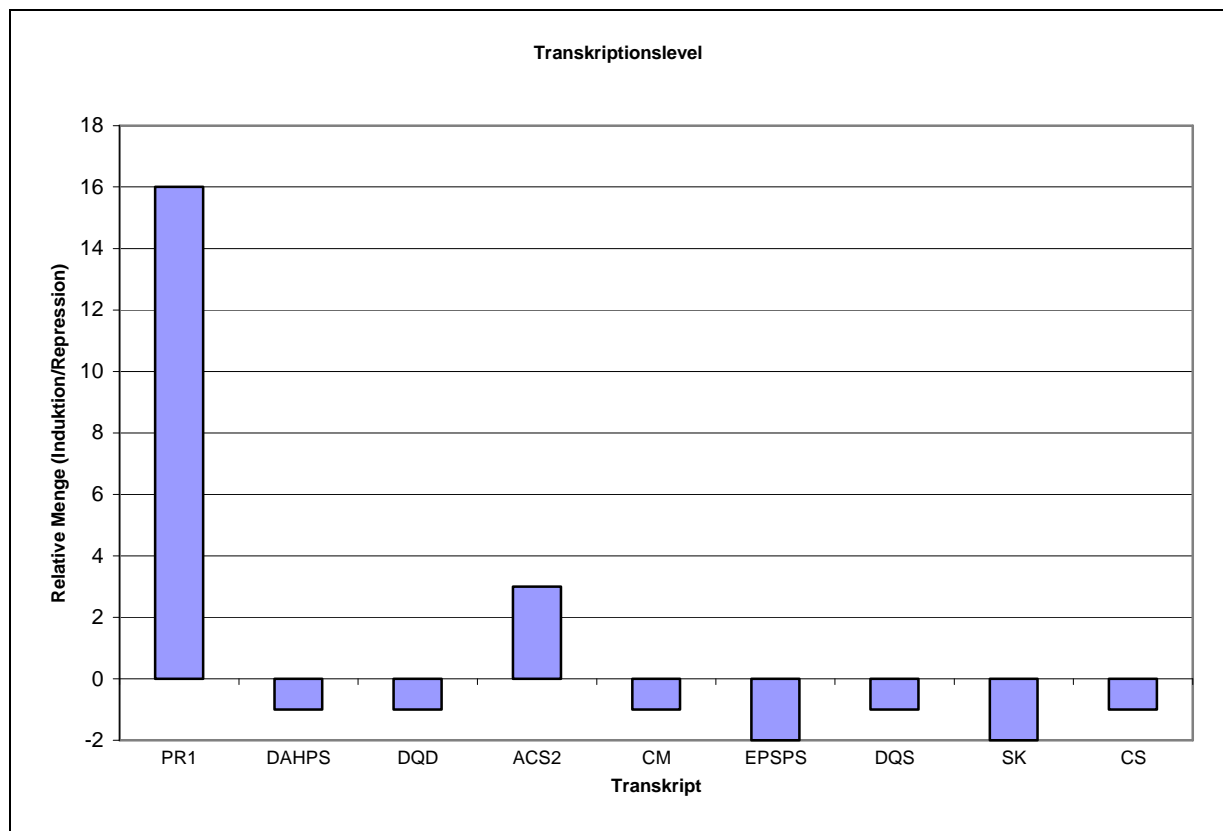


Abb. 3.31: Veränderung der über real-time PCR erfaßten Transkriptmengen in Rindenproben aus geschädigten Bäumen gegenüber denen aus gesunden Bäumen von *Fagus sylvatica* L.

Diese Ergebnisse zeigten, dass in 9 untersuchten Transkripten deutliche Veränderungen in der Genregulierung an den geschädigten Buchen im Vergleich zu gesunden Buchen beobachtet werden. Folglich war es interessant in einem größeren Umfang Genexpressionstudien durchzuführen. Dazu wurde auf einem buchenspezifischen DNA Chip 1139 Buchenklone

hybridisiert, die in 11 unterteilte Gruppen eingeteilt wurden: Primärstoffwechsel, Sekundärstoffwechsel, Energiestoffwechsel, Transkription, Proteinsynthese, Proteinmodifikation, Transporter, intrazelluläre Transporter, Zellstruktur, Signalweiterleitung und Krankheit/Abwehr (BETZ 2005).

3.5.2 Genexpressionsanalyse mittels DNA Chip

Zur Untersuchung der stressregulierten Genexpression mittels des Micro Arrays, wurde RNA aus Rindenmaterial aus der Fläche des Paarversuchs frisch geerntet und vor der RNA Extraktion (Kap. 2.5.1) anatomisch beurteilt, in wie weit das Material geschädigt und gesund war. Die Kontrollen waren durchweg nicht geschädigt und zeigten keine anatomischen Veränderungen oder Auffälligkeiten. Nur wirklich gesund aussehende Proben ohne mit der Lupe sichtbare anatomische Veränderungen wurden als Kontrollen für die Micro Array Analyse eingesetzt. Bei den geschädigten Proben lag der Käferbefall mindestens drei Jahre zurück. Akute morphologische Veränderungen konnten nicht beobachtet werden, jedoch waren ähnliche Auffälligkeiten wie bei dem Paarversuch (Kap. 1.2) festzustellen.

Erstmalig wurden Micro Array Analysen mit RNA aus Buchenrinde zur Genexpressionsanalyse durchgeführt.

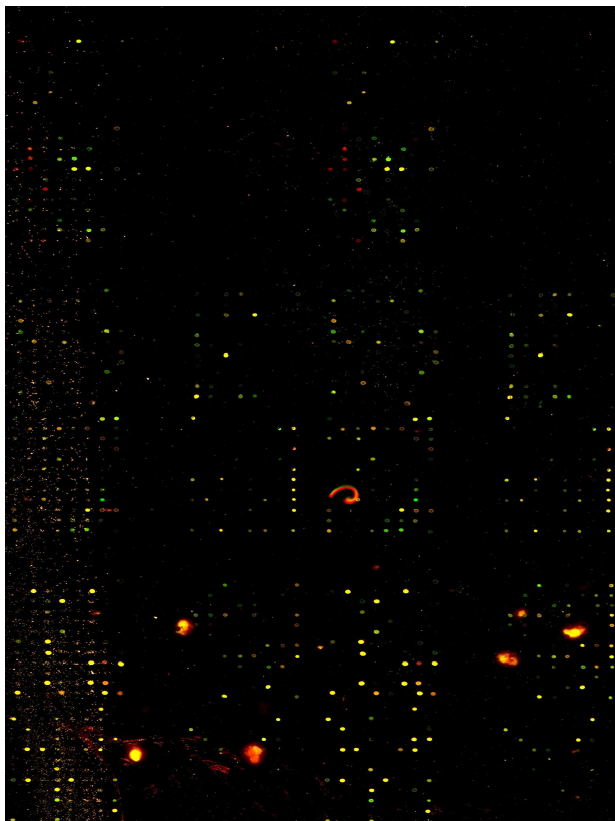


Abb. 3.32: Ausschnitt eines Array Chips zur Analyse stressinduzierter Gene aus Rindenmaterial geschädigter Buchen. Überlagerung beider Fluoreszenz – Teilbilder (Cy-3 und Cy-5).

Jedes der 10 untersuchten Probenpaare wurden auf einem zweiten Chip mit vertauschten Fluoreszenzmarkierungen der cDNA-Sonden wiederholt. Nach dem Einlesen und Auswerten der Chips konnte aus dem Unterschied der Fluoreszenzsignal-Intensitäten von geschädigten und gesunden Rindenmaterial Messwerte errechnet werden. Bei der Kalkulation wurden alle Spots einbezogen, die auf mehr als 10 Slides (von insgesamt 20 Slides) ein Signal besaßen und die einen Medianwert von > 1 (induziert) oder < 1 (reprimiert) aufwiesen.

Tabelle 3.4 zeigt die veränderten Expressionsfaktoren ausgewählter Enzyme aus Rinde beschädigten Buchen. Insgesamt konnte ein schwach verändertes Expressionsmuster der befallenen Proben ermittelt werden. Ein erhöhter Transkriptionslevel zeigte sich bei der ACC Oxidase 1e und ACC Oxidase b aus der Klasse der Signalweiterleitung (Tab. 3.4). Diese beiden Enzyme sind bei der Ethylenbildung beteiligt. Ein Aldolase Gen und ein Gen, was bisher noch nicht genauer identifiziert werden konnte, zeigten eine schwache Repression (Tab. 3.4). Aldolase ist für die reversible Spaltung und Verknüpfung der Ketose Fructose-1,6-bisphosphat in der Glykolyse verantwortlich.

Tab. 3.4: Expressionsfaktoren ausgewählter Enzyme an Rinde Trypodendron befallener Buchen ermittelt durch Micro Array Untersuchungen. Id = Identitätsnummer der Buchenklone.

id	Name	Median (Stats)	Count (Stats)
P9 B9	FSY420190 Fagus sylvatica ACC oxidase 1 e	1 011	15
P9 F1	AJ415386 Betula pendula cysteine proteinase	0.006	15
P9 B10	FSY420190 Fagus sylvatica ACC oxidase b	1 089	13
P7 C12	AY492006 Glycine max fructose-bisphosphate aldolase	0.801	12
P7 D12	AY705444 Fagus sylvatica chloroplast ribulose-1	0.822	12
P9 C6	Ethylene resistant	0.880	12
P3 G10	Unbekannte Klone	-2 149	11
P7 D2	M97477 Pisum sativum L. aldolase gene	-1 686	11

4. Diskussion

Die Buchenkomplexkrankheit gilt als eine der forstwirtschaftlich wichtigsten Buchenerkrankungen (BLASCHKE 2005). Die Infektion des Baumes durch die Buchenwollschildlaus scheint der erste Schritt dieser Komplexerkrankung zu sein (PETERCORD 2002, NIESAR 2003). Pathogenbefall löst u.a. strukturelle Abwehrreaktionen der Buche aus. Aufgrund der unterschiedlichen Attacken auf die Buche und Stressimpulse, die sich im Verlauf der Buchenkomplexkrankheit abspielen, muß die Buche alle Möglichkeiten ihrer Resistenzfaktoren ausschöpfen, um den vielfachen Angriffen standzuhalten und die Krankheit erfolgreich abzuwehren. Im Folgenden werden diese mechanischen und chemischen Resistenzmechanismen der Buche genauer beleuchtet.

4.1 Strukturelle Abwehrreaktionen

Wird die Buche durch die Buchenwollschildlaus, pilzliche Stammerreger oder Käfer besetzt, ist die Rinde das erste Gewebe, mit dem die Erreger in Kontakt treten, dementsprechend primär reagieren kann und somit für die weitere Steuerung von Resistenzmechanismen fungiert. Die Buchenwollschildlaus sticht mit ihrem Saugrüssel durch die Buchenrinde bis zum Kambium (PETERCORD 1999).

PETERCORD (2003) behauptete, dass die Buchenwollschildlaus von außen nicht erkennbare Schädigungen der Rinde verursachen kann, die den Befall durch *Trypodendron* mit dem neuartigen Schadbild ermöglichen. In den Arbeiten von BRAUN (1976, 1977) wurden die Rindenschäden durch den Befall der Buchenwollschildlaus näher analysiert. Als typische Rindenparenchymsauger stechen die Läuse durch das Oberflächenperiderm, verletzen das Kambium jedoch nicht (KUNKEL 1968, SCHÜTT & LANG 1979). Die Reaktion der Buche ist die Ausbildung von Rindennekrosen, wobei die Zellen an der Verwundungsstelle teilweise absterben und sich bräunlich verfärben. Die Beobachtungen des Stichverletzungsversuch (Kap. 3.2.2) bestätigten dies. Auch hier wurde um die Stichkanäle nekrotisches Gewebe beobachtet.

Der Befall durch *Cryptococcus fagisuga* Lind. findet naturgemäß im Frühjahr statt. Der Simultanversuch an den Probebuchen wurde unter Berücksichtigung der natürlichen Befallszeit im Mai durchgeführt. Nach der darauffolgenden Vegetationsphase zeigten sich Wundperiderme mit proliferierten Parenchymzellen. Die Zellwände des durch den Einstich bedingten Wundperidermgewebes zeigten Polyphenoleinlagerungen (Abb. 3.11 A). Das

unterstützt die Beobachtungen von BRAUN (1977), dass die Buche bei Massenbefall durch *Cryptococcus fagisuga* Lind. tieferes, über den Einstichkanal hinaus, nekrotisches Gewebe zeigte. BRAUN (1977) folgerte eine chemische Veränderung der Rinde und damit das Abtöten der Rinde durch Freisetzung toxischer Verbindungen der Buchenwollschildlaus und die Bildung von Sekundärmetaboliten. Die Freisetzung toxischer Verbindungen, die von der Buchenwollschildlaus herrühren, wurde jedoch im Rahmen des Stichverletzungsversuchs (Kap. 2.1.4) mit der Simulation einer Buchenwollschildlausinfektion der Buche nicht bestätigt. Es konnten zwar Gerbstoffeinlagerungen in den Einstichbereichen der Zellwände nachgewiesen werden, jedoch lässt das nicht auf eine Buchenwollschildlausinfektion schließen, sondern vielmehr auf eine Reaktion der Rinde auf die Verletzung. Somit liegt es nahe, dass physiologische Veränderungen im Stoffwechselhaushalt der Rinde und im Holz weitere Abwehrmechanismen in Gang bringen.

Untersuchungen von LANGENFELD-HEYSETER et al. (2005) zeigten bei *Trypodendron* befallener Buchenrinde Rindenekrosen. Makroskopisch konnte man keine Schädigungen erkennen. Genauso hat es BRAUN (1977) in seinen Untersuchungen an Buche beobachtet. Allerdings wurde bei den *Trypodendron* befallenen Proben eine stark verborkte Rinde beobachtet, wohingegen BRAUN (1977) den Befall durch die Buchenwollschildlaus mit der charakteristisch glatten Buchenrinde verbindet. Vermutungen gehen dahin, dass die verborkte Rinde durch ein wiederholtes Auftreten von Rindenekrosen entstanden sein könnte (LANGENFELD-HEYSETER 2005). AUST et al. (1993) definierte Nekrosen allgemein als „lokalen Zell- oder Gewebetod als Folge der Abtötung des Protoplasmas durch physikalische oder toxische Einwirkungen oder als Reaktionen auf parasitische Einflüsse“.

Im Rahmen von Pflanze-Pathogen-Interaktion, wie hier bei der Buche mit der Buchenwollschildlaus, ist das Auftreten von Rindennekrosen ein typisches Krankheitssymptom. Manche Autoren sehen die Bildung von nekrotischem Gewebe nach Primärinfektion als die wichtigste Voraussetzung zur Aktivierung der systemisch aktivierten Resistenzmechanismen (SAR) an (LAWTON et al. 1996 und KEMMERLING 2001). Bei dem Primärbefall der Buche durch die Buchenwollschildlaus im Zusammenhang mit dem neuartigen Schadbild der Buchenkomplexkrankheit muß es jedoch nicht zwangsläufig zur Ausprägung systemisch aktivierter Resistenzen kommen. Die Intensität und Dauer des Befalls, sowie die individuelle Fitness des einzelnen Baumes sind entscheidend. So zeigte sich bei Untersuchungen der *Trypodendron* befallenen Proben des Paarversuchs (Kap. 1.2) Rindennekrosen im Kontrollmaterial, die ausgeheilt waren und somit auf einen erfolgreich abgewehrten Angriff hinweisen, so dass die Möglichkeiten für einen Sekundärbefall mit

Pilzen oder *Trypodendron* ausgeschlossen waren (BRAUN 1977). Andererseits zeigten die befallenen Proben durchgehend nekrotisches Gewebe. Der Versuch, den Pathogenbefall durch Bildung von Wundperidermen und Einlagerung mit Gerbstoffen abzuwehren, war nicht immer erfolgreich. Folglich konnte ein Sekundärbefall stattfinden (Einstufung als *Trypodendron* befallen). Somit liegt die Vermutung nahe, dass das Vorkommen von Rindennekrosen notwendig für den Stehendbefall mit *Trypodendron* ist (LANGENFELD-HEYSER et al. 2005). Jedoch zeigten nicht alle Buchen, die nekrotische Rindenregionen aufwiesen, *Trypodendron* Befall (Abb. 1.2 B).

Als Reaktion auf starken *Cryptococcus* und *Trypodendron* Befall im Zusammenhang mit der Buchenkomplexkrankheit waren im Holz der befallenen Proben sog. Strahlproliferationen zu beobachten (Abb. 1.3). Diese durch eine Aktivitätsstörung des Kambiums hervorgerufene anomale Holzbildung steht in direkter Verbindung mit den oben diskutierten Rindennekrosen mit anomalem Bau des sekundären Phloems (POLLE et al. 2005).

4.2 Einfluß des Pathogenbefalls auf die Physiologie

4.2.1 Die Rolle der Sekundärmetabolite

Um den Einfluss von *Trypodendron* beschädigten Buchen auf Sekundärmetabolite, insbesondere der phenolischen Inhaltsstoffe, in der Rinde zu untersuchen, war es zunächst wichtig den Gehalt an phenolischen Verbindungen in gesunder Buchenrinde zu bestimmen. Neben den Untersuchungen des Paarversuchs (Kap. 3.3) wurden Gehaltsanalysen aus gesunden Buchen zwei weiterer Vergleichsstandorte durchgeführt. In den Ergebnissen dieser Untersuchungen wurden zwar Unterschiede in den Gehalten der jeweiligen Standorte (Abb. 3.21 und Abb. 3.22) nachgewiesen, jedoch waren die eher auf den unterschiedlichen Standort, Wuchsbedingungen und Erntezeitpunkt zurückzuführen als auf den Befallsstatus. Der direkte Vergleich der Phenolgehalte der Kontrollpartner mit den *Trypodendron* befallenen Proben zeigte auf den ersten Blick überwiegend erhöhte Gesamtgehalte an löslichen und zellwandgebundenen phenolischen Verbindungen in der Rinde befallener Proben. Die Bildung phenolischer Inhaltsstoffe gilt für die Wundheilung besonders bedeutungsvoll, da phenolische Verbindungen zur Bildung struktureller Barrieren benötigt werden (ELSTNER 1994). Wird eine Pflanze beschädigt oder von Pathogenen befallen, kommt es zu einer Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies, die wiederum mit der Produktion von phenolischen Verbindungen mit antimikrobiellen Eigenschaften gekoppelt ist (COUTTS 1977).

Phenolische Verbindungen können in freier Form für die Pflanzen selbst toxisch sein, deshalb werden sie häufig in derivatisierter Form in der pflanzlichen Vakuole gespeichert (HARBORNE 1993). Des Weiteren werden sie in den apoplastischen Raum transportiert und können dort in die Zellwand fixiert werden (BETZ 2005). Als induzierbare Abwehrreaktion bei biotischem und abiotischem Stress gilt die Bildung von Polyphenolen, deren Funktion ist, Radikale abzufangen (LANGEBARTELS et al. 2002).

Da jedoch klare Unterschiede zwischen den Kontrollen und den befallenen Proben im Gesamtgehalt löslicher und zellwandgebundener Phenolinhaltstoffe der Rinde bei den hier durchgeführten Untersuchungen ausblieben, kann man schlussfolgern, dass der Gesamtgehalt an löslichen und zellwandgebundenen phenolischen Verbindungen in der Rinde nicht als eindeutiger Marker für die Anfälligkeit gegenüber *Trypodendron domesticum* L. oder anderen Pathogenen der Buchenkomplexkrankheit zu betrachten ist. Ähnliche Aussagen machte MORNAU (2004) im Zusammenhang mit *Malus* Spezies und *Phytophthora cactorum*.

Mehrere Autoren behaupten, dass eine Erhöhung der löslichen Phenole auf eine akute Stressreaktion hin und damit auf eine aktive Abwehr deutet (LANGENFELD-HEYSEYER et al. 2003, MORNAU 2004). Der Stressimpuls liegt also nur kurz zurück. Liegt der Stressimpuls schon länger zurück, also in dem Fall der Pathogenbefall, so zeigen sich die zellwandgebundenen Phenolgehalte erhöht. In den hier durchgeführten Untersuchungen war der lösliche Phenolgehalt der *Trypodendron* befallenen Proben tendenziell erhöht im Vergleich zum Kontrollpartner. Die zellwandgebundenen Phenolgehalte, also das Maß für eine zurückliegende Abwehrreaktion schien bei den Proben des Paarversuchs nicht erhöht zu sein. Eine Überlegung könnte demnach sein, dass der Bestand von größeren Pathogenangriffen in der Vergangenheit verschont blieb und die Buchen kein hohes Abwehrpotential aufbauen mussten. Vergleicht man die Gehalte der löslichen und zellwandgebundenen phenolischen Inhaltsstoffe mit denen der Kontrollproben der anderen Standorte fällt auf, dass die Gehalte in Halberstadt und Reinhausen höhere Gehalte an zellwandgebundenen Verbindungen aufweisen als die Proben des Paarversuchs. Das lässt den Schluss zu, dass die Buchen in Halberstadt und Reinhausen besser geschützt waren als in Rheinland-Pfalz.

Bestimmte phenolische Verbindungen wie Catechin und Kaffeesäurederivate wurden bei pflanzlichem Pathogenbefall verstärkt gebildet (MORNAU 2004). Um die Behauptung von MORNAU (2004) in den hier untersuchten Buchenproben nachzuweisen, wurden die Einzelsubstanzen mittels HPLC Analytik bestimmt, um so Unterschiede innerhalb der Substanzklassen aufzudecken. FEUCHT et al. (1997) zeigten, dass eine positive Beeinflussung

von Catechin auf das Pflanzenwachstum stattfand. Fast gleichzeitig bewiesen HÄRTLING & SCHULZ (1998) an *Pinus* unter SO₂ Belastung eine Akkumulation von Catechin mit Korrelation zu Nekrosenbildung. Vergleicht man die Ergebnisse der HPLC Untersuchungen der *Trypodendron* befallenen Proben mit den Kontrollen (Kap 3.4), kann festgestellt werden, dass die befallenen Bäume höhere Werte an Catechin aufweisen als die Kontrollen. Die Ferulasäurewerte lagen bei den befallenen Proben ebenfalls leicht höher als die Kontrollproben. Die Werte der Chlorogensäure und Cumarsäure zeigten sich in den Kontrollen erhöht. Werden alle Flächeneinheiten aller Peaks phenolischer Inhaltsstoffe der befallenen Proben mit denen der dazugehörigen Kontrollen verglichen, wird nur ein Trend in Richtung erhöhter Phenolgehalte in kranken Bäumen festgestellt. Demnach würde sich nicht der Gesamtphenolgehalt in der Pflanze ändern, sondern das individuelle Profil der phenolischen Substanzen als Reaktion auf Stresseinwirkung.

Die Untersuchungen ergaben, dass sich keine allgemeinen Aussagen bezüglich Veränderungen der phenolischen Inhaltsstoffe aufstellen lassen. Jedes Baumpaar aus dem Paarversuch verhielt sich unterschiedlich. Das unterstreicht die Beobachtung, dass die Buche sich individuell unterschiedlich auf Stresseinwirkung verhält. Jeder Pflanze steht ein unterschiedliches Maß an Ressourcen und Energie zur Verfügung, die in Wachstum und in die Pathogenabwehr investiert werden können. Es ist auch nicht auszuschließen, dass auch die scheinbar gesunden Buchen, den Befall erfolgreich abgewehrt haben und daher eventuell noch erhöhte Konzentrationen von phenolischen Verbindungen enthalten, wie beispielsweise das Baumpaar mit der Nummer 46/45 (Tab. 3.2). Anatomische Untersuchungen stützen diese Vermutung (LANGENFELD-HEYSER et al. 2005).

Eine signifikante Erhöhung von Catechin in den *Trypodendron* befallenen Rindenproben im Vergleich zu Kontrollmaterial wurde nachgewiesen (Kap. 3.4). Das lässt schließen, dass durch den *Trypodendron* Befall eine besondere Aktivierung des Sekundärstoffwechsels stattgefunden haben muß. Während einige Phenolsäuren wie beispielsweise Cumarsäure oder Kaffeesäure, im Laufe des Sekundärstoffwechselweges sehr früh gebildet werden und somit zu den ersten Metaboliten gezählt werden, werden die Catechine, wie (+)-Catechin und (-)-Epicatechin als späte Metabolite betrachtet (FORKMANN & HELLER 1999). Wenn man dann von einer gezielten Regulation des Sekundärmetabolismus ausgeht, lässt sich schlussfolgern, dass die bei *Trypodendron* befallenen Bäumen erhöhten (+)-Catechingehalte eine besondere Bedeutung zukommt. Catechin wird als Indikator für Umweltstress bei Bäumen diskutiert wird (HÄRTLING & SCHULZ 1998, KAFFARNIK, 2001). Auch WEISS et al. (1997) beobachtete eine Erhöhung von (+)-Catechin- und (-)-Epicatechingehalten in Geweben mykorrhizierter

Lärchen, die frei von Pilzhyphen waren. Es wurde vermutet, dass die Akkumulation der Sekundärmetabolite das Pilzwachstum kontrolliert. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Catechinsynthese eine Abwehrreaktion bei der Buche darstellt und so einen Schutz gegen Sekundärinfektion wie Pilzwachstum bietet (LAPLAZE et al. 1999).

Eine weitere Ursache für variable Profile phenolischer Substanzen könnte eine Verlagerung einzelner Phenolsäuren sein. LAVOLA & JULKUNEN-TIITTO (1994) vermuteten, dass niedermolekulare phenolische Verbindungen, wie beispielsweise Cumarsäure, innerhalb der Pflanze unter bestimmten Bedingungen verlagert werden können und damit mobil sind. Damit würde sich der niedrigere Gehalt einiger phenolischen Substanzen wie Epicatechin oder Ferulasäure (Tab. 3.2 und Tab. 3.3) in den *Trypodendron* befallenen Rindenproben im Vergleich zu den nicht befallenen Kontrollproben erklären.

Betrachtet man die Gehalte der phenolischen Verbindungen der Rinde im Jahresgang, so zeigen sich keine nennenswerten Schwankungen während der Vegetationsperiode (Kap. 3.3.2 und Kap. 3.3.4). Das unterstützt die Untersuchungen an Buche von GÄUMANN (1935), der ausführlich den Stoffhaushalt der Buche im Laufe eines Jahres untersucht hat und im Hinblick auf Gerbstoffeinlagerungen in der Rinde keine jahreszeitlichen Schwankungen beobachtet hat. Wie bei den hier durchgeführten Untersuchungen bemerkte GÄUMANN (1935), dass enorme Schwankungen von Baum zu Baum auftraten, besonders in der Rinde. Eine größere Anzahl an untersuchten Buchen wäre nötig, um die Aussagen zu überprüfen. GÄUMANN (1935) beobachtete weiter, dass abhängig vom Jahr bei denselben Individuen unterschiedliche Gehalte an phenolischen Verbindungen nachgewiesen werden konnten. Das beweist, dass die Verteilung und Bildung phenolischer Inhaltsstoffe offenbar nicht allein genetisch bedingt ist, sondern auch von anderen Faktoren, wie die Umweltbedingungen bestimmt werden (KAFFARNIK 2001).

Die nicht einheitlichen Ergebnisse der Gehalte an phenolischen Verbindungen deuten darauf hin, dass unterschiedliche und komplexe Regulationsmechanismen innerhalb des Sekundärmetabolismus für die unterschiedlichen Gehalte verantwortlich sind.

4.2.2 Veränderungen in der Genexpression

Neben eingehenden Untersuchungen zur Befallsursache und zum Befallsausmaß der neuartigen Buchenschädigung gab es nur wenige Resultate über Abwehrprozesse von *Fagus* auf Transkriptionsebene. Um einen umfangreichen Einblick in die Genexpression von geschädigten Buchen zu gelangen, wurden Genexpressionsanalysen durchgeführt. Kenntnisse

über Mechanismen auf Transkriptionsebene sind wichtig, um umweltbedingte Auswirkungen verstehen zu können.

Die Realtime Untersuchungen zeigten, dass die Marker für die Aktivierung der Pathogenabwehr, das *PRI* Transkript, 16fach hochreguliert wurde. Dies ist ein deutlicher Hinweis auf eine hohe Abwehrreaktion der Buche auf Pathogenbefall.

Ebenfalls wurde eine dreifache Hochregulierung der *ACS2* mRNA beobachtet. Dieses Gen spielt eine entscheidende Rolle bei der Synthese von Ethylen. Ethylen, ein Phytohormon, ist der zentrale Regulator von Zelltodprogrammen in Pflanzen. Es scheint bei Bäumen aber auch eine wachstumsstimulierende Wirkung zu haben (JUNGHANS et al. 2004). Schließlich führen sehr viele biotische und abiotische Stressfaktoren zur Ethylenbildung, wobei die physiologische Wirkung von Stressethylen sehr unterschiedlich sein kann. Zum einen fördert es die Fruchtreife und andere Seneszenzprozesse, zum anderen löst Ethylen bei Pathogeninfektion Stressreaktionen aus. Ethylen kann in einigen Fällen die Krankheitssymptome verstärken, in anderen abschwächen oder ohne Wirkung bleiben (BLEECKER & KENDE 2000). Mit der direkten Beteiligung von ACC Synthase und ACC Oxidase an der Ethylenbildung (KENDE 1993) spielt die Induktion der beiden Enzyme eine wichtige Rolle bei pflanzlichem Stress, wie Verwundung, Trockenheit oder Frost (YANG 1989 und KENDE 1993). Stressethylen wirkt in Pflanzen als Signalsubstanz. SCHOPFER & BRENNICKE (1999) postulierten, dass Ethylen zur Synthese von Abwehrenzymen gegen pathogene Pilze führte. Während bei krautigen Pflanzen Ethylenbildung als eine der früheren pflanzlichen Stressantworten gilt (MOEDER et al. 2002), wurden in Bäumen erst deutlich später eine Erhöhung der Ethylensyntheserate beobachtet, die mit einer Erhöhung der *ACS2* Induktionsrate begleitet wurde (SIMONS 1993, LANGEBARTELS et al. 1997 und NUNN 2005). Das unterstreicht das Ergebnis der hier vorliegenden Genexpressionstudien. Sowohl die Realtime PCR Untersuchungen als auch die Micro Array Analysen zeigten erhöhte Transkriptionslevel bei Transkripten, die an der Ethylenbildung beteiligt sind: *ACS2*, *ACC Oxidase 1e* und *ACC Oxidase e*.

Der Befall durch *Trypodendron* war nicht akut. Das heißt, dass das Probenmaterial nach sechs Monaten nach dem Befall gesammelt wurde. Abwehrreaktionen auf Transkriptionsebene sind somit nicht akute, schnelle Reaktionen, sondern spiegeln langfristige Effekte in der pflanzlichen Abwehr wider.

Die übrigen sechs untersuchten Gene mittels quantitativer PCR wiesen eine nicht signifikante, schwache Herunterregulierung auf. Diese meist regulatorischen Gene führen zur Bildung von aromatischen Aminosäuren, die im Shikimatsäurezyklus gebildet werden. Eine

Umsteuerung zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel scheint im Zusammenhang mit Stressreaktionen zu stehen. Die gebildeten Aminosäuren nutzt die Buche nicht nur für die Proteinbildung, sondern auch als Vorläufer für eine große Anzahl von Sekundärmetaboliten, die wiederum eine Barrierefunktion gegen Pathogene darstellen. So scheint auch eine Erhöhung der phenolischen Inhaltsstoffe ein Beweis für eine Umsteuerung des Primär- und Sekundärstoffwechselweges zu sein (BETZ 2005).

Bislang ist über den zeitlichen Verlauf der Abwehr bei der Buche wenig bekannt. Es ist möglich, dass Gene des Shikimatweges nur transient hochreguliert werden, solange bis genügend Abwehrmetabolite gebildet sind und zur Verfügung stehen. Anschließend geht die Synthese auf ein Basislevel zurück. Eine andere Möglichkeit ist, dass die Neusynthese von diesen Stoffen bei der Buche keine oder nur eine untergeordnete Rolle spielt.

Im Rahmen der Micro Array Analysen konnte, neben den erhöhten Transkriptionslevel der ACC Oxidasen bei geschädigten Buchenproben, auch eine Herunterregulierung eines Aldolase Gens beobachtet werden. Aldolase ist für die reversible Spaltung und Knüpfung der Ketose Fructose-1,6-bisphosphat in der Glykolyse verantwortlich. MICHELSI & GEPSTEIN (2000) konnten nachweisen, dass das Enzym Aldolase nach Hitzestress an Hafer auftritt und schließen auf eine Rolle der Aldolasen bei der Ausbildung von Hitzetoleranz gegen hohe Temperaturen. Aus der Expressionsteigerung nach Pathogeninfektion kann geschlossen werden, dass dem Aldolasehomolog aus *Fagus sylvatica* L. eine generelle Funktion in der Stressabwehr zukommt.

Im Allgemeinen zeigt sich, dass in der Rinde nicht viele Veränderungen im Transkriptionslevel mittels Microarray Technik zu beobachten waren. Das unterstreicht die eigentliche Funktion der Rinde, nämlich vorrangig die als Schutzschicht und im weiteren Sinne mit Speicherfunktion. Primär wären Veränderungen auf Transkriptionsebene in Blättern zu erwarten. OLBRICH et al. (2005) konnten ein verändertes Transkriptionsprofil an Blättern von *Fagus* zeigen im Zusammenhang mit Ozonstress.

Da der *Trypodendron* Befall der Proben, die für die Micro Array Analysen eingesetzt wurden, drei oder mehr Jahre zurück lag, wird vermutet, dass Reaktionen auf Transkriptionsebene nur eine kurze Zeit nach Stresseinwirkung zu beobachten sind und sich später wieder dem Level der Kontrollen annähern. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass Micro Array Analysen erstmalig erfolgreich an Rinde aus *Fagus sylvatica* L. durchgeführt werden können.

4.3 Mögliche Ursachen des Buchensterbens

Eine Hypothese über die Entstehung der neuartigen Buchenerkrankung war, dass extreme Frostereignisse die Buchen anfällig für die weiteren Pathogene machen würden (HUART & RONDEUX 2003). Um die Hypothese zu überprüfen, wurde ein Frostreiz an einem Buchenstamm ausgeübt (Kap. 2.1.3). Die Ergebnisse zeigten zwar morphologische Veränderungen, wie Einlagerung von Gerbstoffen in der Rinde und im Holz, verdickte Zellwände, sowie Anomalien in der Holzbildung (Kap. 3.2.1), jedoch fehlen Untersuchungen zur Physiologie. In Arbeiten von STOCKINGER et al. (1997) heißt es, dass bei Kältestress Pflanzenhormone wie Abscisinsäure, Ethylen und Jasmonate Veränderungen der Genexpression als Antwort auf den Kältereiz hervorrufen. Ein plötzlicher Kälteimpuls bewirkt in der Pflanze einen größeren Stress als ein langsames Absinken der Temperatur. Frost kann Zellen durch intrazelluläre Eiskristallbildung absterben lassen und damit zur Nekrosenbildung führen. An Frost gewöhnte Pflanzen bilden als Reaktion auf niedrige Temperaturen spezifische Proteine und Zuckermoleküle, um sich vor der Kristallbildung zu schützen. Das dauert jedoch einige Tage. Dauert der Reiz nur ein paar Stunden, wie in den vorliegenden Untersuchungen, so werden zwar Nekrosen gebildet; das schnell gebildete nekrotische Gewebe scheint jedoch keine weiteren systemisch regulierten physiologischen Resistenzmechanismen auszulösen. Vielmehr sind die Dauer und die Intensität des Kältestresses ausschlaggebend (KLESSIG & MALAMY 1994). Es kann ausgeschlossen werden, dass Frostereignisse die neuartige Buchenerkrankung auslösen, da durch die hier durchgeführten Untersuchungen eindeutig bewiesen wurde, dass Schäden, die auf die neuartige Erkrankung zurückzuführen waren andere morphologische Veränderungen hervorrufen als Froststress.

Handelt es sich letztendlich um die bereits bekannte Erkrankung der klassischen Buchenkomplexkrankheit oder um eine neue, bisher nicht beschriebene Erkrankung?

Bei dem neuartigen Schadbild an Buche (Kap. 1.2) handelt es sich um keine neue, bisher nicht beschriebene Buchenerkrankung. Vielmehr wahrscheinlich scheint es, dass es sich um eine Variation der bereits bekannten Buchenkomplexkrankheit (HARTIG 1878) handelt mit ihrer vielseitigen und facettenreichen Erscheinungsform.

Können die holzbrütenden Käfer außer vorgeschädigtem Holz und Totholz auch gesunde stehende Buchen befallen?

Durch die Aneinanderreihung der Ereignisse und anhand der hier durchgeführten anatomischen Untersuchungen an dem gesammelten Probenmaterial ist bewiesen worden, dass die holzbrütenden Käfer *Trypodendron domesticum* L. nur vorgeschädigte Buchen sowie bereits geschlagene Buchen befallen.

Liegt bei den vital aussehenden Bäumen eine von außen nicht erkennbare Schädigung vor?

In den untersuchten Gebieten waren strukturelle Schädigungen durch die Buchenwollschildlaus hervorgerufen vor dem Käferbefall beobachtet worden. Die anfangs als vital erscheinenden Buchen, die durch *Trypodendron* befallen wurden, waren bereits vorgeschädigt. Die Schäden waren makroskopisch nicht sichtbar, sondern nur mikroskopisch zu erkennen in Form von Rindennekrosen bis hin zu Kambiumnekrosen und Anomalien im Kambialbereich.

Aufgrund eines verstärkten Befalls durch die Buchenwollschildlaus und extremen Wetterbedingungen war die Buche in den untersuchten Beständen Rheinland-Pfalz verstärkten Belastungen ausgesetzt und dadurch bereits geschwächt. Die Massenvermehrung des Käfers *Trypodendron* in den darauffolgenden Jahren bedeutete eine zusätzliche Belastung. Durch diese Anhäufung mehrerer Negativereignisse war ein besonders auffälliges Schadbild der Buchenbestände ersichtlich.

4.4 Physiologische Aspekte im pflanzlichen Abwehrverhalten

SCHWINN (1965) hat in Untersuchungen an Apfelbäumen gezeigt, dass die Borkendicke ein entscheidender Abwehrfaktor für eine Infektion mit *Phytophthora cactorum* darstellt. Im Gegensatz dazu bewies MORNAU (2004), dass *Phytophthora* unabhängig von der Rindendicke verschiedene Genotypen von *Malus* infizieren konnte. Mit den vorliegenden Ergebnissen der Korrelation der Rindendicke, den Rindennekrosen und den zellwandgebundenen Phenolen *Trypodendron* befallener Buchenrinde lassen den Schluss zu, dass die Borkendicke nicht die ausschlaggebene Ursache für den Ausbruch der Kettenerkrankung ist. Jedoch zeigt es, dass die Bäume mit einer starken Verborkung in der Vergangenheit starke Abwehrreaktionen zeigten.

Von Interesse ist, die Regulation der Sekundärmetabolitbildung besser zu verstehen. Zum Beispiel ist die Bildung von Sekundärmetaboliten für Pflanzen kostspielig. Eine Möglichkeit, die Energie und Kosten möglichst gering zu halten, ist die zeitlich begrenzte Synthese der

Sekundärmetabolite. Zudem beweist es, dass eine Anreicherung sekundärer Pflanzenstoffe unter ökologischen Aspekten für die Buche sehr bedeutungsvoll sein muss (HARPER 1989).

Die These von MUZIKA & PREGITZER (1992), dass eine verstärkte Bildung von Sekundärmetaboliten eine Repression des Primärstoffwechsels mit sich zieht, scheint plausibel. Der Beweis an Buche im Zusammenhang mit der Buchenkomplexkrankheit steht allerdings noch aus.

5. Zusammenfassung

Die Buchenkomplexkrankheit zählt zu den bedeutendsten Krankheiten an Buchen (*Fagus sylvatica* L.) in Mitteleuropa. Die dadurch hervorgerufenen Schäden führten in der Vergangenheit zu einem Imageverlust der Buche. Die Baumart *Fagus sylvatica* L. wird auch Rotbuche genannt. Da sie einen 14%igen Anteil an der Gesamtwaldfläche Deutschlands einnimmt und sehr konkurrenzstark ist, zählt sie flächenmäßig zu den bedeutendsten Laubbaumarten Mitteleuropas. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das anatomische, physiologische und molekularbiologische Abwehrverhalten in stehenden Buchen, die mit *Trypodendron domesticum* L. befallen waren, im Vergleich zu nicht befallenen Buchen näher zu charakterisieren.

Voruntersuchungen zeigten, dass Buchenwollschilddlausbefall morphologische Veränderungen in der Rinde und manchmal sogar auch im Holz zeigten. Die Buche versuchte die Verletzungen, die durch *Cryptococcus* entstehen, durch Ausbildung von Überwallungsgewebe an den Einstichskanälen zu verwunden. In eigenen Untersuchungen wurde versucht, die Einstiche mit Hilfe einer Insektennadel zu simulieren und im Anschluss morphologische Reaktionen in der Rinde und im Holz aufzuzeigen. Beobachtete Abwehrreaktionen waren verdickte Zellwände, Einlagerungen von Gerbstoffen und die Ausbildung von nekrotischem Gewebe. Die entscheidende Veränderung in der Rinde waren Nekrosen, die in den meisten Fällen nur mikroskopisch sichtbar wurden. Die Nekrosen konnten erfolgreich durch Wundgewebe ausgeheilt werden. Im Falle einer erfolglosen Ausheilung der Nekrosen drangen sie weiter ins Innere des Stammes vor und konnten das Kambium infizieren und dort nekrotische Gewebebildung auslösen. Letztendlich wurde das Holz nekrotisch betroffen und die Bildung des Holzes zeigte dann Anomalien. Dem Sekundärbefall durch holzersetzen Pathogene lagen so optimale Bedingungen vor. Jedoch zeigte jeder Baum eine unterschiedliche Befallsgrenze. Es ist zu vermuten, dass die Intensität und Dauer des Stressimpulses als auch die individuelle Fitness des Baumes ausschlaggebend waren, ob er infiziert wurde oder resistent blieb.

Da von der Praxis vermutet wurde, dass die beobachteten Holzanomalien auf feine Haarrisse zurückzuführen sein könnten, die durch Frostereignisse erzeugt wurden, wurden Buchen lokal auf der Rinde einem plötzlichen Froststress ausgesetzt. Nach dieser Behandlung zeigten sich verbräunte Zellen in der Rinde. Das Kambium zeigte ebenfalls Verbräunungen. Sowohl in der Rinde als auch im Holz konnten nach Frosteinwirkung Polyphenoleinlagerungen

nachgewiesen werden. Aus den Voruntersuchungen konnte gezeigt werden, dass sich die morphologischen Abwehrreaktionen in der Rinde und im Holz der *Trypodendron* befallenen Buchen anders äussern als bei dem Frostversuch. Somit kann Frost als Ursache für die Holzanomalien ausgeschieden werden.

Neben den morphologischen Veränderungen in Rinde und Holz wurden mögliche Veränderungen im Sekundärstoffwechsel untersucht. In der Rinde der befallenen und nicht befallenen Buchen zeigten die Gesamtgehalte an löslichen und zellwandgebundenen phenolischen Inhaltsstoffen eine hohe individuelle Variabilität. Signifikante Veränderungen wurden nicht erkannt, möglicherweise auch deshalb nicht, weil auch die als unbefallen eingestuften Buchen im Holz Veränderungen zeigten, die auf eine Abwehr hinwiesen.

Die Untersuchungen der löslichen und zellwandgebundenen phenolischen Inhaltsstoffe im Jahresverlauf an nicht beschädigten Buchenrinden unterstützten das breite Variationsspektrum der Gesamtgehalte in der Rinde des Paarversuches. Die einzelnen Gehalte ergaben kein homogenes Bild. Im Jahresgang waren keine signifikanten Veränderungen in den Gesamtphenolgehalten zu beobachten.

HPLC-Analysen der phenolischen Inhaltsstoffe in Buchenrinde zeigten keine quantitativen, aber qualitative Veränderungen im Muster einzelner Phenolsäuren. So konnte eine Akkumulation von Catechin in geschädigten Buchen gegenüber den Kontrollen beobachtet werden.

Insgesamt reagierten die Buchen individuell sehr unterschiedlich im Sekundärmetabolismus. Dies hing vermutlich von der jeweiligen Fitness ab.

Auf Genexpressionsebene konnten ebenfalls hohe Abwehrreaktionen festgestellt werden. Quantitative Realtime PCR Untersuchungen ergaben, dass *Trypodendron* befallenes Rindenmaterial eine erhöhte Induktion des *PRI* Gens und des *ACS2* Gens zeigte. *PRI* ist das pflanzliche Stressgen, welches bei Pathogenbefall in den meisten höheren Pflanzen ein Beweis für erhöhte Abwehrreaktionen in der Pflanze ist. *ACS2* ist an der Ethylenbildung beteiligt.

Mittels Microarray Analysen an Buchenrinde wurde gezeigt, dass von insgesamt 1139 Gensequenzen zwei ACC Oxdasen auf Transkriptionsebene heraufreguliert wurden und zwei weitere Gene, ein Aldolasegen und ein noch nicht näher identifiziertes Gen, reprimiert wurden. Diese beobachteten Veränderungen in der Genexpression in der Rinde fielen erwartungsgemäß gering aus. Das unterstützt die eigentliche Funktion der Rinde als

Schutzorgan. Die abwehrbedingten Veränderungen in der Genexpression zeigen sich intensiver in Blattorganen.

Die hier durchgeführten Analysen konnten nur langfristig nachwirkende Effekte des Abwehrverhaltens der Buche herausfiltern, da die untersuchten Rinden- und Holzproben keinen akuten *Trypodendron* Befall zeigten.

6. Literaturverzeichnis

- ALT D. UND SCHMIDLE A. (1980): Untersuchungen über mögliche Resistenzfaktoren des Apfels gegen *Phytophthora cactorum* (Leb. et Cohn) Schroet. Angewandte Botanik 54:139-156
- BAUER F. UND ZIMMERMANN G. (1963): Der Wald in Zahlen von A – Z, Bayr. Landwirtschaftsverlag GmbH, München
- BENTLEY R. (1990): The shikimate pathway – a metabolic tree with many branches. Crit Rev Biochem Mol Biol 25, 307–384
- BETZ G. A. (2005): Regulation des Shikimatstoffwechsels der europäischen Buche (*Fagus sylvatica* L.) unter dem Einfluß von Ozon. Dissertation, München
- BLASCHKE M. (2005): Die Buchenkomplex-Krankheit – Mythos oder Realität? LWF aktuell Nr. 49, 13-15
- BLEECKER A.B. UND KENDE H. (2000): Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. Annu Rev Cell Dev Biol 16: 1-18
- BORS W. (2004): Radikalfangende Wirkung von Pflanzeninhaltsstoffen. GSF – Wir über uns. Jahresbericht 2004. 55–60
- BRAUN H. J. (1976): Das Rindensterben der Buche, *Fagus sylvatica* L., verursacht durch die Buchenwollschildlaus *Cryptococcus fagi* Bär. I. Die Anatomie der Buchenrinde als Basis Ursache. Eur J For Path 6: 136-146
- BRAUN H. J. (1977): Das Rindensterben der Buche, *Fagus sylvatica* L., verursacht durch die Buchenwollschildlaus *Cryptococcus fagi* Bär. II. Ablauf der Krankheit. Eur J For Path 7: 76-93

- BROWN K. A., CARPENTER E. P., WATSON K. A., COGGINS J. R., HAWKINS A. R., KOCH M. H. J. UND SVERGUN D. I. (2003): Twists and turns: a tale of two shikimate-pathway enzymes. *Biochem Soc Trans* 31, 543–547
- CHALLICE J. S. UND WILLIAMS A. H. (1970): A comparative biochemical study of phenolase specificity in *Malus*, *Pyrus* and other plants. *Phytochemistry* 9: 1261-1269
- CHANG S., PURYEAR J. UND CAIRNEY J. (1993): A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol Biol Rep* 11: 113-116
- COUTTS M. P. (1977): The formation of dry zones in the sapwood of conifers. II. The role of living cells in the release of water. *European Journal of Forest Pathology* 7, 6–12
- DELB H. (2001): Rinden- und holzbrütende Käfer im Zusammenhang mit der Buchenkomplexkrankheit. Kurzfassung eines Vortrags anlässlich eines Symposiums zur Buchenkomplexkrankheit in Prüm
- DETZ W. (1996): Buchenwälder im Zielkatalog der Forstwirtschaft. In: ABS C. (Hrsg.) Stiftung Wald in Not (Band 8) Buchenwälder – Ihr Schutz und ihre Nutzung, Bonn, 2-8
- EHRlich J. (1934): The beech bark disease. A nectria disease of *Fagus*, following *Cryptococcus fagi* (BÄR.). *Canadian Journal of Research* 10: 593-692
- ELLENBERG H. (1978): Vegetation Mitteleuropas mit den Alpen. Ulmer, Stuttgart, 982 pp.
- ELSTNER E. F., OBWALD W., VOLPERT R. UND SCHEMP H. (1994): Phenolic antioxidants. *Acta Horticulturae – Natural phenols in plant resistance* 381, 304–335
- ELSTNER E. F., OBWALD W. UND SCHNEIDER I. (1996): Phytopathologie: Allgemeine und Biochemische Grundlagen. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- FEUCHT W., TREUTTER D. UND CHRIST E. (1997): Role of flavanols in yellowing beech trees of the Black Forest. *Tree Physiology* 17, 335–340

- FORKMANN G. (1993): Genetics of flavonoids. In: HARBORNE J. B. (Hrsg.) The Flavonoids: Advances in Research Since 1986, Chapman and Hall, London, 537-564
- FORKMANN G. UND HELLER W. (1999): Biosynthesis of flavonoids. In: Comprehensive Natural Products Chemistry, Vol. 1. Hrsg.: BARTON D., NAKANISHI K.. Elsevier Verlag, Amsterdam
- FRIEND J. (1985): Phenolic substances in plant disease. In: VAN SUMERE C. F. UND LEA P. J. (Hrsg.) Annu Proc Phytochem Soc Europe (Vol. 25), Calderon Press, Oxford, 367-393
- GÄUMANN E. (1935): Der Stoffhaushalt der Buche (*Fagus sylvatica* L.) im Laufe eines Jahres. Bern
- GOLDSTEIN J. L. UND SWAIN T. (1965): The inhibition of enzymes by tannins. *Phytochemistry* 4: 185-192
- GROVE D. S. (1999): Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction for the Core Facility Using TaqMan and the Perkin-Elmer/Applied Biosystems Division 7700 Sequence Detector. The Association of Biomolecular Resource Facilities, Life Science Consortium, Pennsylvania
- HABERMANN M. (2001): Praxisinformation Buchensterben. Niedersächsische Landesforstverwaltung, Online News vom 11.10. 2001
- HÄRTLING S. UND SCHULZ H. (1998): Biochemical parameters as biomarkers for the early recognition of environmental pollution in Scots pine trees. I. Phenolic compounds. *Z. Naturforsch.* 53c, 331-340
- HAGERMANN A.E. UND BUTLER L.G. (1981): The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *Journal of Biological Chemistry* 259 (9): 4494 - 4497
- HAHLBROCK K. UND SCHEEL D. (1989): Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 40, 347-369

- HAPPACH-KUSAN et al. (2004): Antrag für bessere Rahmenbedingungen für die Charta für Holz, Drucksache 15/4431. Dt. Bundestag 15. Wahlperiode
- HARBORNE J. B. (1980): Plant Phenolics. In: BELL E. A. UND CHARLWOOD B. V. (Hrsg.) Secondary Plant Products (Vol. 8), Springer Verlag, Berlin, 329-402
- HARBORNE J. B. (1993): Introduction to ecological biochemistry, 4th edn. Academic Press, London
- HARPER J. L. (1989): The value of a leaf. *Oecologia*. 80, 53–58
- HARTIG R. (1878): Die krebsartigen Krankheiten der Rotbuche. *Z. Forst- u. Jagdwesen* 9: 377-383
- HASLAM E. (1993): Shikimic Acid: Metabolism and Metabolites. In: John Wiley & Sons, Chichester, United Kingdom
- HECKER U. (1995): BLV Bestimmungsbuch. Bäume und Sträucher. BLV Verlagsgesellschaft mbH, München
- HEID C. A., STEVENS J., LIVAK K. J., WILLIAMS P. M. (1996): Real-time quantitative PCR. *Genome Res* 6: 986-994
- HEITFUSS R. (1997): General principles of host-parasite interactions. In: HARTLEB H., HEITFUSS R., HOPPE H.-H. (Hrsg.) Resistance of crop plants against fungi. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart, Lübeck, Ulm, 19-32
- HELDT H. W. (1996): Pflanzenbiochemie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- HERRMANN K. M. (1995): The shikimate pathway: early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *Plant Cell* 7, 907–919
- HOUSTON D. R. & O'BRIEN J. T. (1998): Beech Bark Disease. Forest Insect & Disease Leaflet 75, U.S. Department of Agriculture Forest Service, Durham N.H.

- HUART O. UND RONDEUX J. (2003): Le point sur la maladie du hêtre en Wallonie. Forêt. Wallonne 64: 3-16
- HUTZSCHENREUTHER P. UND BRUMMER H. (1984): Embedding, cutting and grinding methods to produce undecalcified cortical bone sections over the whole bone. Acta anat 118 (4): 201-204
- JENSEN R. A. (1985): The shikimate/arogenate pathway: link between carbohydrate metabolism and secondary metabolism. Physiol Plant 66, 164–168
- JOHANSEN D. A. (1940): Plant microtechnique. First edition, 5th impr, McGraw – Hill, New York
- JUNGHANS U., LANGENFELD-HEYSER R., POLLE A. UND TEICHMANN T. (2004): Effect of auxin transport inhibitors and ethylene on the wood anatomy of poplar. Plant Biol 6: 22-29
- KAFFARNIK F. (2001): Hydroxycinnamyl-Transferasen für UV-B-Schutzpigmente in der Kiefer, *Pinus sylvestris* L..Dissertation, München
- KEITH B., DONG X., AUSUBEL F. M. UND FINK G. R. (1991): Differential induction of 3-deoxy-D-arabinose-heptulosonate 7-phosphate synthase genes in *Arabidopsis thaliana* by wounding and pathogenic attack. Proc Nat Acad Sci USA 88, 8821-8825
- KEMMERLING B. (2001): Identifizierung und Charakterisierung systemisch responsiver Gene der Kartoffel (*Solanum tuberosum* L.) nach Inokulation mit dem nichtpathogenen Bakterium *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*. Dissertation, Halle-Wittenberg
- KENDE H. (1993): Ethylene biosynthesis. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 44: 283-307
- KLESSIG D. F. UND MALAMY J. (1994): The salicylic acid signal in plants. Plant Molecular Biology 26, 1439–1458
- KNAGGS A. R. (2003): The biosynthesis og shikimate metabolites. Nat Prod Rep 20, 119–136

- KÖLLING C., WALENTOWSKI H. UND BORCHERT H. (2005): Die Buche in Mitteleuropa. AFZ-Der Wald 13: 696-701
- KRÜSSMANN G. (1977): Handbuch der Laubgehölze, Bd. 2. Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg
- KUNKEL H. (1968): Untersuchungen über die Buchenwollschildlaus *Cryptococcus fagi* Bär. (*Insecta, Coccina*), einen Vertreter der Rindenparenchymsauger. Z. ang. Ent. 61, 373–380
- LANGEBARTELS C., ERNST D., HELLER W., LÜTZ C., PAYER H. D. UND SANDERMANN H. (1997): Ozone responses of trees. Results from controlled chamber exposures at the GSF phytotron. In: SANDERMANN H., WELLBURN A. R., HEATH R. L. (Hrsg.) Forest Decline and Ozone: A Comparison of Controlled Chamber and Field Experiments, Vol 127, Springer, Berlin
- LANGEBARTELS C., ERNST D., KANGASJÄRVI J. UND SANDERMANN H. (2002): Ozone effects on plant defense. Meth Enzymol 319, 520–535
- LANGENFELD-HEYSER R., LANG C., FIEBELKORN G. UND POLLE A. (2003): Untersuchungen zum Stehendbefall scheinbar vitaler Buchen durch Holzbrüter. Projektbericht 2003, Göttingen
- LANGENFELD-HEYSER R., LANG C., FIEBELKORN G., OVERBECK E. UND POLLE A. (2004): Untersuchungen zur Rindenanatomie und –physiologie der Buche. Projektbericht 2004. Göttingen 6/2004
- LANGENFELD-HEYSER R., LANG C., FRITZ E., PETERCORD R. UND POLLE A. (2005): Stehendbefall von *Fagus sylvatica* L. mit *Trypodendron* – anatomische Untersuchungen. Mitteilungen aus der Forschungsanstalt für Waldökologie und Forstwirtschaft Rheinland-Pfalz Nr. 59/06 (in Druck)

- LAPLAZE L., GHERBI H., FRUTZ T., PAWLOWSKI K., FRANCHE C., MACHEIX J.-J., AUGUY F., BOGUSZ D. UND DUHOUX E. (1999): Flavan-Containing Cells Delimit *Frankia*-Infected Compartments in *Casuarina glauca* Nodules. *Plant Physiology* 121: 113-122
- LAVOLA A. UND JULKUNEN-TIITO R. (1994): The effect of elevated carbon dioxide fertilization on primary and secondary metabolites in birch, *Betula pendula* (Roth.). *Oecologia* 99, 315–321
- LAWTON K., FRIEDRICH L., HUNT M., WEYMANN K., STAUB T., KESSMANN H. UND RYALS J. (1996): Benzothiadiazole induces disease resistance in *Arabidopsis* by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. *Plant J* 10, 71–82
- LEUSCHNER C. (1998): Mechanismen der Konkurrenzüberlegenheit der Rotbuche. *Ber. Rheinh.-Tüxen-Ges.* 10: 5-18
- LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. J., FARR A. L. UND RANDALL R. J. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-75
- MALECK K. UND DIETRICH R. A. (1999): Defense on multiple fronts: how do plants cope with diverse enemies? *Trends Plant Sci* 4: 215-219
- MATILE P. (1984): Das toxische Kompartiment der Pflanzenzelle. *Naturwissenschaften* 71, 18–24
- MCCUE K. F. UND CONN E. E. (1989): Induction of 3-deoxy-D-*arabinose*-heptulosonate 7-phosphate synthase activity by fungal elicitor in cultures of *Petroselinum crispum*. *Proc Nat Acad Sci USA* 86, 7374–7377
- MICHELIS R. AND GEPSTEIN S. (2000): Identification and characterization of a heat-induced isoform of aldolase in oat chloroplast. *Plant Mol Biol* 44: 487-498
- MOEDER W., BARRY C. S., TAURIATINEN A., BETZ C., TUOMAINEN J., UTRIAINEN M., GRIERSON D., SANDERMANN H., LANGEBAEELS C. UND KANGASJÄRVI J. (2002): Ethylene synthesis regulated by bi-phasic induction of 1-aminocyclopropane-1-

- carboxylic acid synthase and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase genes is required for H₂O₂ accumulation and cell death in ozone-exposed tomato. *Plant Physiol.* 130, 1918–1926
- MORNAU M. UND TREUTTER D. (2003): Veränderte Wundreaktion in der Apfelrinde durch *Phytophthora*-Exsudate. *Gesunde Pflanzen* 55 (4): 98–104
- MORNAU M. (2004): Beteiligung von Phenylpropanoiden der Apfelrinde an der Wirt-Parasit-Interaktion von *Malus domestica* (Borkh.) und *Phytophthora cactorum* (Lebert & Cohn) Schröter unter veränderter Ressourcenverfügbarkeit. Dissertation, München
- MOSER K. (2002): Aktuelle Probleme des Forstschutzes, Skript, Zürich
- MUZIKA R.M. UND PREGITZER K.S. (1992): Effect of nitrogen fertilization on leaf phenolic production of grand fir seedlings. *Trees - Structure and Function* 6: 241-244
- NIESAR C. M. (2001): Situationsanalyse der aktuellen Buchenerkrankung in NRW. Landwirtschaftskammer Rheinland, Bonn
- NIESAR C. M. (2003): Dem Buchenleiden auf der Spur. *Landwirtschaftliches Wochenblatt* 22: 50 f.
- NUNN A. J. (2005): Risiko-Einschätzung der chronisch erhöhten Ozonbelastung mittels `Free-Air`-Begasung von Buchen (*Fagus sylvatica*) und Fichten (*Picea abies*) eines forstlich begründeten Mischbestandes. Dissertation, München
- O'BRIEN T. P., FEDER N. UND MCCULLY M. E. (1964): Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. *Protoplasma* 59: 367-373
- OLBRICH M., BETZ G., GERSTNER E., LANGEBARTELS C., SANDERMANN H. UND ERNST D. (2005): Transcriptome Analysis of Ozone-Responsive Genes in Leaves of European Beech (*Fagus sylvatica* L.). *Plant Biol.* 7: 670-676

- PETERCORD R. (1999): Entwicklung bewirtschafteter Buchen-Edellaubholz-Mischbestände unter dem Einfluß der Buchenwollschildlaus (*Cryptococcus fagisuga* Lind.) unter besonderer Berücksichtigung physiologischer und genetischer Aspekte. Dissertation, Hainholz Verlag, Göttingen
- PETERCORD R. (2001): Die Buchenwollschildlaus als Auslöser des Buchensterbens. Kurzfassung eines Vortrages anlässlich eines Symposiums zur Buchenkomplexkrankheit am 16. und 17. August 2001 in Prüm (<http://www.interreg-buche.de>)
- PETERCORD R. (2002): Vorbereitende Untersuchungen zu einer ökonomischen Bewertung der Folgen eines Befalls von Buchen durch holzbrütende Insekten. Abschlußbericht zu einer Forschungsvorhaben der FAWF
- PETERCORD R. (2003): Schadenstypbeschreibung zur Buchenerkrankung in Rheinland-Pfalz und Luxemburg. Interner Bericht
- PETERS J. (2001): Isolierung und Charakterisierung pathogen- und streßinduzierter Gene von Kartoffel *Solanum tuberosum* L.. Dissertation, Halle/Wittenberg
- POLLE A., LANGENFELD-HEYSER R., LANG C. UND OLBRICH A. (2005): Anatomische Untersuchungen zur Entstehung von Weichbastnekrosen, Holzstrahlproliferationen und Manganflecken in geschädigtem Buchenholz. Bericht DeLux Antrag 2004/2005, Forstliche Forschung C2/04 im Rahmen des Interreg IIIa-Projekts „Entwicklung von Strategien zur Sicherung von Buchenwäldern in der Programmregion deLux“
- PRITCHARD S., PETERSON C., RUNION G.B., PRIOR S. UND ROGERS H. (1997): Atmospheric CO₂ concentration, N availability and water status affect patterns of ergastic substance deposition in longleaf pine (*Pinus palustris* Mill.) foliage. *Trees* 11: 494-503
- ROLOFF A. (1996): Die Buche und ihre Gefährdung durch anthropogene Umwelteinflüsse. In: ABS C. (Hrsg.) Stiftung Wald in Not (Band 8) Buchenwälder – Ihr Schutz und ihre Nutzung, Bonn, 31–43

- SALUNKHE D. K., CHAVAN J. K. UND KADAM S. S. (1990): Dietary tannins: consequences and remedies. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida, 131
- SCHALLER A. (2002): Die Abwehr von Fressfeinden: Selbstverteidigung im Pflanzenreich. Vierteljahrsschrift der Naturforschenden Gesellschaft in Zürich 147/4: 141–151
- SCHMIDT O. (2000): Bauminfoblatt "Die Buche" Nr. 1. Schutzgemeinschaft Deutscher Wald e.V. (Hrsg.), Bonn
- SCHNEPF E. (1973): Mikrotubulus-Anordnung und –Umordnung, Bandbildung und Zellmorphogenese in jungen *Sphagnum*-Blättchen. Protoplasma 78, 145–173. Springer, Wien
- SCHOPFER P. UND BRENNICKE A. (1999): Pflanzenphysiologie, Springer Verlag Berlin
- SCHÜTT P. UND LANG K. J. (1979): Buchen-Rindennekrose. Waldschutz-Merkblatt 1, Verlag P. Parey, Hamburg & Berlin
- SCHÜTT P., DCHUCK H. J. UND STIMM B. (1992): Lexikon der Forstbotanik: Baum- und Straucharten, Waldpflanzen, Mikroorganismen, Ökosysteme. Ecomed. Landsberg/Lech
- SCHÜTZENDÜBEL A. (2000): Physiologische Reaktionen auf Cd^{2+} Streß in nichtmykorrhizierten und mykorrhizierten Wurzeln von Kiefern (*Pinus sylvestris* L.), sowie den mykorrhizabildenden Basidiomyceten *Paxillus involutus* und *Suillus bovinus*. Cuvillier Verlag, Göttingen
- SCHWERDTFEGER F. (1957): Die Waldkrankheiten. Ein Lehrbuch der Forstpathologie und des Forstschutzes. 2. Auflage, Verlag Paul Parey, Hamburg und Berlin
- SCHWINN F. J. (1965): Untersuchungen zum Wirt-Parasit-Verhältnis bei Kragenfäule des Apfelbaumes (*Phytophthora cactorum*) und zu ihrer Bekämpfung. I. Versuche zur Frage der Wundinfektion und zur Grundlage der Sortenresistenz. Phytopathologische Zeitschrift 54: 1–30

- SEEGMÜLLER S. (2003): Schäden an stehendem Buchen-Stammholz. *AFZ-Der Wald* 4: 204-206
- SIMONS S. (1993): Biochemische Effekte und Symptomentwicklung bei Buchen (*Fagus sylvatica* L.) und Nadelgehölzen unter realen und proportional erhöhten Ozonkonzentrationen. Dissertation, München
- STOCKINGER E. J., GILMOUR S. J. UND THOMASHOW M. F. (1997): *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 94 (3): 1035–1040
- TAIZ L. UND ZEIGER E. (2000): *Physiologie der Pflanzen*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- WACHENDORF C., IRMLER U. UND BLUME H.-P. (1997): Relationships between litter fauna and chemical changes of litter during decomposition under different moisture conditions. In: CADISCH G. UND GILLER K. E. (Hrsg.). *Driven by nature – Plant litter quality and decomposition*. CAB International , Oxon, New York
- WEAVER L. M. UND HERRMANN K. M. (1997): Dynamics of the shikimate pathway in plants. *Trends Plant Sci* 2, 346–351
- WEISS M., MIKOLAJEWSKI S., PEIPP H., SCHMITT U., SCHMIDT J., WRAY V. UND STRACK D. (1997): Tissue-specific and development-dependent accumulation of phenylpropanoids in larch mycorrhizas. *Plant Physiology* 114: 15–27
- WINK M. (1999): Plant secondary metabolites: biochemistry, function and biotechnology. In: *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism, Annual Plant Reviews* (ed. WINK M.), Vol 2, 1-16, Academic Press Sheffield, UK

XIE D.-Y., SHARMA S. B., PAIVA N. L., FERREIRA D. UND DIXON R. A. (2003): Role of anthocyanidin reductase, encoded by BANYLUS in plant flavonoid biosynthesis. *Science* 299: 396 – 399

YANG S. F. (1989): Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in relation to ethylene biosynthesis. In: *Plant Nitrogen Metabolism* (Hrsg.) POULTON J. E., ROMEO J. T., CONN E. E., *Rec Adv Phytochem* Vol. 23, Plenum Press, New York, pp. 263-287

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

- Abb. 1.1 Verbreitungskarte von *Fagus sylvatica* L. (aus: BAUER & ZIMMERMANN (1963): Der Wald in Zahlen. München).
- Abb. 1.2 Entstehung einer Rindennekrose unter einer Lenticelle im Querschnitt einer *Trypodendron* befallenen Buche (**A**) und im Vergleich im Querschnitt einer als nicht befallenen eingestufteten Buche (**B**) (aus: LANGENFELD-HEYSER et al. 2004).
- Abb. 1.3 Mehrjährige Strahlproliferation im Holzquerschnitt einer *Trypodendron* befallenen Buche mit wellenförmigen Jahrringen (Pfeil) (aus: LANGENFELD-HEYSER et al. 2004).
- Abb. 1.4 ungefärbter Holzquerschnitt einer *Trypodendron* befallenen Buche mit dunkel gefärbten phenolhaltigen Xylemzellen (blauer Pfeil) und großlumiger parenchymatischer Zellen mit phenolhaltigen Zellwänden mit Thyllen und dunkel erscheinenden Gerbstoffeinlagerungen (schwarze Pfeile) (aus: LANGENFELD-HEYSER et al. 2004).
- Abb. 1.5 Chemische Struktur von Kaffeesäure.
- Abb. 1.6 Überblick des Shikimatstoffwechselwegs (modifiziert nach HELDT 1996).
- Abb. 2.1 Versuchsaufbau der Froststress-Simulation.
- Abb. 2.2 Catechin-Messreihe als Referenz für die photometrische Bestimmung der löslichen phenolischen Inhaltsstoffe aus Buchenrinde und –holz.
- Abb. 2.3 ρ -Cumarsäure-Messreihe als Referenz für die photometrische Bestimmung der zellwandgebundenen phenolischen Inhaltsstoffe aus Buchenrinde und –holz.
- Abb. 3.1 Rindenbeschaffenheit, links: gewöhnliche Buchenrinde aus einem Bestand ohne Schädigungen des FA Halberstadt, rechts: zerklüftete Rinde aus dem Bestand des FA Hochwald *Trypodendron* befallener Buchen.
- Abb. 3.2 Querschnittsübersicht der Rinde und des Holzes eines Buchenastes nach Frostbehandlung (Toluidinblau gefärbt). **A**: Frostbehandlung mit verbräuntem Kambium und verbräunten Strahlen. Am Rande des leitenden Phloems befindet sich ein anomaler Sklerenchymring und eine Parenchymproliferation im nicht leitenden sekundärem Phloem. **B**: Kontrolle mit einer Reihe großlumiger Siebröhren im Bereich des Kambiums.

- Abb. 3.3 Querschnitt aus der Region der primären Rinde eines Buchenastes nach Frostbehandlung (Toluidinblau gefärbt). **A:** Kältegestresster Buchenast mit verbräunten Zellen in der primären Rinde. **B:** Sklerenchymband an der Grenze von primärer Rinde und sekundärem Phloem eines Buchenastes nach Frostbehandlung und verbräunte Zellen in der primären Rinde.
- Abb. 3.4 Ausschnitt aus Abb. 3.3 B unter dem Fluoreszenzmikroskop. Polyphenolhervorhebung. Der Sklerenchymring zeigt eine starke Autofluoreszenz, ebenso wie die Wände der dickwandigen Zellen der primären Rinde und das Phellem.
- Abb. 3.5 Querschnitt aus der Region des sekundären Phloems mit anomalem Sklerenchymring an der Grenze von nicht leitendem zu leitendem sekundären Phloem eines Buchenastes nach Frostbehandlung. **A:** Toluidinblau gefärbter Querschnitt. **B:** Autofluoreszenz der Polyphenole. Neben dem anomalen Band von Sklerenchymzellen mit starker Polyphenolautofluoreszenz an der inneren Grenze des sekundären Phloems kann man im nicht leitenden Phloem außerhalb der Strahlen verdickte Zellwände mit erhöhtem Polyphenolgehalt erkennen.
- Abb. 3.6 Querschnitt der Region aus dem jüngsten sekundären Phloem, Kambium und jüngsten sekundären Xylem an der Peripherie der Frostbehandlung. **A:** Toluidinblau gefärbter Querschnitt. Kambium und Strahlen zeigen Verbräunungen. Das jüngste Phloem ist weitgehend parenchymatisch. **B:** Autofluoreszenz der Polyphenole. Es zeigt einen schwachen Polyphenolgehalt in den Zellwänden.
- Abb. 3.7 Querschnitt aus der Region des jüngsten sekundären Phloems, Kambiums und jüngsten sekundären Xylems im Bereich der Frostbehandlung (Toluidinblau gefärbt). **A:** Das jüngste Phloem gleicht im Bau einer Kontrolle. Die Strahlen zeigen noch leichte Verbräunungen. **B:** Kontrolle. Das Strahlparenchym zeigt Verbräunungen durch Gerbstoffe.
- Abb. 3.8 Autofluoreszenz der Polyphenole in den Zellen eines Querschnitts der Region aus dem jüngsten sekundären Phloem, Kambium und jüngsten sekundären Xylem **A:** Querschnitt aus dem Zentrum der Frostbehandlung. Aufbau des jüngsten Xylems. **B:** Querschnittsauschnitt aus der Peripherie der Frostbehandlung. Das jüngste Xylem gleicht im Bau im wesentlichen einer Kontrolle.

- Abb. 3.9 Ausschnitt aus dem Beginn des jüngsten sekundären Xylems im Querschnitt mit Übergang zum Spätholz des Vorjahres (links im Bild). Toluidinblau gefärbt. Das nach Frosteinwirkung im Spätherbst gebildete sekundäre Xylem zeigt ein breites Band parenchymatischer Zellen mit wenigen kleinlumigen Gefäßen. Die Wände von Fasern und Gefäßen des letztjährigen Xylems zeigen im Spätholz eine verstärkte Einlagerung von Polyphenolen.
- Abb. 3.10 ungefärbter Querschnitt von Rinde und Holz eines Buchenastes mit Stichverletzungen. Deutliche Löcher sind zu erkennen. Eine T-förmige braune Zone ist im jüngsten Holz im Einstichszentrum der Insektennadel zu sehen.
- Abb. 3.11 Querschnitt von Rinde und Holz einer Buchenastes mit Stichverletzungen. **A:** Eine T-förmige braune Zone ist im jüngsten Holz im Einstichszentrum zu sehen. Links davon sieht man eine keilförmige Zone im jüngsten Holz, in der die Wundwirkung des Nadelstiches mit Entfernung von der Einstichstelle geringer wird (ungefärbt). **B:** Toluidinblau gefärbter Querschnitt im peripherem Bereich des Nadeleinstichs. Deutlich grün gefärbt ist das proliferierte Parenchym der Rinde, das parenchymatische Zentrum im jüngsten Holz und der verthyllte Bereich im Holz des Vorjahres.
- Abb. 3.12 Querschnitt der nahen Peripherie eines Nadeleinstichs eines Buchenastes nach Stichverletzung. **A:** Toluidinblau gefärbter Querschnitt. Rechts: V-förmige Einbuchtung der äußeren Rinde, die durch ein polyphenolhaltiges Wundperiderm gegen die Innenrinde abgeschottet ist. Mittig: proliferiertes Parenchym. Links: V-förmiges nach außen gerichtetes Kambium als breiteres beige-farbenes Band. In der Nähe des Einstichzentrums wird xylemseits vom Kambium Parenchym gebildet (grüne Anfärbung des Zellinhaltes) **B:** Autofluoreszenz der Polyphenole. Die Zellwände zeigen Polyphenole.
- Abb. 3.13 Toluidinblau gefärbter Querschnitt von der Grenze des letztjährigen Xylems zum jüngsten Phloem im Zentrum des Einstichbereichs mit kleinlumigen Siebröhren.
- Abb. 3.14 Querschnitt eines Buchenastes aus der Region des Überganges von Spät- und Frühholz. **A:** Phloroglucin gefärbter Querschnitt mit T-förmiger Struktur im Zentrum der Stichverletzung, im nach dem Einstich gebildeten Xylem. Das jüngste Xylem besteht aus isodiametrischen Zellen rings um den Einstichkanal **B:** Autofluoreszenz der Polyphenole. Die isodiametrischen Zellen lagern Polyphenole in die Zellwände ein.

- Abb. 3.15 Querschnitt des jüngsten und letztjährigen Xylems nahe des Zentrums der Stichverletzung. **A:** Toluidinblau gefärbter Querschnitt mit proliferiertem Parenchym rings um den überwallenden Einstich und Verthyllungen im Einstichsbereich. **B:** Autofluoreszenz der Polyphenole.
- Abb. 3.16 Gesamtgehalte an löslichen phenolischen Inhaltsstoffen aus Rindenproben des Paarversuchs. Rot: *Trypodendron* befallene Buchen, schwarz: nicht befallen eingestufte Buchen.
- Abb. 3.17 Gesamtgehalte an zellwandgebundenen phenolischen Inhaltsstoffen aus Rindenproben des Paarversuchs. Rot: *Trypodendron* befallene Buchen, schwarz: nicht befallen eingestufte Buchen.
- Abb. 3.18 Anteil lebender Rinde zu abgestorbener Rinde (Phellem/Borke). Blau: prozentualer Anteil der abgestorbenen Rinde, violett: prozentualer Anteil der lebenden Rinde.
- Abb. 3.19 Gesamtgehalte löslicher phenolischer Inhaltsstoffe geschädigter Rindenproben. Rot: geschädigte Proben, schwarz: als Referenz Kontrollproben.
- Abb. 3.20 Gesamtgehalte zellwandgebundener phenolischer Inhaltsstoffe geschädigter Rindenproben. Rot: geschädigte Proben, schwarz: als Referenz Kontrollproben.
- Abb. 3.21 Gesamtgehalte löslicher phenolischer Verbindungen aus Rindenproben ohne Schädigungen aus drei verschiedenen Standorten. Die ersten Proben sind aus Halberstadt, die darauffolgenden 10 Proben aus Reinhausen (beides Kalkstandorte) und die letzten 12 Proben entstammen aus dem Paarversuch (Gegenstück ohne sichtbare Schädigungen).
- Abb. 3.22 Gesamtgehalte zellwandgebundener phenolischer Verbindungen aus Rindenproben ohne Schädigungen aus drei verschiedenen Standorten. Die ersten Proben sind aus Halberstadt, die darauffolgenden 10 Proben aus Reinhausen (beides Kalkstandorte) und die letzten 12 Proben entstammen aus dem Paarversuch (Gegenstück ohne sichtbare Schädigungen).
- Abb. 3.23 Jahreszeitliche Variationen im Gesamtgehalt löslicher phenolischer Inhaltsstoffe in der Rinde gesunder Buchen. Probennahme war von Mai (1. Probe) bis September (letzte Probe).

- Abb. 3.24 Jahreszeitliche Variationen im Gesamtgehalt zellwandgebundener phenolischer Inhaltsstoffe in der Rinde gesunder Buchen. Probennahme war von Mai (1. Probe) bis September (letzte Probe).
- Abb. 3.25 Gesamtgehalte löslicher phenolischer Inhaltsstoffe in Holzproben aus dem Paarversuch. Blau: *Trypodendron* befallene Holzproben, rot: gesund eingestufte Holzproben.
- Abb. 3.26 Gesamtgehalte zellwandgebundener phenolischer Inhaltsstoffe in Holzproben aus dem Paarversuch. Blau: *Trypodendron* befallene Holzproben, rot: gesund eingestufte Holzproben.
- Abb. 3.27 Jahreszeitliche Variationen im Gesamtgehalt löslicher phenolischer Inhaltsstoffe im Holz gesunder Buchen. Probennahme war von Mai (1. Probe) bis September (letzte Probe).
- Abb. 3.28 Jahreszeitliche Variationen im Gesamtgehalt zellwandgebundener phenolischer Inhaltsstoffe im Holz gesunder Buchen. Probennahme war von Mai (1. Probe) bis September (letzte Probe).
- Abb. 3.29 HPLC-Profil der phenolischen Inhaltsstoffe einer Referenzmischung und eines Extraktes, der aus der Rinde geschädigten Buchen gewonnen wurde.
- Abb. 3.30 Catechin/Epicatechin-Profil einer Referenzmischung und eines Extraktes, der aus der Rinde geschädigter Buchen gewonnen wurde.
- Abb. 3.31 Veränderung der über real-time PCR erfaßten Transkriptmengen in Rindenproben aus geschädigten Bäumen gegenüber denen aus gesunden Bäumen von *Fagus sylvatica* L.
- Abb. 3.32 Ausschnitt eines Array Chips zur Analyse stressinduzierter Gene aus Rindenmaterial geschädigter Buchen. Überlagerung beider Fluoreszenz – Teilbilder (Cy-3 und Cy-5).
- Tab. 1.1 Schadumfang durch die Buchenkomplexkrankheit verursacht in den FÄ Wiltz, Saarburg und Hochwald von 2001 bis 2005 (aus: Projektseite *Interreg-Buche* (www.interreg-buche.de)).
- Tab. 2.1 Witterungsdaten der Region des FA Saarburg. Angegeben sind die jährlichen Mittelwerte der Temperatur, der monatlichen Niederschlagsmenge und der relativen Luftfeuchte bzw. die Mittelwerte der Vegetationsperioden von Mai

bis einschließlich September der Jahre 2002 bis 2005 (Quelle: Deutscher Wetterdienst, Offenbach).

- Tab. 2.2 Witterungsdaten der Region des FA Halberstadt. Angegeben sind die jährlichen Mittelwerte der Temperatur, der monatlichen Niederschlagsmenge und der relativen Luftfeuchte bzw. die Mittelwerte der Vegetationsperioden von Mai bis einschließlich September der Jahre 2002 bis 2005 (Quelle: Deutscher Wetterdienst, Offenbach).
- Tab. 2.3 Witterungsdaten der Region Göttingen. Angegeben sind die jährlichen Mittelwerte der Temperatur, der monatlichen Niederschlagsmenge und der relativen Luftfeuchte bzw. die Mittelwerte der Vegetationsperioden von Mai bis einschließlich September der Jahre 2002 bis 2005 (Quelle: Deutscher Wetterdienst, Offenbach).
- Tab. 2.4 Inkubationsschema zur Paraffineinbettung.
- Tab. 2.5 Programm für die RT-PCR.
- Tab. 3.1 Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzprüfungen (Irrtumswahrscheinlichkeiten, $p \leq 0,05$ = signifikant).
- Tab. 3.2 Vergleich der normalisierten Peakflächen von phenolischen Inhaltsstoffen aus Rindenextrakten. B = befallen; F = frei von Krankheitssymptomen. Zusammengehörende Baumpaare stehen jeweils untereinander (z.B. 163/167; 10/9; etc.)
- Tab. 3.3 Vergleich der normalisierten Peakflächen von (+)-Catechin und (-)-Epicatechin aus Rindenextrakten. B = befallen; F = frei von Krankheitssymptomen, die Proben aus dem Jahresverlauf sind Kontrollen.
- Tab. 3.4 Expressionsfaktoren ausgewählter Enzyme an Rinde Trypodendron befallener Buchen ermittelt durch Micro Array Untersuchungen. Id = Identitätsnummer der Buchenklone.

Danksagung

Prof. Dr. Andrea Polle danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und für ihre Betreuung dieser Arbeit. Die konstruktiven Gespräche, die kompetenten Ratschläge und die nötige Richtungslenkung waren sehr hilfreich. Insbesondere danke ich für die Durchsicht und Korrektur des Manuskripts. Prof. Dr. Christoph Leuschner danke ich für die Übernahme des Korreferats. Dr. Rosemarie Heyser danke ich ganz herzlich für die Einweisung in die histochemischen Methoden und in die Mikroskopie. Ihre Begeisterung für die Welt der Pflanzenanatomie ist ansteckend. Dr. Ralf Petercord von der Forschungsanstalt für Waldökologie und Forstwirtschaft in Trippstadt danke ich für die außerordentlich gute Zusammenarbeit. Durch seine engagierte Mithilfe und Organisation der Probennahmen war ich immer mit ausreichend Material versorgt.

Dr. Dieter Ernst von der GSF in München danke ich für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe Genexpressionsstudien durchzuführen. Maren Olbrich danke ich für die freundliche Einarbeitung in die spannende Microarraytechnik, Dr. Gunter Betz und Evi Bieber für die Hilfe bei den Realtime-Untersuchungen.

Volker Meng und seinem Team danke ich für die Hilfsbereitschaft bei den Versuchen im Forstbotanischen Garten. Christa Lang und Clemens Kurth danke ich für die zuverlässige und gewissenhafte Unterstützung bei der Bearbeitung der anatomischen Analysen. Thomas Klein danke ich ganz besonders für seine geduldige Einweisungen in die RNA Extraktion und die Northern Blot Analyse. Seine vielen Tricks und Kniffs machen den Laboralltag um ein Vielfaches einfacher. Rainer Schulz danke ich für die Betreuung während der HPLC Analysen. Bernd Kopka danke ich für die Lösung technischer Probleme und Waltraud Fahrenbach danke ich für die Hilfe in bürokratischen Angelegenheiten. Allen früheren und jetzigen Mitarbeitern des forstbotanischen Instituts danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die vielen kleinen und großen Hilfen im Laboralltag und den Spaß.

Für die finanziellen Mittel des Landes Rheinland-Pfalz und Luxemburg, die das Interreg III A DeLux – Projekt unterstützten, danke ich den Ländern.

Meinen Freunden, besonders Nina, Barbara und Samanta, sowie meinen Geschwistern Mechthild und Hubertus danke ich dafür, dass sie mir geholfen haben, neben den „Buchen“ anderes Schönes zu sehen. Sie begleiteten mich - jeder auf seine ganz spezielle Weise. Danke dafür. Meinen Eltern danke ich ganz besonders. Sie haben mich die vergangenen Jahre mit all ihren Möglichkeiten unterstützt und gaben mir Halt.

Lebenslauf

Name	Gerlind Fiebelkorn
Geburtsdatum	4. November 1975
Geburtsort	Warstein
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

Aug 1982 – Juli 1986	Kath. Grundschule in Reiste
Aug 1986 – Juli 1995	Gymnasium der Benediktiner in Meschede
Juli 1995	Allgemeine Hochschulreife mit den Schwerpunkten Englisch und Französisch

Wissenschaftlicher Werdegang

Okt 1995 – Febr 2003	Studium der Biologie (Diplom) an der Georg-August-Universität in Göttingen, Schwerpunkt: Botanik
Okt 1997	Vordiplomsprüfung in den Fächern Botanik, Mikrobiologie, Anorganische Chemie und Physikalische Chemie
März 2002 – Febr 2003	Experimentelle Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. R. Tischner im Albrecht-von-Haller-Institut für Pflanzenwissenschaften, AG Allgemeine und molekulare Physiologie mit dem Thema: Untersuchungen zum N-Stoffwechsel und Xylemtransport von Pappeln
Febr 2003	Diplomprüfung in den Fächern Botanik, Mikrobiologie und Humangenetik
seit Mai 2003	Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Institut für Forstbotanik, Abt. Baumphysiologie mit Beginn der experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation unter Anleitung von Prof. Dr. A. Polle

Tätigkeiten

Juli 1996 – Aug 1996

Praktikum in der Landesanstalt für Ökologie,
Bodenordnung und Forsten NRW, Dezernat 41
Forstgenbank

Juli 1998 – Apr 1999

Wissenschaftliche Hilfskraft im Max-Planck-
Institut für biophysikalische Chemie, Abt.
Molekulare Zellbiologie (Prof. Dr. P. Gruss)

Okt 2001 – Juli 2002

Wissenschaftliche Hilfskraft im Albrecht-von-
Haller-Institut (Prof. Dr. R. Tischner)

Sprachkenntnisse

Englisch, Französisch und Norwegisch