

Technische Universität München
Fachgebiet für Obstbau

Transkriptomanalyse an Europäischer Buche (*Fagus sylvatica*
L.) nach erhöhten Ozon- und CO₂-Konzentrationen und
nachfolgendem Pathogenbefall

Maren Olbrich

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan
für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur
Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. R. Matyssek
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. D. R. Treutter
2. Univ.-Prof. Dr. G. Wenzel

Die Dissertation wurde am 06.09.2007 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für
Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 17.12.2007 angenommen.

*Es war der schönste Wald, den ich gekannt,
mit einem fremden, reichen Märchenleben;
Mohnblüten brannten rot an seinem Rand,
und Rehe tranken abends aus den Gräben.*

*Nur ein paar kurze Sommerstunden sah
ich kinderglücklich jene alten Buchen –
und doch, ich weiß es: ist mein Sterben nah,
werd ich im Traum noch nach dem Walde
suchen.*

Agnes Miegel

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung.....	1
1.1	Problemstellung und Zielsetzung.....	1
1.2	Forstwirtschaftliche Bedeutung von <i>Fagus sylvatica</i> L.....	2
1.3	Abiotische und biotische Stressoren.....	3
1.3.1	Auswirkung erhöhter CO ₂ -Konzentrationen auf die Pflanzen.....	3
1.3.2	Die Bedeutung von Ozon.....	4
1.3.3	Pflanzliche Abwehrmechanismen gegenüber Ozon.....	5
1.3.4	Wurzelfäule und Stammgeschwüre durch <i>Phytophthora citricola</i>	6
1.3.5	Blattverbräunung durch <i>Apiognomonina errabunda</i>	8
1.3.6	Pflanzliche Abwehrmechanismen gegenüber Pathogenen.....	9
1.3.7	Gallenbildung durch <i>Mikiola fagi</i> , die Buchengallmücke.....	10
1.3.8	Lochfraß und Minierung durch <i>Rhynchaenus fagi</i> L., den Buchenspringrüßler.....	11
1.3.9	Abwehr gegen Insekten.....	12
2	Material und Methoden.....	13
2.1	Häufig verwendete Materialien und Geräte.....	13
2.2	Bestimmung des Transkriptspiegels mittels eines Buchen-Microarray.....	16
2.2.1	SSH-Banken.....	17
2.2.2	Sequenzierung und DNA-Analyse der SSH-Banken.....	17
2.2.3	Herstellung des Microarrays.....	18
2.2.4	Herstellung der markierten Target-DNA.....	20
2.2.4.1	Isolierung der RNA.....	20
2.2.4.2	Einbau von markierten AA-dNTPs durch RT-PCR.....	21
2.2.4.3	Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen.....	23
2.2.5	Hybridisierung.....	23
2.2.6	Detektion und Bildanalyse.....	24
2.2.7	Auswertung der Transkriptdaten.....	25
2.2.7.1	Normalisierung.....	25
2.2.7.2	Datenauswertung.....	25
2.2.7.3	Clusteranalyse.....	26
2.2.7.4	Maschinelles Lernen mit Hilfe von Support Vektor Maschinen.....	26
2.3	Bestimmung genomischer DNA mittels quantitativer <i>Real-Time-PCR</i> (qPCR).....	27
2.3.1	DNA-Isolation aus Mycel von <i>Apiognomonina errabunda</i>	27

2.3.2	DNA–Isolation aus Buchenblättern.....	28
2.3.3	Messung der genomischen DNA mittels qPCR.....	28
2.4	Bestimmung des Transkriptspiegels durch quantitative <i>Real Time</i> Reverse Transkriptase-PCR (qRT-PCR).....	29
2.4.1	RT-Ansatz.....	29
2.4.2	qRT-PCR.....	29
2.4.3	Primerdesign.....	30
2.4.4	Effizienz.....	31
2.4.5	Statistische Auswertung der qRT-PCR–Ergebnisse.....	31
2.5	Inhaltsstoffanalysen.....	31
2.5.1	Sekundäre, Zellwand-gebundene und lösliche Pflanzeninhaltsstoffe.....	31
2.5.1.1	Methanolextraktion.....	31
2.5.1.2	Zellwandhydrolysen.....	32
2.5.1.3	HPLC-Messung der löslichen Inhaltsstoffe.....	32
2.5.1.4	HPLC-Messung der Zellwand-gebundenen Inhaltsstoffe.....	33
2.5.2	1-Aminocyclopropan-1-Carbonsäure (ACC).....	33
2.5.3	Ligninbestimmung als Ligninthioglycolsäure.....	35
2.5.4	Zellwandpräparation.....	36
2.5.5	Bestimmung der Zellulose.....	36
2.6	Chlorophyllfluoreszenz.....	36
2.7	Pflanzenmaterial.....	37
2.7.1	Klimakammerversuch - Buchen in ambienter und 2x ambienter CO ₂ -Atmosphäre und <i>Phytophthora citricola</i> Infektion.....	37
2.7.1.1	<i>Phytophthora citricola</i> Isolat.....	37
2.7.1.2	Probenmaterial.....	37
2.7.2	Expositionskammerversuch - Ozoneinfluss auf Buchen in Mono- und Mischkultur mit Fichte.....	38
2.7.3	Gewächshausversuch - Einfluss von 2x ambienten CO ₂ , 2x ambientem Ozon und <i>Apiognomonium errabunda</i>	39
2.7.3.1	Kultivierung der Pilze.....	39
2.7.3.2	Gewinnung der Pilzsporen.....	39
2.7.3.3	Infektion der Gewächshausbuchen mit <i>Apiognomonium errabunda</i>	40
2.7.4	Lysimeterversuch - 2x ambiente Ozonbehandlung.....	41

2.7.5	Versuch Kranzberger Forst - 2x ambiente Ozonbehandlung an Sonnen- und Schattenblättern	42
2.7.6	Versuch Kranzberger Forst - Ozonbehandlung, Minierung und Lochfraß von <i>Rhynchaenus fagi</i> L. und Gallenbildung durch <i>Mikiola fagi</i> an Sonnen- und Schattenblättern..	
	42
3	Ergebnisse	43
3.1	Buchen cDNA-Microarray	43
3.1.1	Frühe und späte SSH-Bank.....	43
3.1.2	Microarraybelegung.....	44
3.2	Klimakammerversuch - CO ₂ -Einfluss	44
3.2.1	Bestimmung des Transkriptspiegels mittels Microarray.....	45
3.2.2	Verifizierung der Transkriptspiegel mittels qRT-PCR	46
3.2.3	Inhaltsstoffanalysen.....	47
3.3	Klimakammerversuch – Einfluss von <i>Phytophthora citricola</i>	47
3.3.1	Transkriptspiegelbestimmung mittels Microarray	48
3.3.2	Verifizierung der Transkriptspiegel mittels qRT-PCR	58
3.3.3	Self-Organizing Maps (SOM)	59
3.3.4	Maschinelles Lernen - Support Vektormaschinen (SVM)	61
3.4	Expositions-kammerversuch - Ozoneinfluss auf Buchen in Mono- und Mischkultur	67
3.4.1	Bestimmung des Transkriptspiegels mittels Microarray.....	67
3.4.2	Self-Organizing Maps (SOM)	73
3.4.3	Hierarchisches Cluster	77
3.4.4	Maschinelles Lernen - Support Vektormaschinen (SVM)	78
3.4.5	MapMan	80
3.5	Gewächshausversuch – Einfluss von Ozon und CO ₂	81
3.5.1	Bestimmung des Transkriptspiegels mittels Microarray.....	81
3.5.2	Verifizierung der Transkriptspiegel mittels qRT-PCR	82
3.6	Gewächshausversuch – Einfluss von <i>Apiognomonium errabunda</i>	83
3.6.1	Bestimmung der genomischen DNA mittels qPCR.....	83
3.6.2	Bestimmung des Transkriptspiegel mittels Microarray	83
3.6.3	Verifizierung mittels qRT-PCR.....	84
3.6.4	Inhaltsstoffanalysen.....	85

3.6.4.1	Lösliche Inhaltsstoffe	85
3.6.4.2	Zellwand-gebundene Inhaltsstoffe	88
3.6.5	Chlorophyllfluoreszenz	90
3.7	Lysimeterversuch – Ozoneinfluss	92
3.7.1	Transkriptspiegelbestimmung mittels Microarray	92
3.7.2	Verifizierung der Transkriptspiegel mittels qRT-PCR	96
3.7.3	Lösliche sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe	97
3.8	Versuch Kranzberger Forst – Ozoneinfluss, Sonnen- und Schattenblätter	100
3.8.1	Bestimmung des Transkriptspiegel mittels Microarray	100
3.8.2	Verifizierung der Transkriptspiegel mittels qRT-PCR	102
3.8.3	Inhaltsstoffanalysen.....	102
3.8.3.1	1-Aminocyclopropansäure-1-Carbonsäure	103
3.8.3.2	Strukturelle Inhaltsstoffe	106
3.9	Kranzberger Forst – Einfluss von Ozon und Insekten.....	109
3.9.1	Bestimmung des Transkriptspiegels mittels Microarray.....	110
3.9.2	Hierarchisches Cluster	115
3.9.3	SOM.....	115
3.9.4	Maschinelles Lernen mit Support Vektor Maschinen (SVM).....	118
4	Diskussion	124
4.1	Buchen cDNA-Microarray - frühe und späte SSH-Bank.....	124
4.2	Microarray versus qRT-PCR.....	124
4.3	Klimakammerversuch - CO ₂ -Einfluss	125
4.3.1	Transkriptspiegeländerungen	125
4.3.2	Strukturelle Inhaltsstoffe	126
4.4	Klimakammerversuch – Einfluss <i>Phytophthora citricola</i>	127
4.4.1	Änderung der Transkriptspiegel	127
4.4.2	Zusammenfassende Diskussion - Klimakammerversuch	132
4.5	Expositionskammerversuch - Ozoneinfluss auf Buchen in Mono- und Mischkultur	133
4.5.1	Transkriptspiegeländerungen	134
4.5.2	Zusammenfassende Diskussion - Expositionskammerversuch.....	139
4.6	Gewächshausversuch - Einfluss von CO ₂ und Ozon	140
4.7	Gewächshausversuch - Einfluss von <i>Apiognomonium errabunda</i>	142
4.7.1	Gehalt an genomischer <i>Apiognomonium errabunda</i> -DNA.....	142

4.7.2	Transkriptspiegeländerungen	143
4.7.3	Inhaltsstoffe	143
4.7.4	Chlorophyllfluoreszenz	145
4.7.5	Zusammenfassende Diskussion - Gewächshausversuch	146
4.8	Lysimeter - Ozoneinfluss	147
4.8.1	Transkriptspiegeländerungen	147
4.8.2	Lösliche sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe	151
4.8.3	Zusammenfassende Diskussion - Lysimeterversuch	152
4.9	Versuch Kranzberger Forst – Einfluss von Ozon	153
4.9.1	Transkriptspiegeländerungen	153
4.9.2	Inhaltsstoffe	155
4.9.2.1	Strukturelle Inhaltsstoffe	155
4.9.2.2	ACC	156
4.9.3	Zusammenfassende Diskussion – Kranzberger Forst, Ozoneinfluss unter Berücksichtigung des Blatttyps.....	157
4.10	Kranzberger Forst – Einfluss von Ozon und Insekten.....	159
4.10.1	Minierung und Lochfraß durch <i>Rhynchaechnus fagi</i>	159
4.10.2	Gallenbildung durch <i>Mikiola fagi</i>	162
4.10.3	Zusammenfassende Diskussion – Kranzberger Forst, Ozon- und Insekteneinfluss.....	164
4.11	Zusammenfassende Diskussion unter Berücksichtigung von SFB-Hypothesen.....	165
5	Literaturverzeichnis	170
6	Anhang	188
6.1	Gewächshaus	188
6.2	Kranzberger Forst – Einfluss von Ozon und Insekten.....	189
7	Abbildungsverzeichnis.....	194
8	Tabellenverzeichnis.....	201

SUMMARY

The focus of this thesis was the analysis of transcript levels of European beech (*Fagus sylvatica* L.) after treatment with elevated ozone and CO₂ concentrations and following pathogen attack (*Apiognomonia errabunda*, *Phytophthora citricola*, *Rhynchaenus fagi* and *Mikiola fagi*). Furthermore beech trees were investigated under controlled conditions, in exposure chambers and under hardly controlled conditions, at Kranzberg free-air fumigation site. In addition different ontogenic scales were analyzed on the basis of three up to seven year old beech saplings and adult beech trees.

Under elevated CO₂ exposure only few transcript levels were changed (greenhouse, exposure chamber). However, compared to beech saplings under ambient conditions elevated transcript levels of the basic metabolism and in particular of protein metabolism was detected.

Beech saplings under elevated CO₂ conditions showed more reduced transcript levels after *P. citricola*-infection, than beech trees under ambient condition. This could suggest that beech trees under ambient conditions were more resistant against the pathogen, because they synthesised defence-related substances at earlier time points. Beech saplings under elevated CO₂ might compensate fungal damage at the beginning of infection, caused by the synthesis of more carbohydrates that then could be invested into the horizontal resistance. Therefore it is more likely that beech saplings under elevated CO₂ were in a better condition to compensate fungal damages already at the initial infection stage. Nevertheless, in the later infection period saplings started to synthesise defence-related substances.

Ozone induced ESTs of signal transduction, disease/defence and secondary metabolism were found after subtractive suppressive hybridisation, as well as in different experimental settings (exposure chamber, greenhouse und lysimeter).

Infection of beech saplings with *A. errabunda* in greenhouse under ambient conditions increased the concentrations of hydroxy-cinnamic acid and flavane/flavanone, whereas under twice ambient ozone and CO₂ exposure decreased concentrations were observed. These factors imply that beech trees under ambient conditions in contrast to the ozone- and CO₂-treated beech saplings were insufficient protected against stress. These results were supported by the reduced maximal quantum yield in infected trees compared to uninfected trees.

Ozone-treated beech saplings increased their transcription and protein synthesis already at earlier time points, in contrast to beech saplings under ambient conditions. A great number of these ESTs belong to cell structure, which indicated the formation of mechanical protection and photosynthetic structures. This implicates an enhanced gain of resources for the formation of

secondary metabolites. With regard to secondary metabolites there was a significant influence of exposure, at which beech saplings under ambient conditions showed lower values for soluble secondary metabolites compared to CO₂-and ozone-treated beech saplings.

The cultivation conditions had a clear influence on the reaction of beech saplings upon ozone. Beech saplings in mono culture did not react until three days after the ozone peak. These saplings showed then induced transcripts of ESTs, which were connected explicitly with ozone stress, e. g. ESTs encoding WRKY proteins, nine-cis-epoxycarotenoid dioxygenase and hydroxyproline-rich glycoprotein family protein, ESTs involved in tryptophan biosynthesis and an arginine decarboxylase of putrescine biosynthesis. . Beech saplings in competition with spruce responded hardly to ozone exposition. Thus it could be concluded that beech saplings in inter-specific competition were better protected against ozone or on the other hand were stressed to such an extent that they were not able to respond to the ozone stress. Beech saplings in mono culture were not exposed to an inter-specific competition. This might indicate increased resources for the synthesis of protective substances against ozone, which could explain the induction of ESTs of secondary metabolism and disease/defence.

In the lysimeter study ozone-induced phenomena of senescence were found at the transcript and metabolite level in the year 2005.

At Kranzberg Forest site additional environmental factors have to be carefully considered, similarly as in the lysimeter study. External factors have a crucial impact on the reaction of trees with respect to ozone stress. Field grown beech trees showed lower changes at the transcript level after ozone treatment in comparison with beech trees in exposure chamber, greenhouse and also the lysimeter.

Another important factor with respect to stress responses is the age of trees. Adult trees might possess a higher structural resistance and are therefore more resistant to stress compared to young saplings. One reason is the higher photo protective capacity of adult trees, which can protect leaves from oxidative stress.

In addition the type of leaves is also important for the transcriptional reaction of plants towards ozone and pathogen stress. At Kranzberg forest site sun and shade leaves showed different patterns of gene expression after exposure to elevated ozone and attack by insects.

Overall the transcript pattern of adult trees under ambient compared to 2x ambient ozone conditions was different after insect attack at Kranzberg Forest site.

ZUSAMMENFASSUNG

Der Transkriptspiegel der Europäischen Buche (*Fagus sylvatica* L.) wurde im Rahmen dieser Arbeit nach erhöhten Ozon- und CO₂-Konzentrationen und nachfolgendem Pathogenbefall (*Apiognomonia errabunda*, *Phytophthora citricola*, *Rhynchaenus fagi* und *Mikiola fagi*) untersucht. Dabei wurde der Bogen von kontrollierten Bedingungen, wie in Expositions-kammern, bis hin zu Freilandversuchen im Kranzberger Forst unter kaum kontrollierten Bedingungen gespannt. Darüber hinaus wurden verschiedene Bereiche der ontogenetischen Skala anhand von drei- bis siebenjährigen und adulten Buchen abgedeckt.

Bezüglich der CO₂-Exposition veränderten sich wenige Transkriptspiegel (Gewächshausversuch, Klimakammerversuch). Gegenüber den Buchen unter ambienten Bedingungen wurde hinsichtlich der Transkriptspiegel in den CO₂-behandelten Buchen eine erhöhte Aktivität des Grund- vor allem aber des Proteinstoffwechsels festgestellt.

Durch die *P. citricola*-Infektion wiesen Buchen unter erhöhten CO₂-Bedingungen insgesamt mehr verminderte Transkriptspiegel auf als Buchen unter ambienten Bedingungen. Dies könnte andeuten, dass die Buchen unter ambienten Bedingungen, die insgesamt früher Abwehr-relevante Stoffe bildeten, resistenter gegenüber dem Pilz waren. Die Bäume unter erhöhtem CO₂ kompensierten Schädigungen durch den Pilz eventuell im Anfangsstadium der Infektion besser, da sie über eine bessere Kohlenhydratausstattung verfügten und somit vermehrt in die horizontale Resistenz investieren konnten. Zum späteren Infektionsgeschehen beginnt der Baum allerdings dennoch Abwehr-relevante Stoffe zu bilden.

Eine Ozon-bedingte Induktion von ESTs der Signaltransduktion, Abwehr/Krankheit und des Sekundärmetabolismus wurde sowohl durch subtraktive suppressive Hybridisierung als auch in den verschiedenen Versuchen (Expositionskammer, Gewächshaus und Lysimeter) beobachtet.

Durch die Infektion der Gewächshausbuchen mit *A. errabunda* nahmen in den Buchen unter ambienten Bedingungen die Gehalte an Hydroxyzimtsäuren sowie an Flavan/Flavanon zu, in den Ozon- und CO₂-behandelten Buchen nahmen sie hingegen ab. Dieses lässt den Schluss zu, dass die Buchen unter ambienten Bedingungen im Vergleich zu den Ozon- und CO₂-behandelten Buchen über unzureichenden Schutz gegen Stress verfügten, was die verminderte maximale Quantenausbeute in den infizierten Kontrollbuchen gegenüber den nicht infizierten Buchen erklären könnte.

Durch die Ozonbehandlung steigerten die Buchen zu den frühen Probennahmezeitpunkten die Transkription und somit die Proteinsynthese. Ferner wies der hohe Anteil von ESTs der Zellstruktur auf den Ausbau des mechanischen Schutzes und des Photosyntheseapparates hin.

Die Folge daraus wäre eine vermehrte Ressourcengewinnung zur Bildung von Sekundärmetaboliten. So waren bezüglich der Inhaltsstoffe signifikante Expositionseinflüsse zu erkennen, wobei die Buchen unter ambienten Bedingungen in fast allen gemessenen löslichen Inhaltsstoffen geringere Werte gegenüber den CO₂- beziehungsweise Ozon-behandelten Buchen aufwiesen.

Ein deutlicher Einfluss auf die Reaktion der Buchen auf Ozon war für den Kulturtyp erkennbar. Die Buchen der Monokultur reagierten erst nach drei Tagen auf Ozon. Dabei waren ESTs induziert, die explizit mit Ozonstress in Verbindung stehen: WRKY, 9-Cis-Epoxy-Carotenoid-dioxygenase, ESTs der Tryptophanbiosynthese, die Arginincarboxylase (Putrescibiosynthese) und das Hydroxyprolin-reiche Glykoproteinfamilienprotein. Die Buchen in Konkurrenz mit Fichte reagierten hingegen kaum auf die Ozonexposition. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Buchen durch die interspezifische Konkurrenz gegen Ozon gestärkt waren oder aber so gestresst, dass sie nicht mehr auf das Ozon reagieren konnten. Dadurch dass die Buchen in Monokultur keiner interspezifischen Konkurrenz ausgesetzt waren, standen ihnen vermehrt Ressourcen zur Verfügung, um Schutzstoffe gegen Ozon zu bilden. Das würde die Induktion von ESTs des Sekundärstoffwechsels und der Abwehr/Krankheit erklären.

Des Weiteren wurden deutlich Ozon-bedingte Seneszenzphänomene auf Transkript- sowie Metabolitebene im Jahr 2005 in den Buchen des Lysimeters festgestellt.

Eine entscheidende Auswirkung auf die Reaktion der Bäume in Hinblick auf zusätzlichen Ozonstress haben Außenfaktoren. Durch Ozon veränderte sich nur eine geringe Anzahl an Transkriptspiegeln unter den Freilandbedingungen, im Gegensatz zu den Buchen unter stärker kontrollierten Bedingungen, wie sie in den Expositionskammern, im Gewächshaus, aber auch auf dem Lysimeter herrschten.

Ein weiterer Einflussfaktor in Bezug auf die Stressantwort ist das Baumalter. Möglicherweise haben alte Bäume eine höhere strukturelle Resistenz und sind dadurch Stress-resistenter als junge Bäume. Ein Grund für die höhere Resistenz ist eine höhere photoprotektive Kapazität der älteren Bäume. Diese schützt das Blatt gegen oxidativen Stress.

Ferner ist der Blattpfand bedeutend hinsichtlich der Reaktion auf den Ozon- sowie Pathogenstress. Insgesamt reagierten Sonnen- und Schattenblätter der Kranzberger Forst Buchen bezüglich ihres Transkriptspiegelmusters ganz unterschiedlich auf die erhöhte Ozonexposition und die Schädigung durch Insekten. Außerdem war ein deutlicher Ozoneinfluss auf die nachfolgende Schädigung durch Insekten bezüglich des Transkriptmusters in den Buchen des Kranzberger Forstes zu sehen.

Abkürzungen

AA-dUTP	5-(3-aminoallyl)-2'deoxyuridine-5'-triphosphat
BSA	Bovine Serum Albumin
cDNA	komplementäre DNA
CO ₂	Kohlendioxid
CTAB	Hexadecyltrimethylamonium borid
COMT	Kaffeesäure-O -Methyltransferase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EST	Expressed Sequence Tags
EtOH	Ethanol
EtSH	β-Mercaptoethanol
GAL	GenPix Array List
GAPDH	Glyceraldehyd 3-Phosphatdehydrogenase
HR	Hypersensitive Reaktion
MetOH	Methanol
MOPS	4-Morpholino Propansulfonsäure
NaAc	Natriumacetat
NaBH ₄	Natriumborhydrid
NaCl	Natriumchlorid
NaOCl	Natriumhypochlorid
O ₃	Ozon
OMT	O -Methyltransferase
PAM	Pulsamplitudenmodulation-Fluoreszenzmethode
PCR	Polymerasekettenreaktion
PR	Pathogen-related; Pathogen-verwandt
PS	Photosystem
PVP	Polyvinylpyrrolidone
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Reverse Transkriptase
Rubisco	Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/-Oxygenase
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SOM	Self Organizing Maps
SSC	Saline-Sodium Citrate
SSH	supressive subtraktive Hybridisierung
TE	Tris/ EDTA-Puffer

1 EINLEITUNG

1.1 Problemstellung und Zielsetzung

Die Arbeit wurde im Rahmen des von der Deutschen Forschungsgesellschaft geförderten Sonderforschungsbereichs 607 „Wachstum und Parasitenabwehr – Wettbewerb um Ressourcen in Nutzpflanzen aus Land- und Forstwirtschaft“ durchgeführt und trägt zur Klärung folgender in diesem SFB untersuchten Hypothesen bei:

SFB-Hypothese I: Erhöhte Anfälligkeit gegenüber Parasitenbefall ist in unterschiedlicher Reaktionsfähigkeit des Sekundär- relativ zum Primärstoffwechsel und anhand deren genetischen Steuerung erkennbar.

SFB-Hypothese VI: Die Anfälligkeit der Pflanze steigt mit zunehmender Kohlendioxid-(CO₂)-Konzentration der Luft durch Stimulierung des Primärstoffwechsels, Ozon-Behandlung hingegen erhöht die Resistenz des Wirtes durch Stimulierung des Sekundärstoffwechsels.

SFB-Hypothese VIII: Unabhängig von der pflanzlichen Lebensform (krautig oder verholzend) bestimmen gleiche oder analoge Metabolite und genetische sowie physiologische Regelmechanismen das Ausmaß der Fitness.

Zur Bearbeitung der Thesen wurden Versuche sowohl mit abiotischen (Ozon, CO₂) als auch mit biotischen (*Phytophthora citricola*, *Apiognomonium errabunda*, *Rhynchaenus fagi* L., *Mikiola fagi*) Stressoren durchgeführt. Dabei war das Interesse auf den bedeutendsten sommergrünen Baum in Zentraleuropa, die Europäische Buche (*Fagus sylvatica* L.), gerichtet (SCHÜTT et al., 1992).

Forstbäume sind mehrjährige Pflanzen, die während ihrer Evolution verschiedene Mechanismen der Stressresistenz entwickelt haben. Hauptsächlich durch anthropogene Aktivitäten hat die Konzentration an troposphärischem Ozon und CO₂ während der letzten Dekaden zugenommen. Dieser Umweltstress führt genauso wie Umweltstress durch Chemikalien, Strahlung und Luftverschmutzung, zu einem Netzwerk an Stressantworten.

Ozon dringt über die Stomata in das Buchenblatt ein und löst dort einen "oxidativen Burst" aus, der vergleichbar mit einer inkompatiblen Pflanzen-Pathogeninteraktion ist. Des Weiteren ist Ozon als abiotischer Elicitor bei krautigen Pflanzen bekannt (SANDERMANN et al., 1998; LANGEBARTELS et

al., 2002) und löst die Induktion von Abwehr-verwandten Genen aus (KANGASJÄRVI et al., 1994; PELL et al., 1997; SHARMA und DAVIS, 1997; SANDERMANN et al., 1998). Pflanzliche Antworten auf Ozonexposition und Pathogenbefall sind sehr ähnlich und die meisten Ozon-induzierten Gene werden auch durch Pathogenbefall beeinflusst (LANGEBARTELS et al., 2002), man spricht vom „Crosstalk“ beider Stressoren. Bei holzigen Pflanzen wurde sogar ein Ozon-induzierter „Memory-Effekt“ mit verspäteten Symptomentwicklungen und persistenten biochemischen Antworten beobachtet (LANGEBARTELS et al., 1998; SANDERMANN, 2000).

Ozon- und CO₂-Behandlungen führen zu einem veränderten metabolischen Status der Pflanze, der sie entweder anfälliger oder resistenter gegen weitere Stressoren wie Pathogene macht (SANDERMANN, 1999). Der Einfluss von erhöhtem Ozon und CO₂ auf die Transkriptebene von holzigen Pflanzen wurde bisher lediglich an Kiefern, Fichten, Pappeln und Espen untersucht (GALLIANO et al., 1993; WEGENER et al., 1997; CLARKE et al., 1998; KOCH et al., 1998; ZINSER et al., 2000; CHIRON et al., 2000a; CHIRON et al., 2000b; WUSTMAN et al., 2001; GUPTA et al., 2005; TAYLOR et al., 2005; DRUART et al., 2006; KUBISKE et al., 2007). Um genauere Kenntnisse darüber für die Europäische Buche zu gewinnen, wurden die Interaktionen sowohl von abiotischen (Ozon, CO₂) als auch biotischen (*P. citricola*, *A. errabunda*, *R. fagi* L., *M. fagi*) Stressoren auf Transkriptniveau durch einen cDNA-Microarray untersucht.

Durch die DNA-Array Technologie ist es möglich, die Interaktion Pflanze-Stressor und Gen-Reprogrammierung zu erfassen und die Transkriptebene mit der Metabolitebene zu vergleichen.

1.2 Forstwirtschaftliche Bedeutung von *Fagus sylvatica* L.

Die Rotbuche gehört zu den wirtschaftlich bedeutendsten Laubhölzern Europas. Sie ist eine sommergrüne Baumart und findet ihre natürliche Verbreitung in den gemäßigten bis warm gemäßigten Klimaten Europas (KRAMER, 1988). Ihr wirtschaftliches Nutzalter liegt zwischen 80 bis 140 Jahren. Unter natürlichen Bedingungen kann sie ein Alter von 300 Jahren erreichen, die ältesten bekannten Exemplare sind sogar 900 Jahre alt.

Das typische Merkmal der Rotbuche ist ihre glatte und relativ dünne Rinde. Junge Buchen bilden zunächst eine Pfahlwurzel aus, die nach 45 bis 55 Jahre in eine Herzwurzel übergeht (VATER, 1927). Die Buche kann eine Höhe von maximal 45 m erreichen (SCHOENICHEN, 1950; KRAMER, 1988; PRENTICE und HELMISAARI, 1991). Der Austrieb der Buchenknospen beginnt Ende April/Anfang Mai. Die Fruchtreife erreicht die Buche erst mit 40 bis 50 Jahren, wenn sie frei steht, oder nach etwa 80 Jahren im Waldbestand (HOTOVY, 1948). Die im Laufe der Vegetationsperiode

gebildeten Samen, die Bucheckern, erreichen ihre Reife im Oktober. Die Buche lebt in einer obligaten Symbiose mit Ektomykorrhizen.

Im westlichen Eurasien treten zwei Subspezies der Buche auf: *F. sylvatica* ssp. *sylvatica* und *F. sylvatica* ssp. *orientalis* (LIPSKY). Übergangsformen der beiden Subspezies werden als weitere Morphotypen von *F. sylvatica* oder Variationen der beiden Unterarten beschrieben (DENK, 1999a; DENK, 1999b). Genetische Analysen zeigen, dass die Populationen unterschiedliche Allelhäufigkeiten besitzen (BORGHETTI et al., 1993; STARKE et al., 1994; WOLF und BRAUN, 1996) und der Heterozygotiegrad unerwartet gering ist (COMPS et al., 1991; LEONARDI und MENOZZI, 1995; WOLF und BRAUN, 1996). Dies wird durch einen hohen Anteil an Selbstbefruchtung und Befruchtung durch unmittelbare Nachbarbäume erklärt (COMPS et al., 1991; STARKE, 1996). Die genetische Variabilität innerhalb von Populationen ist wesentlich größer als zwischen den Populationen (COMPS et al., 1991; BORGHETTI et al., 1993; LEONARDI und MENOZZI, 1995; WOLF und BRAUN, 1996).

Die Anzahl letaler Krankheiten ist bei *F. sylvatica* im Vergleich zu anderen Baumarten Europas gering (KLIMETZEK, 1992). Flächenhafte Ausfälle treten meist nur bei Verjüngungsstadien auf.

Das Buchenholz bietet große Verwendungsmöglichkeiten, beispielsweise als Industrieholz zur Herstellung verschiedener Holzwerkstoffe, vergütetes Holz, Holzwolle, Holzmehl, Kunstfasern und Viskose. In geringen Mengen dient es zur Herstellung von Papier (HOTOVY, 1948). Eine große Bedeutung hat das Buchenholz als Energieholz (HOTOVY, 1948; KNIGGE und SCHULZ, 1966). Ferner dient es in der Chemie und Pharmazie als Konservierungsstoff, Desinfektionsmittel und Geschmacksstoff (HOTOVY, 1948; DÖRFLER und ROSELT, 1965; KNIGGE und SCHULZ, 1966). Es wird eingesetzt im Haus-, Innen- und Möbelbau, zur Herstellung verschiedener Holzwaren (HOTOVY, 1948; GRAMMEL, 1989; SCHÜTT et al., 2002) und als Kielholz im Schiffsbau (HOTOVY, 1948).

1.3 Abiotische und biotische Stressoren

1.3.1 Auswirkung erhöhter CO₂-Konzentrationen auf die Pflanzen

Seit der industriellen Revolution ist das atmosphärische CO₂ von 270 ppm auf einen heutigen Wert von 380 ppm angestiegen (PETIT et al., 1999). Somit stellt sich die Frage, in wieweit Pflanzen auf die erhöhten CO₂-Konzentrationen reagieren und wie sich diese Reaktion auf die Gemeinschaft und Produktivität des Ökosystems auswirkt (KOHUT, 2003).

Auf physiologischer Ebene wurden Parameter wie Photosyntheserate (EL KOHEN et al., 1993; EPRON et al., 1996; POORTER und NAVAS, 2003; AINSWORTH et al., 2006; BRAGA et al., 2006), Fluoreszenz (BRAGA et al., 2006), Blattfläche (EL KOHEN et al., 1993; EPRON et al., 1996; POORTER und NAVAS, 2003; AINSWORTH et al., 2006), Blattzahl (EPRON et al., 1996) und verschiedene Wachstumsparameter (EL KOHEN et al., 1993; EPRON et al., 1996; LIPPERT et al., 1996a; CHENG et al., 1998; DRUART et al., 2006; KUBISKE et al., 2007) bestimmt. Darüber hinaus wurde nach Veränderungen auf metabolischer Ebene gesucht. So war der Chlorophyllgehalt beispielsweise durch erhöhtes CO₂ vermindert (EPRON et al., 1996) und der Zuckergehalt erhöht (CHENG et al., 1998; AINSWORTH et al., 2006). SCHWANZ und POLLE (1998) berichteten außerdem über Veränderung von Sekundärmetaboliten durch CO₂-Behandlung.

Studien über die Beeinflussung der mRNA-Ebene nach erhöhter CO₂-Exposition wurden an Pappel (TAYLOR et al., 2005; DRUART et al., 2006), Sojabohne (AINSWORTH et al., 2006) und Buche (EPRON et al., 1996) durchgeführt. Eine nicht zu vernachlässigende Rolle spielten dabei das Entwicklungsstadium (TAYLOR et al., 2005) und der Phänotyp (KOHUT, 2003) der Pflanze. Eine hohe genetische Diversität wurde bezüglich der Photosyntheseaktivität in Buchen gesehen (EL KOHEN et al., 1993) und beeinflusst folglich auch die molekulare Reaktion der Pflanzen.

Weitere wichtige Faktoren bezüglich der CO₂-Aufnahme, CO₂-Fixierung und Weiterverarbeitung innerhalb der Pflanze sind sowohl die Nährstoffverfügbarkeit als auch das Nährstoffangebot.

1.3.2 Die Bedeutung von Ozon

Ozon entsteht unter natürlichen Bedingungen in der Stratosphäre, am Atmosphärenrand in 12 bis 40 km Höhe, durch Einwirkung von elektrischen Ladungen oder energiereicher Strahlung auf Sauerstoff (LIPPERT et al., 1996b) (<http://www.stadtentwicklung.berlin.de>). Ozon verbraucht oder absorbiert einen Teil der schädlichen UV-Strahlung (<http://www.stadtentwicklung.berlin.de>). Da keine energiereiche Strahlung in die Troposphäre eindringt, ist dort eine Ozonbildung aus Sauerstoff nicht möglich. Allerdings entsteht Ozon durch das Zusammenwirken von UV-Licht, Stickoxiden und Kohlenwasserstoffen (Abbildung 1) (<http://www.stadtentwicklung.berlin.de>). Die Ozonmenge, die ohne anthropogenen Einfluss entsteht, ist jedoch sehr gering.

Der Abbau der Ozonschicht in der Stratosphäre und der Treibhauseffekt — Ozon trägt zu 8% des anthropogenen Treibhauseffektes bei — bedingt eine höhere UV-Dosis, die zu einer verminderten Photosyntheseleistung und somit zum Rückgang des Pflanzenwachstums führt (<http://www.stadtentwicklung.berlin.de>).

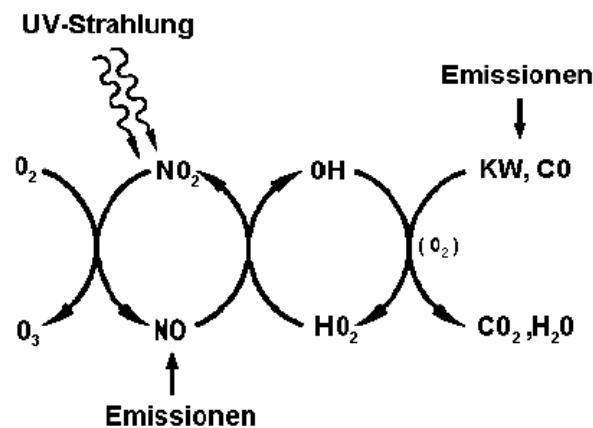


Abbildung 1: Schematische Darstellung der photochemischen Ozonbildung in der Troposphäre (KW = Kohlenwasserstoffe) (VOLZ-THOMAS et al., 1990)

1.3.3 Pflanzliche Abwehrmechanismen gegenüber Ozon

Ozon dringt über die Stomata in die Blätter ein. Im interzellularen Raum zersetzt es sich relativ schnell, in wässriger Lösung führt es zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) wie Wasserstoffperoxid, Singulett-Sauerstoff, Superoxidanion und Hydroperoxylradikal (Abbildung 2). Sekundär entstehen durch Reaktion von Ozon mit Zellwand-gebundenen phenolischen Gruppen äußerst reaktive OH-Radikale. Ferner kommt es durch Reaktion mit Plasmamembranlipiden und -proteinen zur Bildung organischer Peroxide. Die Bildung von Signalmolekülen (Ethylen, Salizylsäure, Jasmonat), ROS, von Pathogen-verwandten (PR)-Proteinen und antioxidativen Verbindungen sowie die Aktivierung des Polyaminmetabolismus, der Polyphenol- und der Ligninbiosynthese erfolgen innerhalb weniger Stunden nach subakuter Ozonexposition (SANDERMANN ET AL., 1998; SCHRAUDNER ET AL., 1998; OVERMYER ET AL., 2000; RAO UND DAVIS, 2001; MOEDER ET AL., 2002; WOHLGEMUTH ET AL., 2002).

Abiotisch/biotisch-induzierbare Gene aus verschiedenen Stoffwechselwegen sind in holzigen Pflanzen bekannt (PELL ET AL., 1997; SHARMA UND DAVIS, 1997; SANDERMANN ET AL., 1998; LANGEBARTELS ET AL., 2002). So wurde an Koniferen eine Elicitor-, Ozon- und UV-B-induzierte Transkriptakkumulation für die Stilben- und Ligninbiosynthese gezeigt (ZINSER et al., 2000; CHIRON et al., 2000a; CHIRON et al., 2000b), an Birke eine Ozon-induzierte Akkumulation von PR-10 und Phenylalanin-Ammonium-Lyase mRNA festgestellt (PÄÄKKÖNEN et al., 1998). In Buchen wurden UV-B-induzierte Transkripte nachgewiesen (ERNST et al., 2001).

Ozon kann, je nach Dauer, Intensität und Konzentration der Ozonbegasung sowie Empfindlichkeit und Entwicklungsstadium der jeweiligen Pflanze, hemmende, aber auch fördernde Wirkung auf einen Pathogenbefall haben (MANNING UND TIEDEMANN VON, 1995; SANDERMANN, 2000).

Bislang liegen indes keine Transkriptdaten über den Einfluss erhöhter Ozonbelastung auf die Prädisposition der Buche gegenüber pilzlichen Endophyten/Pathogenen vor.

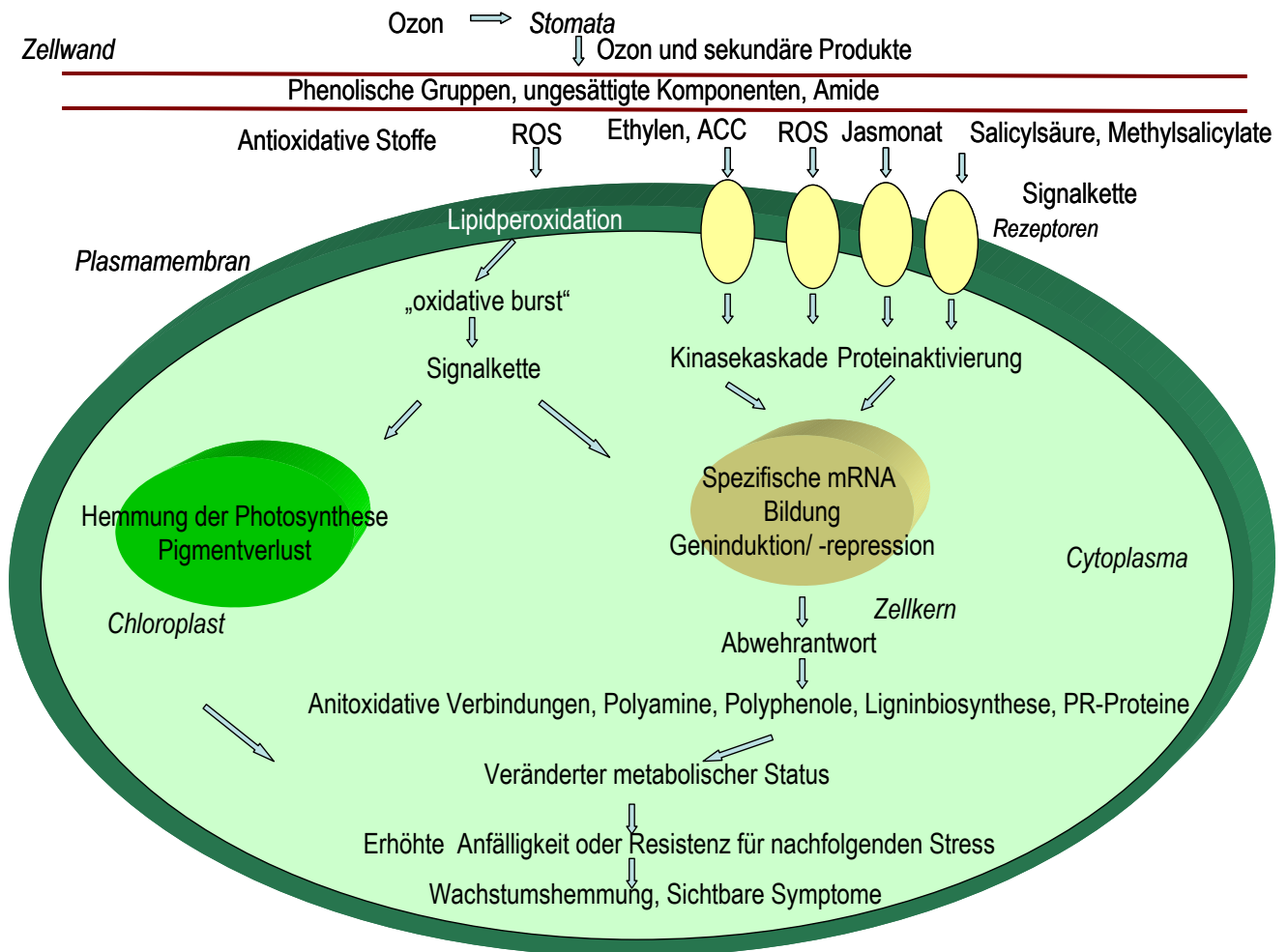


Abbildung 2: Ozonwirkung innerhalb pflanzlichen Gewebes, modifiziert nach LANGEBARTELS et al. (2002)

1.3.4 Wurzelfäule und Stammgeschwüre durch *Phytophthora citricola*

Der Oomycet, *P. citricola* (*Peronosporales: Pythiaceae*) wurde erstmals 1927 von Sawada in Formosa (Taiwan) vom Baum einer Sekkan Orange isoliert (ERWIN und RIBEIRO, 1996). Oomyceten der Gattung *Phytophthora* sind die Ursache für Wurzelfäule und Stammgeschwüre an vielen ökonomischen Pflanzen (ERWIN und RIBEIRO, 1996). Bedeutsam für die phytopathologische Forschung war die Entwicklung spezifischer *P. citricola*-Primer, die eine direkte Quantifizierung von genomischer *P. citricola*-DNA ermöglichten (BÖHM et al., 1999; SCHUBERT et al., 1999; NECHWATAL et al., 2001).

P. citricola bevorzugt feuchte Erde sowie freies Bodenwasser und nasses Laub (ERWIN und RIBEIRO, 1996). Der Oomycet wächst am besten bei Temperaturen um die 25°C bis 28°C. In

Zeiten mit hohen Niederschlägen gelangen die begeißelten Zoosporen über das Bodenwasser zu den Feinwurzeln der Buche (JUNG, 2004). Der Infektionszyklus von *P. citricola* ist in Abbildung 3 dargestellt.

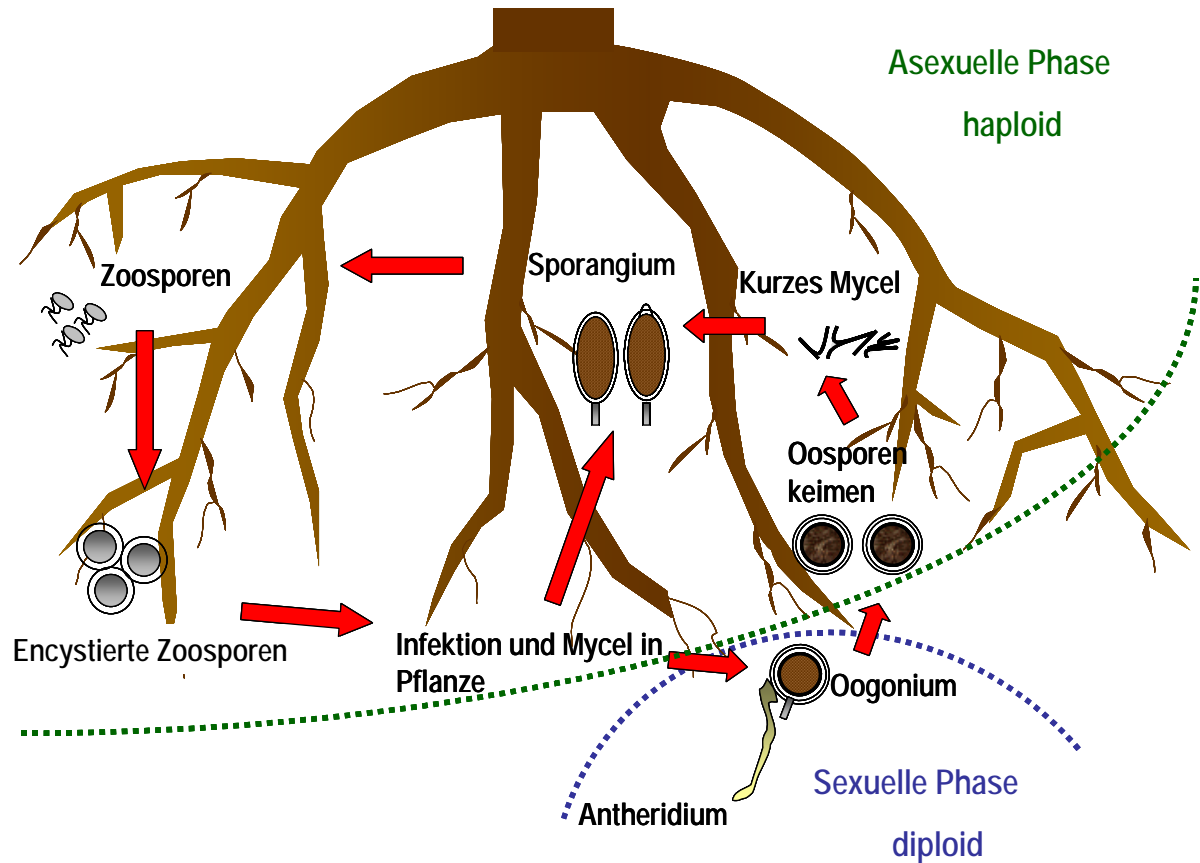


Abbildung 3: Infektionszyklus *P. citricola*, modifiziert nach ERWIN und RIBEIRO (1996)

Die Feinwurzeln werden zerstört und es kann zu zungenförmigen Schäden an den Hauptwurzeln oder am Wurzelhals kommen. Auch Sekundärinfektionen werden beobachtet. Des Weiteren sind Stammnekrosen, Schleimflussflecken, Schleimfluss, Wurzelfäule und eingesunkene Rindenpartien zu finden. Zweijährige und ältere Bereiche der Rindennekrose sind mit Pilzfruchtkörpern von Sekundärpathogenen bedeckt, die Rinde blättert großflächig ab. Die letztjährigen Bereiche der Nekrose sind eingesunken und beginnen aufzureißen. Ausgehend von letztjährigen Rindennekrosen treten neue Nekrosen mit frischen Schleimflussflecken auf (JUNG, 2004).

Da die Buche sehr nässeempfindlich ist, führen feuchte Sommer zur Schwächung der Pathogenabwehr. Dadurch kann *P. citricola* bis in die Rinde des Stammfußes vordringen und sich teilweise bis in 14 m Stammhöhe ausbreiten. Darüber hinaus kann es durch die Infektion mit *P. citricola* zu flächigem Umfallen der Buchen bei Stürmen kommen (JUNG, 2004).

Eine bayernweite Untersuchung der Buchenbestände 1996 hat ergeben, dass die Europäische Buche gegenüber wurzelschädigenden *Phytophthora*-Arten anfällig ist, insbesondere auf wechselfeuchten Standorten (JUNG und BLASCHKE, 1996; JUNG, 2004).

1.3.5 Blattverbräunung durch *Apiognomonina errabunda*

A. errabunda (Ascomycetes: Diaporthaceae) siedelt auf einer Vielzahl von Baumarten (PETRINI, 1986; COHEN, 2004). Durch seine endophytische Lebensweise besiedelt er das gesunde Pflanzengewebe, ohne dass es eine Zeit lang zu Krankheitsausprägungen kommt. Während der Vegetationsperiode wurde er auf Europäischen Buchen gefunden, ohne Krankheitssymptome zu verursachen (PETRINI, 1986; SINCLAIR und CERKAUSKAS, 1996). Infektion und Schadbild sind Abbildung 4 zu entnehmen.

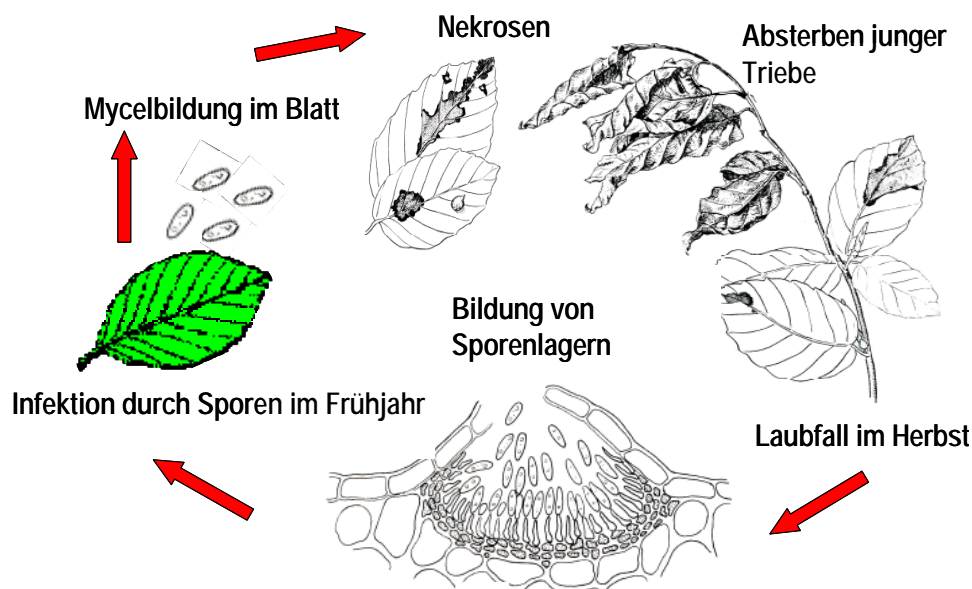


Abbildung 4: Infektion und Schadbild von *A. errabunda* in Anlehnung an BUTIN (1989).

Im Frühjahr entstehen Infektionen über Luftsporen oder der Pilz ist schon in den Bucheckern vorhanden (PETRINI, 1986). *Apiognomonina*-Infektionen können zu Blattverbräunungen führen. Die meist zackig geformten, unregelmäßigen Blattnekrosen werden von Blattadern eingegrenzt. Falls sich diese Nekrosen in der Nähe der Blattbasis befinden, kann dies zum frühzeitigen Abwurf grüner Blätter führen (BUTIN, 1989). In Jahren mit starkem Befall wird das Absterben junger Triebe beobachtet (BUTIN, 1989). Alle fünf bis 10 Jahre kann es zu einer endemisch-parasitischen Ausbreitung des Pilzes mit der Folge von großen Blattnekrosen kommen (BUTIN, 1989).

Zur Quantifizierung genomischer DNA mittels quantitativen *Real-Time* PCR entwickelten BAHNWEG et al. (2005) spezifische *A. errabunda*-Primer. Der Endophyt besiedelt Schattenblätter

von adulten Buchen in höherem Masse als Sonnenblätter. Ozonbehandlung reduzierte die Population leicht, Trockenheit und Hitze, wie beispielsweise im Jahr 2003, führte allerdings zu starkem Rückgang der *A. errabunda*-Population (BAHNWEG et al., 2005).

1.3.6 Pflanzliche Abwehrmechanismen gegenüber Pathogenen

Die Inkompatibilität einer Wirt-Pathogen-Interaktion (Abbildung 5) ist durch präinfektionelle und postinfektionelle Resistenzfaktoren bedingt.

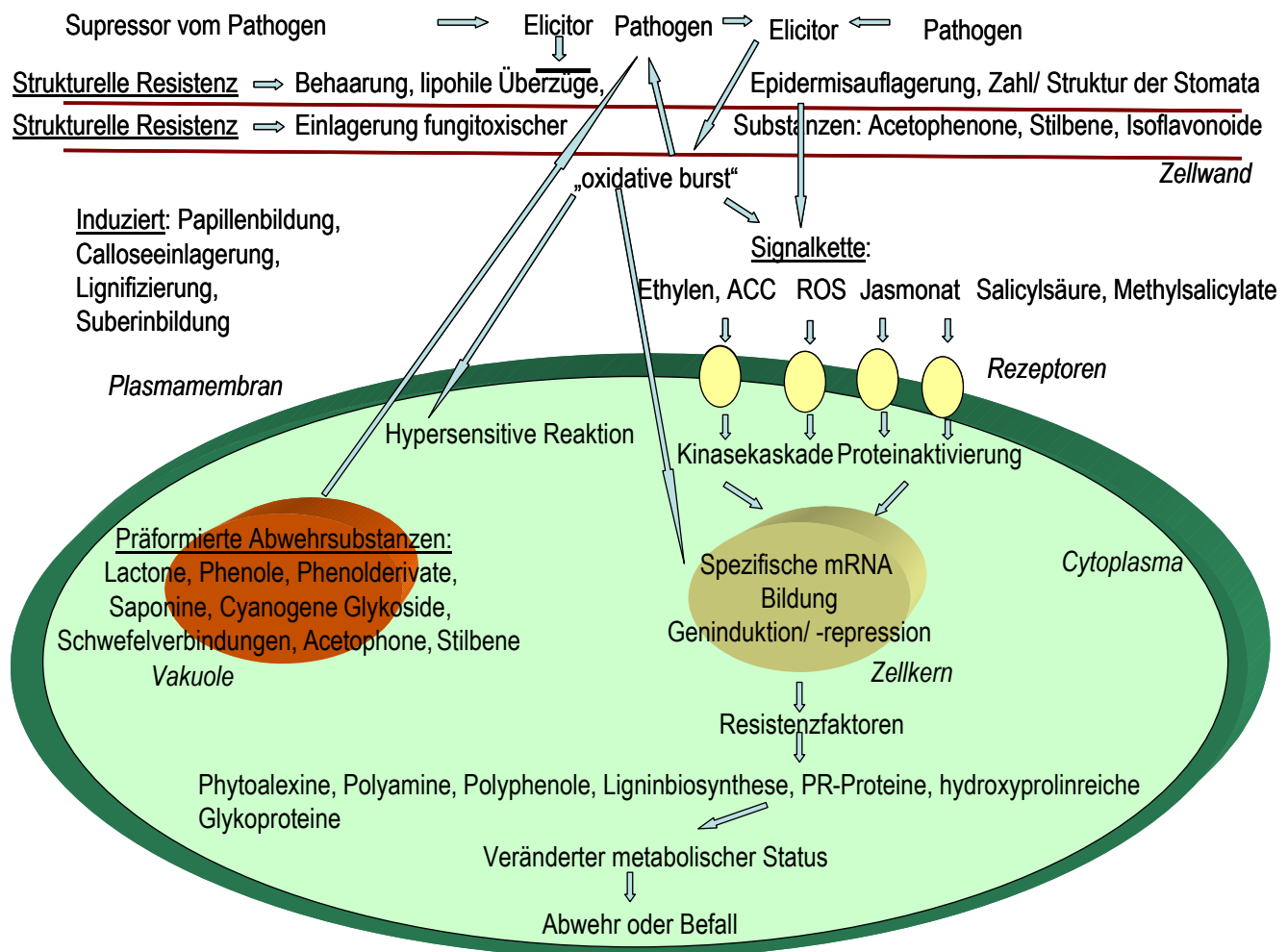


Abbildung 5: Signalkette in der pflanzlichen Zelle nach Pathogenbefall, modifiziert nach LANGEBARTELS et al. (2002).

Die präinfektionellen Resistenzfaktoren setzen sich aus struktureller Resistenz und präformierten Abwehrsubstanzen zusammen. Strukturelle Resistenz wird durch Behaarung der Blattoberfläche, lipophile Überzüge, Dicke von Epidermisaufgaben sowie Zahl und Struktur der Stomata gebildet. Ferner werden Substanzen wie Acetophenone, Stilbene und Isoflavonoide eingelagert, die toxisch für Pilze und Fraßschädlinge sein können. Präformierte Abwehrsubstanzen hingegen

werden im Cytoplasma, zum Beispiel in den Vakuolen der Zellen, gespeichert und bei Fraß oder Infektion freigesetzt. Zu ihnen gehören Stoffe wie Lactone, Phenole, Saponine, cyanogene Verbindungen, Schwefelverbindungen, Acetophone und Stilbene. Im Cytoplasma sind diese Stoffe an ein Glucosid gebunden und somit nicht toxisch. Bei Bedarf wird das Glucosid zur Freisetzung des Toxins durch Glucosidasen abgespalten.

Postinfektionelle Resistenzfaktoren erzeugt die Pflanze erst bei Pathogenbefall. Zu diesen induzierten Abwehrreaktionen gehören Papillenbildung, Lignifizierung, Suberinbildung, O-Dihydroxyphenol, Phytoalexine, PR-Proteine und Hydroxyprolin-reiche Glykoproteine.

Durch das Pathogen werden Elicitoren freigesetzt, die beim Pilzwachstum entstehen. Elicitoren setzen im Wirt eine Signaltransduktionskette in Gang, welche im Zellkern die Stress-induzierte Bildung von mRNA und somit die Bildung von Resistenzfaktoren bewirkt. Daneben ist die Entstehung von endogenen Elicitoren möglich. Sie werden von der Pflanzenzelle gebildet, wenn Enzyme des Pathogens auf die Pflanze einwirken. Diese leiten wiederum Signale an den Zellkern weiter, und es entstehen Resistenzfaktoren.

Darüber hinaus können sich Supressoren des Pathogens an Elicitorbindungsstellen setzen und diese hemmen, so dass keine Signaltransduktion stattfindet.

1.3.7 Gallenbildung durch *Mikiola fagi*, die Buchengallmücke

Der Wirt der Buchengallmücke *M. fagi* (*Nematocera: Cecidomyiidae*) (SCHWERDTFERGER, 1981) ist die Rotbuche (*Fagus sylvatica* L.). Die Buchengallmücke ist in Europa weit verbreitet. Pro Jahr entsteht eine Generation. Ende März bis Anfang April schlüpfen die Imagines. Die Eiablage an Triebspitzen oder Blattknospen der Rotbuche findet im April/Mai nach der Paarung statt (JENSEN, 1948). Die geschlüpften Larven kriechen in die ungeöffnete Blattknospe. Nach seiner Entfaltung bildet das Blatt auf der Oberseite in einer Entfernung von 15 bis 20 Zellen um die Larve herum einen Zellwall (JENSEN, 1948), der sich zu einer mützenförmigen Umwallungsgalle entwickelt (Abbildung 6) (www.faunistik.net/index.html).

In jeder Galle befindet sich eine Larve. Im Oktober schließt sich die Unterseite der Galle, diese dient später als Ausflugsöffnung für die Imagines. Die Galle löst sich vom Blatt und bleibt in der Blattstreu liegen. Dort überwintern die Larven. Im März findet die Verpuppung statt, und nach einer Puppenruhe von 15 bis 20 Tagen schlüpfen die erwachsenen Buchengallmücken.

Durch die Gallen wird die Assimilationsfähigkeit des Baumes beeinträchtigt. Jungpflanzen können unter Umständen sterben. Die Buchengallmücke tritt normalerweise in relativ geringen Dichten auf. Es kann aber plötzlich zu großen Populationen mit entsprechend hohen Schäden kommen.



Abbildung 6: Gallenbildung durch *M. fagi*

1.3.8 Lochfraß und Minierung durch *Rhynchaenus fagi* L., den Buchenspringrüßler

Verbreitet ist der Buchenspringrüßler (*Coleoptera: Curculionidae*) (SCHWERDTFEGGER, 1981) im gesamten europäischen Raum.

Morphologie und Generationszyklus des Käfers ist vorwiegend SCHARDT et al. (2006) entnommen. Imagines und Larven sind phytophag, und ihr Wirt ist die Buche. Pro Jahr tritt eine Generation auf. Die Imagines verlassen im Frühjahr ihr Winterquartier und führen zunächst einen Reifefraß (Lochfraß) durch (Abbildung 7A). Befressen werden alle Altersstufen der Buchen. Mitte April/Anfang Mai findet die Eiablage an die Mittelrippe der Unterseite des Buchenblattes statt. Anfang Juni sterben die Altkäfer. Die geschlüpften Junglarven erzeugen durch endophytischen Fraß eine Gangmine, die sich später zu einer Platzmine erweitert (Abbildung 7B)(www.faunistik.net/index.html)).

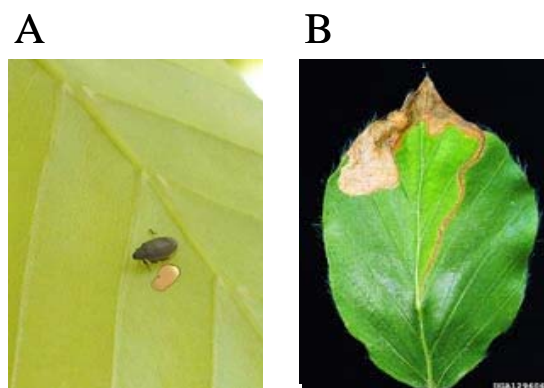


Abbildung 7: Lochfraß (A) und Minierung (B) durch Käfer beziehungsweise Imago von *R. fagi*.

Nach dreiwöchiger Larvenentwicklung erfolgt die Verpuppung innerhalb der Platzmine. Der Käfer schlüpft Mitte Juni nach 10 Tagen bis dreiwöchiger Puppenruhe. Der Jungkäfer führt bis zur Überwinterung in der Bodenstreu wiederum einen Reifefraß an Blättern, Blattstielen und an Fruchtsansätzen der Buchen aus (SCHWERDTFEGGER, 1981).

Minierschäden treten meistens in großer Dichte auf, wodurch sich die Blätter einrollen und vorzeitig abfallen. Dadurch wird die Blattmasse reduziert und außerdem die Fruchtentwicklung gestört (SCHÜTT et al., 2002). Primär entwickelt sich somit ein optischer Schaden, der jedoch keine ernsthafte Gefährdung der Bäume darstellt. Nur bei Massenvermehrung verursachen Käfer und Larve erhebliche Zuwachsverluste, was sich folglich auf die Bucheckernmast auswirkt (ESCHERICH, 1923). Dessen ungeachtet dient *R. fagi* als Vektor für andere Blattkrankheiten (MIHAL und CİCAK, 2001). Adulte Buchenspringrüßler ernähren sich auch von den Blättern zahlreicher anderer Bäume, nur die Larvenentwicklung ist allein an *Fagus*-Arten möglich. Da bei dem Buchenspringrüßler kein großer Zuwachs zu beobachten ist, wurde bisher von Bekämpfungsmaßnahmen abgesehen.

1.3.9 Abwehr gegen Insekten

Schädigungen durch Herbivorenbefall sind stark mit der Art des Herbivorenfraßes und dem Grad des Gewebeschadens an der Fraßstelle korreliert. Wie unter Punkt 1.3.6 beschrieben, ist bei dem Befall durch Insekten vor allem die strukturelle Abwehr wichtig. Darüber hinaus werden zwei Wege der induzierten Abwehr eingeschlagen. Direkt durch Hemmung des Insektenwachstums und der Insektenentwicklung. Indirekt über die Bildung von Pflanzenduftstoffen, die entweder die Insekten abschrecken oder Insektenräuber und Insektenparasiten anlocken (RALPH et al., 2006a). Die abgegebenen Duftstoffe hängen von der Herbivorenspezies und seinem Entwicklungsstadium, der Pflanzenspezies, dem Pflanzengenotyp, dem Pflanzenalter und vom Umweltstress ab (DICKE, 1999; PARE und TUMLINSON, 1999).

Berücksichtigt werden muss an dieser Stelle auch die Art des Schadbildes. So rufen Insekten, die das Blatt anstechen und am Phloem saugen, andere Abwehrreaktionen hervor als Insekten die Gewebe fressen (WALLING, 2000). Zu den saugend-stechenden Insekten werden im weiteren Sinne auch die Minierer und Gallenbildner gezählt, da diese eine intime und lang anhaltende Interaktion mit dem jeweiligen Wirt eingehen. Manche dieser Insekten lösen den generellen Abwehr-Signalweg aus, der zugleich durch Bakterien, Pilze und virale Pathogene aktiviert wird (WALLING, 2000).

Schädlinge, die hingegen große Schäden am Gewebe hervorrufen, verändern die pflanzliche Genexpression und führen zur Akkumulation von Abwehrsubstanzen (BALDWIN und PRESTON, 1999; REYMOND et al., 2000; RYAN, 2000). Daraufhin kommt es zur Induktion Wund-antwortender Gene.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Häufig verwendete Materialien und Geräte

Transkriptspiegelanalysen

Reagenzien	Hersteller
4-Morpholino Propansulfonsäure (MOPS)	DUCHEFA, Haarlem, Niederlande
5-(3-aminoallyl)-2'-deoxyuridine-5'-triphosphat (AA-dUTP)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Absolute™ qPCR Sybr Green® ROX Mix	ABgene, Hamburg
Agar	USB Corporation, Cleveland, USA
Agarose	USB Corporation, Cleveland, USA
Aldehyde Coated Microarray Slides	Genetix GmbH, München
Betain	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Borsäure	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
CTAB (Hexadecyltrimethylamonium borid, w/v)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
dATP	Amersham Pharmacia Biotechnology, Freiburg
dCTP	Amersham Pharmacia Biotechnology, Freiburg
dGTP	Amersham Pharmacia Biotechnology, Freiburg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt
dNTP	Amersham Pharmacia Biotechnology, Freiburg
dTTP	Amersham Pharmacia Biotechnology, Freiburg
Ethanol (EtOH)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Ficoll	Merck, Darmstadt
Flüssiger Stickstoff	Linde, Unterschleißheim
Formamid	Roth, Karlsruhe
Isoamylalkohol (v/v)	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt

Reagenzien	Hersteller
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Kaliumphosphat (K ₃ PO ₄)	Merck, Darmstadt
LiChrosolv® Wasser	Merck, Darmstadt
M13-Primer	GSF, Neuherberg
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt
Magnetic Beads	Scil Diagnostics GmbH, Martinsried
Methanol (MeOH)	Merck, Darmstadt
Natriumacetat (NaAc)	Merck, Darmstadt
Natriumborhydrid (NaBH ₄)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natronlauge (NaOH)	Riedel-de Häen, Seelze
Nucleon™ Phyto Pure™ DNA-Extraktion Resin	Amersham Pharmacia Biotechnology, Freiburg
Oligo dT-Primer (12 - 18 bp)	GSF, Neuherberg
Polyvinylpyrrolidone (w/v; PVP)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Primer für DNA von <i>Apiognomonía errabunda</i>	Invitrogen, Karlsruhe
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
RNase-OUT	Invitrogen, Karlsruhe
Saline-Sodium Citrate (SSC)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Scil DNA Kit	Scil Diagnostics GmbH, Martinsried
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Spermidin (w/v)	Fluka Chemie, Neu Ulm
ssDNA	Invitrogen, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol (v/v) (EtSH)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Superscript™ III Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
SybrGreen PCR Kit	ABgene, Hamburg
Taq-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Tetrasodium Dihydrat (EDTA)	USB Corporation, Cleveland, USA
Tris/HCl	USB Corporation, Cleveland, USA
Tris[Hydroxymethyl]aminomethan (Tris)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA

Inhaltsstoffanalysen

Reagenzien	Hersteller
Ameisensäure (p.A.)	Merck, Darmstadt
Ammoniumformiat	Merck, Darmstadt
Ascorbinsäure	Merck, Darmstadt
Citronensäure	USB Corporation, Cleveland, USA
Diatomaceous Earth	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Flüssiger Stickstoff	Linde, Unterschleißheim
Metaphosphorsäure (v/v)	Merck, Darmstadt
Methanol für die Chromatographie	Merck, Darmstadt
Morpholinoethansulfonsäure (MES)	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumborhydrid (NaBH ₄)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Natriumchlorid (NaCl)	USB Corporation, Cleveland, USA
Natriumhypochlorid (NaClO)	Riedel-de Häen, Seelze
Natronlauge (p.A.) (NaOH)	Riedel-de Häen, Seelze
Polyvinylpyrrolidonphosphat (PVPP)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Quecksilberlösung	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Salpetersäure	Merck, Darmstadt
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Thioglycolsäure	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Triton-X-100	Riedel-de Häen, Seelze

Gerät

Gerät	Hersteller
ABI Prism 7500	Applied Biosystems, Darmstadt
Acuity	Axon Instruments, Sunnyvale, USA
GenPix Pro 4.0 (FLA 8000 Version 1.3)	Axon Instruments, Sunnyvale, USA
Magnetic Separator	Scil Diagnostics GmbH, Martinsried
Mikrodismembrator II	Braun, Melsungen
MJ Research Peltier Thermocycler 200	MJ Research Watertown, USA
Univapo 150 H	Uni Equip, Martinsried

2.2 Bestimmung des Transkriptspiegels mittels eines Buchen-Microarray

DNA-Microarrays werden hauptsächlich eingesetzt, um Veränderungen in biologischen Systemen festzustellen (WORLEY et al., 2000). Sie konzentrieren sich auf die Bestimmung des Transkriptspiegels und den Nachweis von DNA-Varianten. Microarrays sollten geringe Signale erfassen und diese quantifizieren (WORLEY et al., 2000). Die Sensitivität des Microarrays beruht dabei vornehmlich auf der Oberflächenbeschaffenheit des Arrays, der DNA-Aufbringung (Spotten), der Probenmarkierung (Labelling) und den Hybridisierungsbedingungen (WORLEY et al., 2000).

In der eigenen Arbeit lag der Fokus auf, durch biotischen und abiotischen Stress, veränderte Transkriptniveaus. Diese wurden mit Hilfe eines cDNA(komplementäre DNA)-Microarrays, mit Ozon-regulierten Buchengenen, bestimmt. Der allgemeine Arbeitsablauf ist Abbildung 8 zu entnehmen.

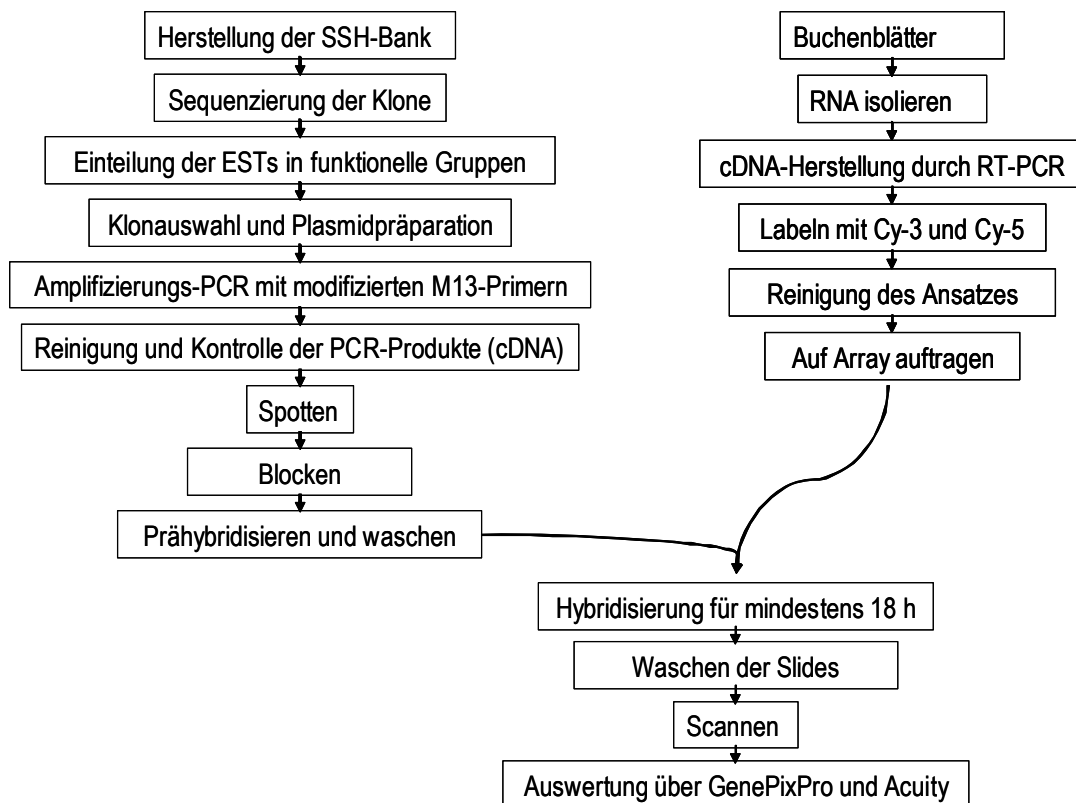


Abbildung 8: Überblick über den Arbeitsablauf zur Erstellung des Buchen cDNA-Microarrays

Ozon-regulierte ESTs (Expressed sequence tags) wurden über eine suppressive subtraktive Hybridisierung (SSH) isoliert, und daraus wurde eine cDNA-Bank erstellt (BETZ, 2005; OLBRICH et al., 2005). Die spezifischen Ozon-regulierten ESTs wurden über PCR (Polymerasekettenreaktion) amplifiziert, gereinigt und auf einen Aldehyd-beschichteten Objektträger (Slide) gebracht. RNA wurde aus Buchen isoliert und in einer Reversen Transkription (RT)-PCR in cDNA umge-

schrieben. Danach wurden die cDNAs der Kontrollbuchen mit grün-fluoreszierendem und die der behandelten Buchen mit rot-fluoreszierendem Farbstoff markiert. Die markierte cDNA der zusammengehörigen Kontroll- und Testbuche wurde auf einen Slide gegeben, wobei gleiche cDNA an das entsprechende PCR-Fragment des Slides hybridisierte. Das Farbsignal des Fluoreszenzfarbstoffes wurde mit Hilfe eines Scanners ermittelt und erlaubte eine Bestimmung der relativen Menge von mRNA-Transkripten in den Testbuchen relativ zu den Kontrollbuchen. Mit Hilfe des Microarrays wurde eine Transkriptanalyse von 1000 spezifischen Buchengenen erreicht. Durch die relativ langen cDNA-Fragmente, von 0,6 bis 2,4 kb, war der cDNA-Array spezifisch und ergab starke Signale.

2.2.1 SSH-Banken

Drei Jahre alte Buchensämlinge wurden mit 300 bis 350 ppb Ozon für acht Stunden pro Tag über insgesamt 30 Tage behandelt. Die Kontrollpflanzen standen in einer Ozon-freien Gewächshauskabine bei gleichen Bedingungen und für denselben Zeitraum. Die Probennahme fand nach Beginn der Ozonbehandlung für die frühen Probennahmetermine nach vier, acht, 24 und 32 Stunden (frühe SSH), sowie für die späten Zeitpunkte nach zwei, drei, vier, fünf, sieben, neun, 12, 15, 22, 26 und 30 Tagen (späte SSH). Die Erstellung der SSH-Banken lief im Rahmen einer vorhergehenden Doktorarbeit (BETZ, 2005). Die Sequenzierung der SSH-Klone und deren Datenbank-Analyse wurden hier fortgesetzt und werden im Folgenden beschrieben.

2.2.2 Sequenzierung und DNA-Analyse der SSH-Banken

Es wurde zu gleichen Teilen Big Dye® Terminator Mix (Applied Biosystems, Darmstadt), Reaktionspuffer (5-fach), Primer (10 mM) mit zwei Teilen Wasser und Plasmid gemischt. Das PCR-Protokoll ist Tabelle 1 zu entnehmen.

Tabelle 1: Sequenzierungs-PCR-Protokoll für den Thermocycler

Temperatur in °C	Zeit	Zyklen
95	1 Minute	1
95	10 Sekunden	35
50	5 Sekunden	35
60	4 Minuten	35

Die Proben wurden durch ethanolische Fällung gereinigt. Dazu wurde zu jedem Ansatz 25 µl 100%-iger Ethanol (EtOH) (Merck, Darmstadt) gegeben und dieser für 15 Minuten bei Raum-

temperatur inkubiert. Danach wurde der Ansatz bei 3000xg und 4°C für 30 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Platte gut ausgeklopft und umgedreht kurz anzentrifugiert. Anschließend wurden 125 µl 70%-iger EtOH dazugegeben und für 15 Minuten bei 2000xg und 4°C zentrifugiert, der Überstand wiederum verworfen und die Platte gut ausgeklopft und umgedreht kurz anzentrifugiert.

Die markierten cDNA-Sequenzen wurden in LiChrosolv® Wasser (Merck, Darmstadt) gelöst und in eine Sequenzierplatte überführt. Die Sequenzierung erfolgte mittels 3730 DNA-Analyzer (Applied Biosystems, Hitachi, Darmstadt; Genomanalysezentrum, GSF). Zur Datenbankanalyse wurden die Vektorsequenzen entfernt und die cDNA-Sequenzen mit Genbankeinträgen, unter Nutzung von BlastN und BlastX (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), verglichen.

2.2.3 Herstellung des Microarrays

Zuerst wurde eine Plasmidpräparation aus der Glycerinstammkultur durchgeführt, um eine Sicherungskopie in Form von Plasmiden zu erhalten. Es wurden sowohl Einzelplasmidpräparationen (QIAprep Miniprep, Qiagen, Hilden) als auch Plattenplasmidpräparationen (Montage™ Plasmid Miniprep₉₆ Kit, Millipore, Eschborn) nach den jeweiligen Herstellerprotokollen durchgeführt. Die isolierten Plasmide wurden in LiChrosolv® Wasser aufgenommen und mittels ihrer Zugehörigkeit zu funktionellen Klassen so auf den Platten angeordnet, dass sie gleich zur Amplifizierung für den Microarray zur Verfügung standen. Dann wurden mit Hilfe der Taq-Polymerase aus 1 µl Glycerinstammkultur beziehungsweise 2 µl Plasmid cDNA-Amplifikate der cDNA-Fragmente nach den folgenden Protokoll und PCR-Bedingungen hergestellt:

Tabelle 2: Amplifizierungsprotokoll der cDNA für den Microarray

Volumen	Reagenz	Konzentration
38,9 µl	Wasser	
5 µl	Puffer (10x)	1x
2 µl	MgCl ₂ (50 mM)	1,5 mM
1 µl	dNTP (10 mM)	0,2 mM
1 µl	M13 vorwärts	0,5 µM
1 µl	M13 rückwärts	
1 µl	DNA	
0,1 µl	Taq-Polymerase	1,0 - 2,5 U

Tabelle 3: Thermocyclerprotokoll für die Amplifizierung der Microarray cDNA

Temperatur in °C	Zeit	Zyklen
94	3 Minuten	1
94	30 Sekunden	33
50	40 Sekunden	33
72	1,5 Minuten	33
72	2 Minuten	1

Zur Überprüfung der amplifizierten cDNA wurde ein 1,5%-iges Agarosegel (1,5 g Agarose auf 100 ml Tris/EDTA-Puffer (108 mg Tris, 55 mg Borsäure, 9,3 mg EDTA)) mit Ethidiumbromid hergestellt. Die amplifizierte DNA wurde mit Blaupuffer (30%, Ficoll, 0,5 M EDTA, 0,025% Bromphenolblau) angefärbt und das Gel mittels Image Master® VDS (Amersham Pharmacia Biotechnology, Freiburg) fotografiert. Es wurden je zwei PCR's mit 100 µl Volumen angesetzt. Die PCR-Produkte wurden anschließend für 20 Minuten bei 3000xg zentrifugiert. Zur Reinigung der Produkte wurden gleiche Teile an PCR-Produkt und autoklavierten Wasser (je 190 µl) in eine 96-well Milliporeplatte (Millipore, Eschborn) gegeben und die Flüssigkeit über eine Milliporepumpe (Millipore, Eschborn) abgesaugt. Dieser Vorgang wurde zweimal durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde in 50 µl LiChrosolv® Wasser aufgelöst und in eine 96-well-Mikrotiterplatte (ABgene, Hamburg) überführt.

Um zum Spotten eine Konzentration zwischen 100 bis 250 ng/µl zu erhalten, wurde das PCR-Produkt eingeeengt und in 25 µl LiChrosolv® Wasser aufgenommen. Zum Spotten wurden danach in eine 384-well Mikrotiterplatte (Greiner bio-one, Frickenhausen) gleiche Anteile an PCR-Produkt und Betainpuffer (3-fach SSC (Saline-Sodium Citrate) mit 1,5 M Betain) gegeben. In dem Betainpuffer wurde die DNA bei -20°C gelagert.

Die in Betainpuffer aufgenommene cDNA wurde auf Aldehydbeschichtete Objektträger (Genetix GmbH, München) gespottet. Die Glasoberfläche war mit primären Aminen beschichtet, diese binden die DNA kovalent über eine Schiff'sche Base. Des Weiteren erhöht die Aldehydbeschichtung die Hydrophobizität der Objektträger sowie die Adhärenz der angelagerten DNA.

Für das Auftragen der cDNA auf die Slides wurde der Micro Grid II (BioRobotic, Cambridge, England) verwendet. Seine Hauptkomponenten bestehen aus einem dreiachsigen Roboterarm mit einem Druckknopf und Drucknadeln, so genannten „pins“. Es wurden immer vier Spots gleichzeitig auf einen Slide gebracht, dabei wurden Federkiehl-Pins verwendet. Die vorbereiteten 384-well Mikrotiterplatten wurden mit Deckel in ein „microplate hotel“ gestellt. Die Slides wurden

auf ein Spotting Tray gelegt und dort über Vakuum festgehalten. Der Microarray wurde jeweils zweimal auf einen Slide gespottet.

Nach dem Spotten wurden die Slides über Nacht beziehungsweise über mehrere Tage getrocknet. Durch das Tauchen der Slides in kochendes Wasser wurde die gespottete cDNA denaturiert und danach durch Natriumborhydrid (NaBH_4) in Phosphat gepufferter Salzlösung (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4 , pH 7,4) und EtOH fixiert.

Das Prähybridisieren dient dazu, die nicht bespottete Oberfläche der Slides zu inaktivieren. Der auf 42°C vorgewärmte Prähybridisierungspuffer (5-fach SSC, 0,1% SDS (Sodium Dodecyl Sulfat) 1% BSA (Bovines Serumalbumin)) wurde auf die Slides gegeben und es wurde bei 42°C für 30 Minuten prähybridisiert. Anschließend wurden die Slides in autoklaviertem Millipore Wasser gewaschen und für 15 Minuten bei 150xg zentrifugiert.

2.2.4 Herstellung der markierten Target-DNA

Durch die verwendete Microarray-Technologie war der direkte Vergleich von Kontrolle und Behandlung auf einem Slide möglich. Für die Buchen-RNA-Analyse wurden 30 µg Gesamt-RNA Probe eingesetzt.

2.2.4.1 Isolierung der RNA

Zur Isolierung von RNA aus Zellen oder Gewebeproben existieren mehrere Methoden, die sich in der Art der Zellyse und Inaktivierung von RNasen unterscheiden. RNA ist im Vergleich zu DNA sehr anfällig für spontane und enzymatisch katalysierte Hydrolyse (MÜLHARDT, 2003). RNasen kommen ubiquitär vor, sind sehr stabil und können nach Denaturierung schnell wieder renaturieren. Für das Gelingen von Microarrayanalysen ist es wichtig, dass nur qualitativ hochwertige RNA verwendet wird. Die RNA darf nicht degradiert oder mit Proteinen verunreinigt sein. Die RNA-Extraktion aus den Buchenblättern wurde nach der Methode von KIEFER et al. (2000) durchgeführt. Je 100 bis 300 mg Blattmaterial wurde gemörsert oder homogenisiert, wobei die Temperatur unter -50°C blieb, sonst kommt es zum Abbau von RNA und in Eppendorfhütchen abgefüllt. Das gemörserte Blattmaterial wurde mit 1 ml 65°C warmen RNA-Extraktionspuffer (100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 25 mM EDTA, 2 M NaCl, 2% CTAB (Hexadecyltrimethylammoniumborid; w/v), 2% PVP (Polyvinylpyrrolidon; w/v), 0,5% Spermidin (w/v)(Fluka Chemie, Neu Ulm) und 2% β -Mercaptoethanol (EtSH) ((v/v)(Sigma Aldrich, St. Louis, USA)) versetzt und sofort gut gemischt. Die Proben wurden für 10 Minuten bei 65°C ins Wasserbad gestellt. Danach wurde 100 µl Nucleon™ Phyto Pure™ DNA-Extraktion Resin dazugeben. Resin ist ein sehr viskoses Kunstharz, welches freie Borsäuregruppen besitzt. Diese Gruppen reagieren mit 1,2 Dihydroxy-

Komponenten der Polysaccharide zu zyklischen Borsäureestern und werden somit von der Probe entfernt. Ferner bildet Resin während des Extraktionsprozesses eine Schicht zwischen der oberen wässrigen Phase, welche die RNA enthält, und der unteren Chloroformphase.

Nach Resinzugabe wurden 500 µl Chloroform/Isoamyl (Verhältnis 24:1, -20°C) dazugegeben. Die Probe wurde gut gemischt, für 10 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert und danach bei 9000xg für 10 Minuten zentrifugiert. Zu dem Überstand wurde wiederum Chloroform zugegeben und zentrifugiert. Der Vorgang wurde solange wiederholt, bis sich keine weißen Schlieren mehr bildeten.

Die Nukleinsäuren wurden durch 0,5 Volumenanteile, also hier 500 µl Isopropanol (4°C) gefällt. Dafür stellte man das Gemisch für 5 bis 60 Minuten auf Eis. Nach 10 Minuten Zentrifugation bei 4°C und 9000xg wurde das Pellet nochmals mit EtOH gewaschen (1 ml, dann 700 µl) und danach gut getrocknet (5 bis 10 Minuten oder länger). Das Pellet wurde in 40 µl LiChrosolv® Wasser gelöst.

Die RNA-Konzentration (in ng/µl) und RNA-Qualität wurde mit Hilfe des Nanodrop (Kisker, Steinfurt) bestimmt, wobei der Faktor 260 nm/280nm über 1,7 und der Faktor 260 nm/230 nm über 2 liegen sollte.

2.2.4.2 Einbau von markierten AA-dNTPs durch RT-PCR

Unter Verwendung von Superscript™ III Reverse Transkriptase wurde von der Buchen RNA als Matrize ausgehend cDNA hergestellt. Als Primer wurden 12 bis 18 bp lange Oligo(dT)s (GSF, Neuherberg) verwendet. Da die Eukaryonten-mRNA sogenannte poly-A+-Enden besitzt, ist somit ein selektives Umschreiben der mRNA von der 3' Region ausgehend gewährleistet.

Die extrahierte RNA wurde mit LiChrosolv® Wasser auf eine Konzentration von 1,5 µg RNA/µl eingestellt. Nach der Zugabe der Primer (Tabelle 4) wurde der Ansatz für 10 Minuten bei 70°C inkubiert, die RNA und Primer denaturierten in dieser Zeit. Danach wurden die Proben auf Eis gestellt und die PCR Maschine auf 25°C abgekühlt. Nun wurden 37 µl des angesetzten Master-Mixes (Tabelle 4) zu den auf Eis stehenden Proben gegeben und für 10 Minuten bei 25°C inkubiert.

Die Primer lagern sich an das poly-A+-Ende der mRNA an, die kurzen Überlappungen von Primer und mRNA können polymerisieren. Die Reverse Transkriptase erstellt bei einer Temperatur von 42°C für mindestens zwei Stunden (oder über Nacht) die cDNA. In die cDNA wurden AA-dNTPs (Tabelle 5) eingebaut, dort lagert sich später der Farbstoff durch kovalente Amidbindung an.

Zur Herstellung der AA-dNTPs wurde 1 mg 5-(3-Aminoallyl)-2'Deoxyuridin-5'-Triphosphat (AA-dUTP) in 19 μ l 0,1 M Phosphatpuffer pH 7.5 aufgenommen. Entsprechende Mengen an dNTPs wurden dazugegeben (Tabelle 5) und der Ansatz mit vierfachem Volumen an Wasser (608 μ l) verdünnt, so dass eine 10-fache Lösung entstand.

Tabelle 4: RT-PCR-Ansatz pro Reaktion

Probe/Reagenz	Menge in μ l	Konzentration
RNA	40	1,5 μ g/ μ l
Oligo dT Primer	2	5 μ g/ μ l
Gesamtvolumina I	42	
Master Mix		
Puffer	16	5x
DTT	8	0,1 M
AA-dNTPs	8	10X; dUTP:dTTP = 1:1
Superscript	4	200 U/ μ l
RNAase Out (Invitrogen)	1	
Gesamtvolumina Master Mix	37	
Gesamtvolumina	79	

Tabelle 5: AA-dNTP-Mix (10-fach)-Zusammensetzung

Probe/Reagenz	Menge in μ l	Konzentration
AA-dUTP	19	100 mM
dTTP	19	100 mM
dATP	38	100 mM
dCTP	38	100 mM
dGTP	38	100 mM
aadNTP Mix	152	50x

Zum Abstoppen der Reaktion und Zerstörung der RNA (durch alkalisches Milieu) wurden pro Ansatz 26,6 μ l 1 M NaOH und 26,6 μ l 500 mM EDTA dazugegeben. Nach 15-minütiger Inkubation bei 65°C wurden 26,6 μ l 1 M HCl zur Neutralisation der Reaktion dazu pipettiert.

Der RT-PCR Ansatz wurde mit 800 μ l PB Puffer (5-fach) (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen, Hilden) versetzt, gemischt und auf Qiagen Säulchen aufgetragen. Die Nukleinsäuren im Puffer bleiben an der aktiven Membran hängen. Der Ansatz wurde zwei Minuten bei 9000xg zentrifugiert und die Membran wurde mit 700 μ l Waschpuffer (5 mM K_2HPO_4 , 80% EtOH, pH 8,0) zweimal

gewaschen, abzentrifugiert (eine Minute 13300xg) und das Eluat jeweils verworfen. Die Nukleinsäuren wurden mit Elutionspuffer (4 mM K_2HPO_4 , pH 8,5) je zweimal 35 μ l (1 Minute 13300xg) in neuen Eppendorfgefäßen von der Membran gelöst und die Proben in einer Univapo 150 H eingedampft. Der Waschpuffer erhält die aktiven Allylgruppen der cDNA zur späteren Fluoreszenzfarbstoffbindung.

2.2.4.3 Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen

Als Fluoreszenzfarbstoff wurden Cy-3 und Cy-5 Mono-Reactive Dye Pack benutzt. Der Farbstoff (Dye) wurde in 85 μ l Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und im Kühlschrank gelagert. Die getrocknete cDNA (Punkt 2.2.4.2) wurde in 4,5 μ l 50 mM Natriumcarbonat Puffer (pH 9,9, Merck, Darmstadt) und 4,5 μ l in DMSO gelösten Dye aufgenommen. Das alkalische Milieu ist für die Farbreaktion wichtig. Die so gelösten Proben wurden mindestens eine Stunde im Dunkeln und bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurde der Markierungsansatz gereinigt und zu jedem Ansatz 35 μ l 100 mM NaAc (pH 5,2) zur Fällung der DNA hinzupipettiert. Zu dem Ansatz wurden 250 μ l PB Puffer (5-fach) (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen, Hilden) gegeben und die Probe auf Qiagen-Säulchen auftragen. Nach einmaligem Zentrifugieren wurde die Membran zweimal mit 700 μ l PE Puffer (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen, Hilden) gewaschen. Durch zweimalige Zugabe von 30 μ l Elutionspuffer EB (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen, Hilden) wurde die nun gereinigte und markierte cDNA von der Membran gelöst. Nach diesem Vorgang wurden die Proben wiederum in einer Univapo 150 H für etwa eine Stunde einrotiert.

2.2.5 Hybridisierung

Die Hybridisierung umfasst Prähybridisierung, Hybridisierung und Posthybridisierungswaschungen.

Die getrocknete und markierte Probe wurde in 62 μ l Hybridisierungspuffer (50% Formamid, 5-fach SSC, 0,1% SDS, 2% Lachssperma DNA (w/w) (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)) aufgenommen und für drei Minuten bei über 90°C denaturiert, damit später keine Farbflecken auf dem Slide durch ausgefällte Proben oder Farbstoffe entstehen. Die denaturierten Proben wurden für eine Minute bei maximaler Umdrehung zentrifugiert. Der Überstand wurde auf den bereits prähybridisierten Slide (2.2.3) aufgetragen und luftblasenfrei mit einem Deckgläschen bedeckt. Der Slide kam zur Hybridisierung in eine mit Alufolie (Lichtschutz) umwickelten Hybridisierungskammer (Bio-Rad Laboratories GmbH, München). Nach 16 bis 20 Stunden Hybridisierung in

einem auf 42°C erwärmten Hybridisierungssofen (Hybrid 2000, H. Sauer, Reutlingen) wurde zuerst das Deckglas in einem 42°C warmen, wenig stringenten Waschpuffer (1x SSC und 0,2% SDS) abgewaschen. Dann wurde der Slide in einem lichtgeschützten Falcon Tube (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA) wiederum in einem 42°C warmen wenig stringenten Waschpuffer für vier Minuten unter Schütteln gewaschen, weitere vier Minuten in hoch stringenten Waschpuffer (0,1x SSC und 0,2% SDS) und zweimal zwei Minuten in hoch stringenten Waschpuffer (0,1x SSC ohne SDS). Danach wurde der Slide noch einmal in Millipore Wasser gewaschen und bei 150xg für mindestens 1,5 Minuten zentrifugiert.

2.2.6 Detektion und Bildanalyse

Der GenPix 4000A (Axon Instruments, Sunnyvale, USA) scannt simultan zwei Wellenlängen nach Anregung des Arrays durch Laserlicht. Als Scannersoftware wurde GenPix Pro 4.0 von Axon Instruments (Sunnyvale, USA) FLA 8000 Version 1.3. genutzt. Die Slides wurden mittels GenPix Pro 4.0 normalisiert und mittels Acuity 4.0 statistisch ausgewertet.

Das prinzipielle Layout war schon durch das Spotten vorgegeben. Diese Information wurde bei der Definition der Spots durch Analysesoftware genutzt. Die Definition der Spots im gescannten Bild wurde im Prinzip über ein idealisiertes Modell des Microarrays durch ein GenPix Array List-File, welches Identitätsnummer und Name der einzelnen Gene enthält in Übereinstimmung mit den gescannten Spots gebracht. Über dieses wurde auch die Segmentation vorgenommen, also die Klassifizierung von Pixeln als Spot oder Hintergrund. Mit Hilfe von GenPix Pro 4000A erfolgte eine adaptive Segmentation, wobei für jeden Spot ein variabler Kreisdurchmesser eingestellt wurde.

Die absolute Menge an hybridisierter DNA in einem Spot war proportional zur totalen Fluoreszenz in einem Spot. Die Spotintensität wurde durch Aufsummierung der Pixelintensitäten innerhalb der Spotmaske berechnet. Weitere Berechnungen basieren auf dem Verhältnis der Fluoreszenzintensität der beiden Farbstoffe zueinander, wobei das Verhältnis der durchschnittlichen Pixelintensität berechnet wurde.

Die Hintergrundintensität war wichtig, da die gemessene Spotintensität durch unspezifische Hybridisierungen oder Eigenfluoreszenz des Trägermaterials beziehungsweise von Chemikalien beeinflusst werden konnte. GenPix Pro 4.0 berechnete die mediane Intensität des lokalen Spotumkreises.

2.2.7 Auswertung der Transkriptdaten

2.2.7.1 Normalisierung

Die Normalisierung dient zur Korrektur von systematischen Unterschieden. Sie können durch unterschiedliche Intensitäten der Fluoreszenzfarbstoffe, unterschiedliche Ausgangsmengen an markierter cDNA, Unterschiede zwischen der Probenintensität auf einem Objektträger oder zwischen den diversen Objektträgern entstehen.

Zur Normalisierung mittels GenPix Pro 4.0 wurden die Genspots verwendet, die die folgenden Eigenschaften erfüllten:

1. Die Spots waren nicht mit „Bad“, „Absent“ oder „Not found“ gekennzeichnet.
2. Die Spots hatten in beiden Wellenlängen mehr als 55% der Pixel über dem Hintergrund plus einer Standardabweichung.
3. Spots, deren ID Nummer nicht mit „empty“ beschriftet waren.
4. Spots, deren Pixelintensität der beiden Wellenlängen über 500 war.
5. Das Bestimmtheitsmaß des aktuellen Regressionsverhältnisses für beide Wellenlängen war über 0.5.
6. Die Pixellichtsättigung der Spots war unter 3%.

Anhand der ausgewählten Gene wurden alle Gene auf dem Array normalisiert. Eine wichtige Voraussetzung war, dass nur eine relativ kleine Anzahl von Genen signifikant differentiell exprimiert und eine relative Symmetrie zwischen über- und unterexprimierten Genen bestand.

2.2.7.2 Datenauswertung

Die ersten Schritte in der Auswertung des Datenmaterials in einem Microarrayexperiment war die Erzeugung numerischer Informationen. Da eine extrem hohe Datenmenge anfiel, wurde insbesondere die bioinformatische Methoden zur weiteren Verarbeitung und Auswertung ausgewählt. Die statistische Analyse der Daten wurde mittels Acuity 4.0 durchgeführt.

Die Genexpression wurde in \log_2 Ratio angegeben. Der \log_2 Ratio ist der Logarithmus zur Basis 2 vom Verhältnis der Mediane. Das Verhältnis der Mediane wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Verhältnis der Mediane} = \frac{\text{Hintergrund} - \text{Mediane der Pixelintensität der 2. Wellenlänge}}{\text{Hintergrund} - \text{Mediane der Pixelintensität der 1. Wellenlänge}}$$

Des Weiteren wurde ein Variationskoeffizient ermittelt und die Anzahl der Slides angegeben, auf denen ein Transkriptspiegel gemessen wurde.

Zur eigentlichen Auswertung wurden nur Spots herangezogen, die einen Variationskoeffizienten unter 50 aufwiesen und mindestens auf der Hälfte der zu analysierenden Slides zu sehen waren. Diese Transkriptwerte sind in dieser Arbeit immer dunkel (dunkelgrün beziehungsweise dunkelrot) markiert. Außerdem wurden die Transkriptwerte hell markiert (hellgrün beziehungsweise orange), die auf mindestens $\frac{3}{4}$ der Slides zu sehen waren.

2.2.7.3 Clusteranalyse

Mittels Clusteranalysen lassen sich eventuelle Transkriptmuster bildlich veranschaulichen. In dieser Arbeit wurden sie mit Hilfe der Auswertungssoftware Acuity 4.0 hergestellt.

In der Biologie werden Clusteralgorithmen meist zur Konstruktion phylogenetischer Stammbäume verwendet. Das Hierarchische Cluster im Microarrayexperiment dient zur Identifizierung transkriptionell regulierter Gene (hier Einfluss von Stressfaktoren). Die Gene werden unabhängig von ihrer biologischen Bedeutung in Beziehung gesetzt. Der daraus resultierende Baum stellt Gene mit ähnlichem Expressionsmuster zusammen, wohingegen er Gene mit unterschiedlichem Expressionsmuster weit auseinander liegen lässt. Genauso kann ein phylogenetischer Stammbaum für die unterschiedlichen Behandlungen oder Probennahmezeitpunkte hergestellt werden. Die SOMs (nicht hierarchisches Cluster) gruppieren Gene, die einen ähnlichen Verlauf im Transkriptspiegel aufweisen. Dabei werden n (hier neun) der markantesten Genexpressionsmuster herausgesucht und ähnliche Muster nebeneinander gestellt (TAMAYO et al., 1999). Wichtig in der Abbildung ist vor allem der aus dem Graphen ersichtliche Transkriptspiegelverlauf. Es ist eine zweidimensionale Analyse, die auf einem originalen von KOHONEN (1990) entwickelten Algorithmus basiert.

2.2.7.4 Maschinelles Lernen mit Hilfe von Support Vektor Maschinen

Die Methode gehört in den Bereich der statistischen Lerntheorie. Mit Hilfe mathematischer Algorithmen werden dabei Muster in hochdimensionalen Datensätzen gesucht. Insbesondere lassen sich Datensätze auf solche Regelmäßigkeiten hin untersuchen, die zuvor festgelegte Unterschiede in den Versuchsszenarien (zum Beispiel verschiedene Pflanzenbehandlung oder auch verschiedene Genklassen) widerspiegeln. Im günstigsten Fall können dann diejenigen Merkmale extrahiert werden, die eine möglichst gute Klassifikation nach dem jeweiligen Versuchsszenarium ermöglichen (SFB 607 TEILPROJEKT C7: LASSER et al., 2007).

Im vorliegenden Fall sollten aus den verschiedenen funktionellen Genklassen qualitative Übereinstimmungen oder Verschiedenheiten erkannt werden. Eingesetzt wurden normalisierte Datensätze verschiedener Klassifikation (Sonnen- und Schattenblätter unter Ozon beziehungsweise nach Insektenbefall; Misch- und Monokultur unter Ozon; 1x CO₂, 2x CO₂ und *Phytophthora citricola* Infektion). Die Datensätze wurden daraufhin untersucht, zu welchen Probennahmezeitpunkten Werte gemessen wurden, an denen die jeweilige Klassifikation am besten abzulesen war. Anhand der vom Programm bestimmten Prognosegenauigkeiten (das heißt der Trefferquoten, die das Programm bei der Zuordnung der zu den jeweiligen Zeitpunkten gemessenen Werte zur Klassenzugehörigkeit erzielte) wurden die Probennahmezeitpunkte in eine Reihenfolge gebracht.

Dazu wurde ein bestimmter Anteil zufällig gewählter Gene aus den funktionellen Klassen als Trainingsdatensatz benutzt. Das Programm lieferte eine Vorhersage der Klassifikation der übrigen Gene und gab an, wie viel Prozent der Gene es richtig beziehungsweise falsch eingeteilt hatte. Das Merkmal mit der größten Trefferprognose wurde herangezogen und wiederum mit anderen Werten verglichen und so weiter. Die Merkmalskombination mit der größten Prognose-sicherheit wurde ausgewählt.

2.3 Bestimmung genomischer DNA mittels quantitativer *Real-Time*-PCR (qPCR)

2.3.1 DNA-Isolation aus Mycel von *Apiognomonía errabunda*

Das Pilzmycel wurde mit Hilfe eines Skalpell vom Agar entfernt und im flüssigen Stickstoff gemörsert. Für die DNA-Isolation wurden 100 mg gemörserte Probe mit 500 µl Chloroform und 500 µl CTAB (1% EtSH) versetzt. Die Proben wurden mit 220xg für 15 Minuten bei 8°C geschüttelt und für 10 Minuten mit 9000xg bei 4°C zentrifugiert.

Zu 600 µl Überstand wurden 100 µl Nucleon™ Phyto Pure™ DNA-Extraktion Resin und 500 µl Chloroform gegeben, fünf Minuten bei 8°C mit 220xg geschüttelt und für 10 Minuten und 9000xg bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurden 500 µl Überstand mit 250 µl Isopropanol versetzt, vorsichtig gemischt und für 10 Minuten auf Eis gestellt. Danach wurde 10 Minuten mit 9000xg bei 4°C zentrifugiert. Auf das so gewonnene Pellet wurde 1 ml 70% EtOH/0,1 M NaAc gegeben, vorsichtig gemischt und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Überstand wurde verworfen, 1 ml 80% EtOH zum Pellet gegeben und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der Überstand abgegossen und 1 ml 100% EtOH zum Pellet gegeben. Der Über-

stand wurde abermals verworfen. Nachdem das Pellet getrocknet war, wurde es in 100 μ l 1x TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) aufgenommen und zum Lösen für 20 Minuten bei 8°C mit 72xg geschüttelt.

2.3.2 DNA-Isolation aus Buchenblättern

Die DNA-Isolation aus den Buchenblättern erfolgte nach einem Protokoll von BAHNWEIG et al. (2005). Zu 100 mg Probe wurden 1 ml eisgekühlte Lösung A (50% MeOH, 1% EtSH, 20% CaCl₂ (Merck, Darmstadt)) zugegeben und für 10 Minuten bei 8°C geschüttelt, dann für 10 Minuten mit 9000xg bei 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zur Probe wurde 1 ml Lösung B (50% MeOH, 1% EtSH) gegeben, wiederum für 10 Minuten bei 8°C geschüttelt und dann 10 Minuten mit 9000xg und bei 4°C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand vollständig entfernt und 500 μ l Lösung C (CTAB-Puffer (100 mM Tris, 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl, 2% CTAB, pH 8), 2% PVP, 1% EtSH) und 350 μ l Benzylchlorid (Merck, Darmstadt) zum Pellet gegeben. Nach 10-minütigem Schütteln bei 8°C wurden 300 μ l Chloroform und 100 μ l Nucleon™ Phyto Pure™ DNA-Extraktion Resin zugegeben, für fünf Minuten weiterschüttelt und dann für 10 Minuten mit 9000xg und bei 4°C zentrifugiert.

Der Überstand wurde zu 600 μ l DNA Bindungspuffer Nr. 3 des Scil DNA Kits (Scil Diagnostics, Viernheim) pipettiert. Zu diesem Gemisch wurden noch 30 μ l Magnetkugeln pipettiert, gemischt und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Danach wurden die Proben für zwei Minuten in einen Magnetic Separator (Scil Diagnostics, Viernheim) gestellt. Das entstandene Pellet wurde je einmal mit 800 μ l Scil DNA Kit Waschpuffer Nr. 4, Scil DNA Kit Waschpuffer Nr. 5, 900 μ l 70% EtOH und 950 μ l Scil DNA Kit Waschpuffer Nr. 6 gewaschen. Abschließend wurde die DNA durch Zugabe von 100 μ l Scil DNA Kit Elutionspuffer Nr. 7 und Inkubation für 10 Minuten bei 55°C resuspendiert.

2.3.3 Messung der genomischen DNA mittels qPCR

Zur Bestimmung des genomischen *A. errabunda*-DNA-Gehaltes wurden *A. errabunda* spezifische Primer in der Konzentration von 10 μ M eingesetzt (BAHNWEIG et al., 2005): APIO-f1 (5' TTT GTG AAT ACT ACC TAA AAT G3') und APIO-r3 (5' AGA TAT TAC AAA AAC AAG AGT3') (Invitrogen, Karlsruhe).

Die isolierte DNA aus Pilzmycel wurde auf 20 ng/ μ l eingestellt und eine Verdünnungsreihe (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000) erstellt. Je 10 μ l der verdünnten DNA, 1,5 μ l LiChrosolv®

Wasser, 12,5 µl Absolute™ qPCR Sybr Green® ROX Mix, 0,5 µl *A. errabunda* spezifischer Vorwärts- und Rückwärtsprimer wurden zur Messung der Standardkurve eingesetzt.

Zur Probenmessung wurden 1 µl DNA, 10,5 µl LiChrosolv® Wasser, 12,5 µl Absolute™ qPCR Sybr Green® ROX Mix, 0,5 µl *A. errabunda* spezifischer Vorwärts- und Rückwärtsprimer eingesetzt. Mit Hilfe der Standardkurve wurden die Konzentrationen der genomischen Pilz-DNA in der Probe bestimmt. Die Thermocyclerbedingungen waren: 50°C für zwei Minuten, 95°C für 10 Minuten, 40 Zyklen bei 95°C für 15 Sekunden, 60°C für eine Minute.

2.4 Bestimmung des Transkriptspiegels durch quantitative *Real Time* Reverse Transkriptase-PCR (qRT-PCR)

2.4.1 RT-Ansatz

Verwendet wurden Random Hexamerprimer, die an verschiedenen RNA-Stellen hybridisieren. Die Spezifität wurde über die Verwendung spezifischer Primer erreicht.

Es wurden 3,4 µg Gesamt-RNA, 1 µl Random Hexamerprimer (50-250 ng, Amersham Biosciences, Freiburg, Germany), 1 µl dNTPs zu 12 µl Gesamtvolumen mit der entsprechenden Menge an Wasser aufgefüllt. Der Ansatz kam für fünf Minuten bei 65°C in den Thermocycler und anschließend eine Minute auf Eis. Pro Ansatz wurden 8 µl First Strand-Puffer (5-fach), 4 µl DTT, 1 µl Superscript und 1 µl RNase-OUT dazugegeben. Der Ansatz wurde für 10 Minuten auf 25 °C erwärmt und mindestens eine Stunde oder über Nacht bei 42 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Inkubation für 15 Minuten bei 75°C gestoppt. Der Reaktionsansatz wurde für die qRT-PCR 1:20 verdünnt.

2.4.2 qRT-PCR

Die PCR wurde in einem 25 µl Ansatz mit dem Absolute™ qPCR Sybr Green® ROX Mix (ABgene, Hamburg) durchgeführt. Der Versuchsansatz setzte sich aus 10,5 µl der verdünnten cDNA (1:20) und je 1 µl spezifischer Vorwärts- und Rückwärts-Primer zusammen (Tabelle 6). Die PCR wurde im ABI Prism 7500 unter folgenden Bedingungen durchgeführt: ein Zyklus bei 50°C für eine Minute, ein Zyklus bei 95°C für 15 Minuten, 40 Zyklen bei 95°C für 15 Sekunden, 60°C für eine Minute. Nach jedem Lauf wurde eine Schmelzkurve gemessen, um zu testen ob sich eventuell Primerdimere gebildet hatten.

Tabelle 6: Primersequenzen, der zur qRT-PCR verwendeten Primer

Primer	Vorwärts	Rückwärts
Aquaporin	CGGTGCTGTGAAAGCTCTTG	TTCCAGCAAAAACCATGAAG
WRKY	TTTCTACTGGACACGCTGG	GATGGCTACGTTGGAGGAA
Caffeic acid O-methyltransferase Gruppe 1	AACAATGGCATGGCTGGTCT	CCACCACCAACATCAATCAATG
Katalase	GACGGTGCCTTTGGGTATCA	GTGCTCCAGGGTCGGATCT
Glutathion-S-Transferase	GTGGACCTTGCTCTTGTCACC	GCCCATGCAATAATCTTGGG
Ultraviolet-B-repressible Protein mRNA	CTGTCACGGCCTTTTCCTTAAG	CCAGAGGCAGGCTTCAAGTG
Chalkonsynthase	CCCACCTTGTCTTTTGACACC	AGTCAGCTCCAGGCATGTCC
Ethyleneresistent1	TTATTGAAGAGTCCATGCGGG	CAACATTCTGCTCCATGAGCTG
Glutathionperoxidase	AGCCAGGGAACAATGAGCAG	CCTTGAAGCGGGTACAAGCA
Glutathionsynthetase	CGGAAAACGTTGGCAGAAAT	TCCATCGGGTAGAAGCTCTCC
Hydroxyproline-rich glycoprotein family protein	TTCAGTTGCCAATGACATGACA	AAAGCTGATGTGGAACTCAAGGT
18S RNA	AAACGGGTACCACATCCAAG	CCTCCAATGGATCCTCGTTA
chlorophyll a/b binding protein	GGCTGCCACACATTGATGAG	TGGACTTAGAAGAAGAGAGGACTGATG
PR1	CACTGTGATTGAGGGTATG	GCTCTTCAACACAGATCCTC
Actin	AGAGATTCCGTTGCCAGAA	TGGATTCCAGCAGCTTCCA
G3PDH1	TCAACCTTGCTGTGTCGAAGA	GAGGCTTGAGCAGCATGGA
alpha tubulin	TGAGTTGCTCAGGGTGGAAAA	CGAGCCCACTGTATCGAT
Chitinase-like protein	CAGCTTTTCCATAGTTGATGCCAA	CGCTCCTGGAGTGCATACT
LHC chlorophyll a/b binding protein 1	GCTTAAGGTGAAAGAATTAAGAATGG	CGGTTACAATAGCCTGCACAAA
LHC chlorophyll a/b binding protein 2	TCCAAGGGCCCTTTCC	CGCCTTGCCATGTTTTCC
Glutathion-S-transferase	GGGATCCCTAATGCTTCCAAA	GATGACACATCGGTTGATTATTATCA
BAT1	AAACATATCTCCTCCAACATGCTCTA	ACTTTGATTTGCCTCATGTGACA
Nuclear-encoded chloroplast ribulose-5-phosphate 3-epimerase	CGCAAGTTGCATTGAATATGATC	AAGAGGAATCAAAGCCAGCAAAA
18S RNA	ACTTTGATTTGCCTCATGTGACA	CCGGGATAAGATGTTGCGGTTT
ACC Oxidase1e	CGCGACCACGCTAATCG	CCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAG
ACC Oxidase c	AGCCATGAAAGCCGTTGAAT	CTTCTTCTGTAGTAAAATTGCGATCTTA
ACC Oxidase b	GCCTTGACAGACAATTAGAAAACC	CCAATTGCAACCGCTTGAT

Der Transkriptgehalt wurde nach der Comperativen C_T - Methode ermittelt, dafür wurde der Log_2Ratio nach der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Log}_2\text{Ratio} = (CT_{\text{Behandlung}} - CT_{\text{Referenz}}) - (CT_{\text{Kontrolle}} - CT_{\text{Referenz}})$$

Für jeden Versuch wurde ein neu ermitteltes Referenzgen zur Normalisierung mitgeführt (STUERZENBAUM und KILLE, 2001; OLBRICH et al., 2007submitted).

2.4.3 Primerdesign

Die Primersequenzen wurden mit Hilfe der Software Primer Express 2.0 (Applied Biosystems, Darmstadt) ermittelt, wobei darauf geachtet wurde, dass die Primer eine Länge von bis zu 30 bp hatten und das Amplifikat zwischen 50 und 100 bp groß war. In den Primern wurde eine G-Anhäufung vermieden und die letzten Nukleotide am 3'-Ende hatten weniger als zwei G und/oder C Basen.

Die Primer wurden auf eine Konzentration von 100 pmol/ μl (Stammlösung) eingestellt und 1:10 verdünnt, so dass pro PCR 2,25 μl /25 μl Ansatz eingesetzt wurden.

2.4.4 Effizienz

Um die Transkriptspiegel mittels der Comperativen Ct-Methode zu berechnen, muss die Effizienz von Ziel- und Referenzgen annähernd gleich sein (SOONG et al., 2001). Zum Testen der Effizienz der Primer wurde eine Templateverdünnung durchgeführt und die Regressionskoeffizienten für die verschiedenen zu testenden Gene bestimmt. Die Proben wurden aus den laufenden Versuchen genommen und unter denselben Bedingungen gemessen wie die Versuchsproben (2.4.1 und 2.4.2). Bei zweifacher Verdünnung sollte der Zyklusabstand bei 100-%iger Effizienz eins betragen, daraus ergibt sich eine Geradensteigung von -1 bei ansteigender Konzentration.

2.4.5 Statistische Auswertung der qRT-PCR-Ergebnisse

Um die Beeinflussung der Transkriptspiegel durch die unterschiedlichen Behandlungen zu testen, wurde eine Varianzanalyse durchgeführt. Aufgrund der Datenstruktur wurde ein linear gemischtes Modell (nlme) benutzt, welches die Gruppierung der einzelnen Bäume berücksichtigt. Zur Erstellung der ANOVA-Tabellen wurde das nlme-Paket (PINHEIRO et al., 2005) des R-Systems (RDEVELOPMENTCORETEAM, 2005) benutzt. Des Weiteren wurde auf Varianzhomogenität und unabhängige Verteilung und Normalverteilung der Residuen geprüft.

2.5 Inhaltsstoffanalysen

2.5.1 Sekundäre, Zellwand-gebundene und lösliche Pflanzeninhaltsstoffe

Die Analyse sekundärer Zellwand-gebundener sowie löslicher Pflanzeninhaltsstoffe wurde nach der Methode von BAHNWEIG et al. (2005) bestimmt. Dafür wurden mindestens 100 mg bei -80°C eingefrorener Probe mit 140xg unter Stickstoffvorkühlung homogenisiert und 60 mg der Probe eingewogen.

2.5.1.1 Methanolextraktion

Die eingewogenen Proben wurden mit 500 µl Methanol (MetOH) für Chromatographie versetzt, gleichmäßig durchmischt und für etwa 12 Stunden unter Ausschluss von Tageslicht im Kühlschrank extrahiert. Anschließend wurden die Proben wieder gut gemischt, etwa 20 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und für fünf Minuten bei 9000xg zentrifugiert.

Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bei -80°C bis zur HPLC-Messung gelagert.

Der Rückstand wurde mit 20 mg Celite und mit 1 ml MetOH für Chromatographie überschichtet und bei -80 °C gelagert.

2.5.1.2 Zellwandhydrolysen

Der Rückstand der MetOH-Extraktion wurde auf Raumtemperatur erwärmt und dreimal mit 1 ml MetOH, einmal mit 0,5 ml DMSO und einmal mit 1 ml Aqua Bidest gewaschen. Der gewaschene Rückstand wurde jeweils mit Lösungsmittel versetzt, gemischt, 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln stehen gelassen und vier Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen.

Das Sediment wurde in 150 µl NaOH mit 100 mM Ascorbinsäure und 0,2% NaBH₄ gelöst. Nach einer Stunde Inkubationszeit, bei 30°C im Dunkeln, wurden die Proben gemischt und mit 150 µl 1,5 M Ameisensäure versetzt und geschüttelt. Danach wurden 300 µl MetOH für die Chromatographie in die Proben pipettiert, diese gemischt und 10 Minuten mit 1000xg zentrifugiert. Die Überstände wurden bis zur HPLC-Messung bei -80°C gelagert.

2.5.1.3 HPLC-Messung der löslichen Inhaltsstoffe

Die Extrakte wurden auf Raumtemperatur erwärmt und gemischt. Dann wurden 75 µl Extrakt mit 25 µl Aqua Bidest versetzt, 10 Minuten mit 1000xg zentrifugiert und in HPLC-Mikroeinsätze pipettiert. Pro Lauf wurden 10 µl Probe injiziert. Die löslichen Inhaltsstoffe wurden mit der folgenden HPLC-Anlage (Tabelle 7) quantifiziert:

Tabelle 7: HPLC- Komponenten

HPLC-Software:	Gold 7.11 Beckmann, Coulter (Düsseldorf)
Pumpe:	114 M
Autosampler:	LC-507e
UV-Detektor:	Beckman Diodenarray-Detektor 168
	Channel A: 280 nm
	Phenole: Scan Mode 2, Spektren von 250 bis 450 nm

Es wurde eine Reverse Phase Säule (Bischoff (Leonberg) Spherisorb ODSII, Type NC, 5 µm mit Vorsäule) verwendet. Die Säule wurde auf 20°C im Mistral LC-Säulenofen (SunChrom Wissenschaftliche Geräte GmbH, Friedrichsdorf) temperiert.

Die verwendeten Lösungsmittel und das Gradientenprogramm sind Tabelle 8 und Tabelle 9 zu entnehmen. Die Durchflussgeschwindigkeit betrug 1ml/Minute. Berechnet wurden die Inhaltsstoffe über Eichsubstanzen und Peakflächen.

Tabelle 8: Lösungsmittelzusammensetzung

Laufmittel A:	980 ml Bidest +20 ml 5% Ammoniumformiat (Sigma) in Ameisensäure (p.A., Merck)
Laufmittel B:	882 ml Methanol f.d. Chromatographie +96 ml Bidest +20 ml 5% Ammoniumformiat in Ameisensäure

Tabelle 9: Gradientenprogramm für lösliche Inhaltsstoffe

Gradient:	5 min lang isokratisch auf Lösung A In 50 min linear auf 50 % Lösung B In 30 min linear auf 100 % Lösung B 5 min lang isokratisch auf 100 % Lösung B In 1 min zurück auf Lösung A
-----------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

2.5.1.4 HPLC-Messung der Zellwand-gebundenen Inhaltsstoffe

Das Hydrolysat wurde auf Raumtemperatur erwärmt, gemischt und für 10 Minuten bei 1000xg zentrifugiert. 90 µl des Hydrolysates wurden in HPLC-Mikroinsätze pipettiert. Injiziert wurden 10 µl. Säule HPLC-Komponenten und Lösungsmittel sind Punkt 2.5.1.3 zu entnehmen. Das Gradientenprogramm ist in Tabelle 10 aufgezeichnet. Berechnet wurden die Inhaltsstoffe über Eichsubstanzen und Peakflächen.

Tabelle 10: Gradientenprogramm für zellwandgebundene Inhaltsstoffe

Gradient:	5 min lang isokratisch auf Lösung A In 40 min linear auf 100 % Lösung B 5 min lang isokratisch auf 100% Lösung B In 5 min zurück auf Lösung A
-----------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

2.5.2 1-Aminocyclopropan-1-Carbonsäure (ACC)

Die Bestimmung von ACC und Konjugaten (Gesamt-ACC minus freies ACC) erfolgte nach einer modifizierten Methode von TUOMAINEN et al. (1997).

Das bei -80°C gelagerte Probenmaterial wurde unter Stickstoffvorkühlung gemörsert. 200 mg der gemörserten Probe wurden mit 1,2 ml gekühlter zweiprozentiger Metaphosphorsäure (v/v) und einer Spatelspitze Polyvinylpyrrolidonphosphat (PVPP) versetzt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Von den mit 20000xg für 15 Minuten bei 4°C zentrifugierten Proben

wurden 1000 μl Überstand nochmals zentrifugiert und davon 900 μl Überstand zur Bestimmung von ACC bei -80°C eingefroren.

Für die Bestimmung der freien ACC wurden 200 μl Überstand, 500 μl Aqua Bidest und 100 μl einer 10 mM Quecksilberlösung gemischt und das Röhrchen gasdicht verschlossen. Durch Zugabe von 200 μl Oxidationslösung (gesättigte NaOH-Lösung und NaOCl-Lösung im Verhältnis 1:3 v/v) wurde ACC zu Ethylen umgesetzt. Das Ethylen wurde nach 13 Minuten unter kräftigem Schütteln am Gaschromatographen (Autosystem XL, Perkins, Elmer, Überlingen) mit einer Portpack Q-Säule (Durchmesser 1/8", Länge 60 cm) und einem Flammen-Ionisations-Detektor (FID) gemessen. Die Temperaturen des Injektors betrug 150°C , die der Säule 40°C und des Detektors 200°C . Als Trägergas diente Stickstoff mit einer Flussrate von 30 ml/Minute. Die Flussraten der für den Detektor benötigten Gase betragen 450 ml/Minute für synthetische Luft und 45 ml/Minute für Wasserstoff. Die Retentionszeit für Ethylen betrug unter diesen Bedingungen 0,75 und für Ethan 1,1 Minuten. Zur Berechnung der Ethylenwerte wurde eine Eichung mittels eines Ethylenstandardgases (1056, Messer, Griesheim) durchgeführt. 1 ml dieses Standardgases (entspricht 0,0641 nmol Ethylen) wurde dreimal in den Gaschromatographen eingespritzt und der Mittelwert der erhaltenen Flächeneinheiten gebildet. Die Ethylenkonzentration wurde nach der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Freies ACC [nmol/g FG]} = 0,0641 \text{ nmol/ml} * \frac{\text{Probenpeakfläche}}{\text{MW (Eichpeakfläche)}} * \frac{6,5 \text{ ml}}{\text{Einwaage [g]}}$$

0,0641 nmol Ethylen in 1 ml Standardgas 6,5 ml entspricht dem Gesamtvolumen der Glasröhrchen

Eichpeakfläche wurde aus drei Wiederholungen der Einspritzung von 1 ml Ethylenstandard ermittelt

Um den Gesamt-ACC-Gehalt (freie ACC und ACC-Konjugate) zu bestimmen, wurden die Proben zunächst durch Zugabe von 40 μl 12 N HCl für drei Stunden bei 120°C hydrolysiert. Nachdem die Proben abgekühlt waren, wurde die Hydrolyse mittels 240 μl 2 N NaOH gestoppt. Danach wurden die Proben auf Eis gestellt und mit 220 μl Aqua Bidest und 100 μl Quecksilberchlorid versetzt. Die Umsetzung von ACC zu Ethylen erfolgte wie oben beschrieben durch Zugabe von Oxidationslösung. Der ACC-Gehalt wurde mittels folgender Formel berechnet.

$$\text{Gesamt-ACC [nmol/g FG]} = \frac{\text{Probenpeakfläche}}{\text{Eichpeakfläche}} * \text{ACC Standard [nmol]} * \frac{\text{Endvol [ml]} * \text{Gasraum Glasröhrchen [ml]}}{\text{Testvol [ml]} * \text{Testvol Gas [ml]} * \text{Einwaage [g]}}$$

Der Gehalt an konjugiertem ACC wurde durch Subtraktion des Gehaltes an freiem ACC von der Gesamt-ACC-Menge bestimmt.

2.5.3 Ligninbestimmung als Ligninthioglycolsäure

Lignin wurde nach der Methode von ANEJA et al. (2006) bestimmt. Unter Stickstoffvorkühlung wurde Blattmaterial mit Celite (1:2) versetzt und homogenisiert. Danach wurden 80 mg Homogenat viermal mit 1 ml MeOH für die Chromatographie gewaschen. Pro Waschschrift wurden die Proben für 30 Minuten auf dem Schüttler bei Raumtemperatur und im Dunkeln inkubiert und danach für 10 Minuten mit 1000xg zentrifugiert.

Nach dem letzten Waschschrift wurde das MeOH sorgfältig entfernt und das Sediment zweimal mit Aqua Bidest gewaschen. Zu dem gewaschenen Sediment wurde nach Abnehmen des Wassers 1 ml 2 N HCl und 0,3 ml Thioglycolsäure gegeben und gründlich vermischt. Danach wurde der Ansatz für vier Stunden bei 95°C im Heizblock im Abzug inkubiert. Nach einer Stunde wurden die Proben kurz gemischt. Nachdem die Proben abgekühlt waren, wurden sie nochmals gemischt und 10 Minuten mit 1000xg zentrifugiert. Der Rückstand wurde dreimal mit 1 ml Wasser gewaschen.

Die Pellets wurden in 1 ml 0,5 N NaOH resuspendiert, über Nacht geschüttelt und dann 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß dekantiert, der Vorgang nochmals wiederholt und die Überstände vereinigt.

Zum Ausfällen der Ligninthioglycolsäuren wurden die Überstände mit 0,3 ml konzentrierter HCl (32%) angesäuert und mindestens vier Stunden (über Nacht) in den Kühlschrank gestellt. Nach 10-minütiger Zentrifugation mit 31000xg wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt. Das Pellet wurde 30 Minuten in einer Univapo H 150 getrocknet und in 1 ml 0,5 N NaOH gelöst. Die Lösung wurde 10 Minuten zentrifugiert. Ein Aliquot der erhaltenen Lösung wurde im Verhältnis 1:20 mit 0,5 N NaOH (sauerstofffrei) verdünnt und am Photometer (Ultrospec 3100 pro, UV/Visible Spectrometer, Amersham Pharmacia Biotech, Cambridge) bei 280 nm (Quarz-Küvette) gemessen. Als Leerwert wurde 0,5 N NaOH verwendet.

Die erhaltenen Werte waren reine Vergleichswerte und bezogen sich auf eine externe Eichung (1mg der Celite Organosolv Lignin Mischung entspricht 2,77 Absorption) mit Lignin „organosolv“ (Sigma Aldrich, St. Louis, USA). Der Ligningehalt wurde mittels folgender Formel berechnet:

$$[\%] \text{ Lignin vom TG} = \frac{\text{Absorption}_{\text{Probe}} - \text{Absorption}_{\text{Leerwert}} * 20}{\text{Einwaage}_{\text{FG/Celite}} [\text{mg}] * 200} * \frac{1}{2,77} * \frac{\text{Einwaage}_{\text{FG}} [\text{mg}]}{\text{Einwaage}_{\text{TG}} [\text{mg}]} * 100$$

Faktor
Verdünnungsfaktor
Faktor mittels Eichung mit Lignin „organosolv“ ermittelt

2.5.4 Zellwandpräparation

Das bei -80°C gelagerte Pflanzenmaterial wurde gemörsert. Zu circa 80 mg (exaktes Gewicht notieren) gemörsertem Material wurden 600 µl eiskalter Morpholinoethansulfonsäure-Puffer (50 mM Morpholinoethansulfonsäure, 30 mM Ascorbinsäure, 1,5% v/v Triton-X-100, pH 5) gegeben. Nach 10 Minuten zentrifugieren bei 20000xg wurde das Sediment mit jeweils 600 µl 100 mM NaCl, MetOH und Aqua Bidest bei Raumtemperatur gewaschen, um zytoplasmatische Komponenten zu entfernen. Das gewaschene Material wurde über Nacht bei 90°C getrocknet. Gravimetrisch wurde die Zellwandfraktion bestimmt.

2.5.5 Bestimmung der Zellulose

Zu der gewaschenen und getrockneten Zellwandfraktion (2.5.4) wurden 1,2 ml (UPDEGRAFF, 1969) Reagenz (Essigsäure, Salpetersäure und Wasser 8:1:2 v/v/v) zugegeben. Danach wurden die Proben für eine Stunde in einen Heizblock bei 100°C gestellt, die Proben wurden alle 10 Minuten gemischt und danach für 10 Minuten bei 20000xg zentrifugiert. Der unlösliche kristalline Zelluloserest wurde fünfmal mit 600 µl Aqua Bidest gewaschen und bei 90°C getrocknet. Der Zellulosegehalt wurde wiederum gravimetrisch bestimmt.

2.6 Chlorophyllfluoreszenz

Die Fluoreszenzmessung diente zur Analyse des physiologischen Blattzustandes. Die photosynthetisch aktive Strahlung wird von den Antennenpigmenten absorbiert und auf die Reaktionszentren der Photosysteme (PS) I und II übertragen. Dort wird sie entweder photochemisch in den Primärprozessen der Photosynthese genutzt oder in Form von Wärme, Fluoreszenz oder Phosphoreszenz abgegeben (MAXWELL und JOHNSON, 2000; GRAMS, 2005).

Mit Hilfe der Pulsamplitudenmodulation-Fluoreszenzmethode (PAM) kann die maximale Quantenausbeute im PS II bestimmt werden. Zum einen wurde die Chlorophyllfluoreszenz mit einer MINI-PAM (Walz, Effendrich) gemessen. Dabei wurde pro Baum ein punktueller Bereich gemessen. Zum anderen wurden Bilder der Fluoreszenzstrahlung erstellt. Diese Messung wurde mit einem Imaging PAM Chlorophyll Fluorometer (Walz, Effendrich) durchgeführt, wobei eine Lichtsättigungskurve über den PAR-Bereich (400-700 nm) gemessen wurde.

2.7 Pflanzenmaterial

2.7.1 Klimakammerversuch - Buchen in ambienter und 2x ambienter CO₂-Atmosphäre und *Phytophthora citricola* Infektion

Der Klimakammerversuch wurde innerhalb des SFB-607 von der Gruppe A6 (F. Fleischmann/W. Oßwald) durchgeführt.

2.7.1.1 *Phytophthora citricola* Isolat

Das Pathogen *P. citricola* Swada (Isolat BoGa) wurde von der Rhizosphäre befallener Buchen und Eichen (Bayern) isoliert. Die Kulturen wurden in einem V8 Fruchtagar bei 20°C angezogen. Das Inokulum wurde aus einem sterilen Substrat, welches aus Vermiculit, Weizen, Kalzium und Karbonat und V8 Frucht besteht, hergestellt. Das Inokulum war beim Einsetzen vier Wochen alt (FLEISCHMANN et al. 2001).

2.7.1.2 Probenmaterial

Im April 2003 wurden je sechs einjährige Buchen (Ballenpflanzen) von der Baumschule Laufen (Kempten) in mit Höglwald gefüllte Container gepflanzt. Anschließend standen die Sämlinge im GSF-Gewächshaus unter Umgebungsbedingungen, wobei in einer Kammer eine 2x ambiente CO₂-Atmosphäre herrschte. Zur Überwinterung wurden die Buchen unter die Pergola ins Freiland gestellt und kamen für das Jahr 2004 wiederum in die Gewächshäuser der GSF unter den oben genannten Bedingungen und zur Überwinterung unter die GSF-Pergola. Am 4. März 2005 wurden die Pflanzencontainer in das Gewächshaus des Fachgebietes für Obstbau (TUM) und am 14. März 2005 in die Klimakammern des Lehrstuhls für Grünlandlehre (TUM) transportiert. Die Klimadaten sind Tabelle 11 zu entnehmen.

Die Inokulation mit *P. citricola*-Isolat wurde an sechs Positionen im Container mit je 20 ml Inokulum (Vermiculite, Weizen, V8-Gemüsesaft, Kalziumkarbonat) durchgeführt. Danach wurden

die Container für 38 Stunden, jeweils zu Beginn der Lichtperiode geflutet. Geerntet wurde 24 Stunden, 41 Stunden sowie nach zwei, drei, vier, sechs, 11 und 16 Tagen.

Tabelle 11: Kulturdaten der einzelnen Klimakammern in Freising

Kammer	1	2	3	4
CO ₂	1x ambient	1x ambient	2x ambient	2x ambient
Infektion	Nein	Ja	Ja	nein
Beginn Dunkelphase	10 Uhr	12 Uhr	12 Uhr	10 Uhr
Temperatur	20 °C konst.	20 °C konst.	20 °C konst.	20 °C konst.
Licht Tag	14 h	14 h	14 h	14 h
Licht Nacht	10 h	10 h	10 h	10 h
Lichtintensität Tag	260,1µE	254,1µE	255,7µE	250,7µE
Lichtintensität Nacht	0 µE	0 µE	0 µE	0 µE

2.7.2 Expositions-kammerversuch - Ozonfluss auf Buchen in Mono- und Mischkultur mit Fichte

Der Expositions-kammerversuch wurde wiederum im Rahmen des SFB 607 vom Teilprojekt B5 (W. Ritter/T. Grams) durchgeführt, um das Konkurrenzverhalten von Buchen zu untersuchen. Dafür wurden im April 2004 dreijährige Buchen- und Fichtensämlinge (Buchensaatgut 810-24, Bad Griesbach) in einen Container, jeweils in Mono- und Mischkultur, gepflanzt (Abbildung 9). Jeder Container enthielt insgesamt 20 Sämlinge.

Danach wurden sie unter 1x ambient Ozon und 2x ambient Ozon im Gewächshaus kultiviert. Überwintert wurden die Sämlinge unter der GSF-Pergola. Ab dem 15.05.05 standen sie in den Expositions-kammern der GSF, unter denselben Ozonbedingungen.

Am 07.06.05 wurde für sieben Stunden ein Ozonpeak von 200 ppb gegeben. Die erste Probenahme fand bereits eine Woche vor dem Ozonpeak statt, also am 02.06.05 um 9 Uhr. Weitere Probenahmen waren zum Zeitpunkt t₁=0h, also genau vor dem Ozonpeak am 07.06.05 um 9 Uhr. Darauf aufbauend Zeitpunkt t₂=7h, genau nach dem Ozonpeak und t₃=24h, t₄=48h und t₅=72 Stunden.

Beprobt wurden nur die Buchen in der jeweiligen Mono- und Mischkultur. Pro Variante und Probenahmetermin wurde von neun Bäumen aus drei Containern jeweils ein Blatt entnommen. Aus diesen neun Blättern wurden drei Mischproben hergestellt, um für die Microarrayanalysen genug Probenmaterial zu erhalten.

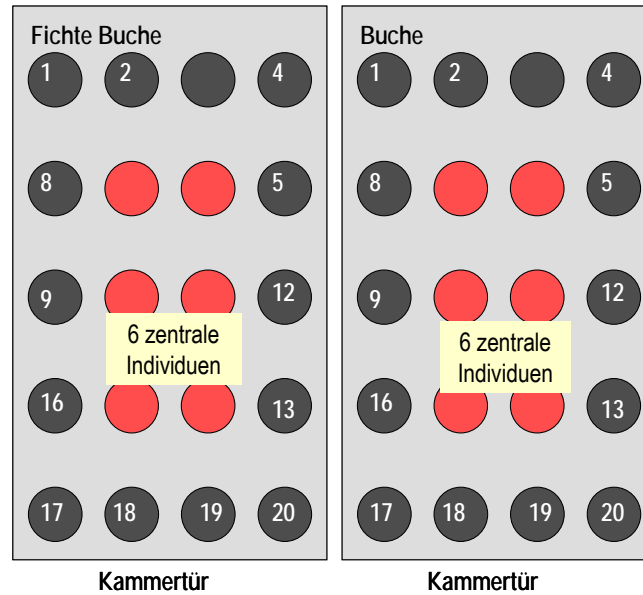


Abbildung 9: Containerbelegung bei Buche in Misch- und Monokultur. Anmerkung: für die Transkriptanalysen wurden nur die Randbäume verwendet.

2.7.3 Gewächshausversuch - Einfluss von 2x ambienten CO₂, 2x ambientem Ozon und *Apiognomonía errabunda*

2.7.3.1 Kultivierung der Pilze

A. errabunda wurde auf Malzmedium (3% Malzextrakt, 1,5% Agar) bei Raumtemperatur im Dunkeln angezogen. Nachdem die Platte nach etwa zwei Wochen vollständig bewachsen war, wurde ein etwa 1 cm großes Stück herausgeschnitten und auf Haferflockenagar (2% Haferflocken, 1,5% Agar) wiederum bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach etwa drei Wochen war der Haferflockenagar komplett bewachsen. Um eine Sporenbildung zu erreichen, wurde die vollständig bewachsene Platte ans Tageslicht gestellt.

2.7.3.2 Gewinnung der Pilzsporen

Pro Platte wurden 10 ml Abschlämmflösung (62,5 mM KH₂PO₄, 5,5 mM Glucose (Merck, Darmstadt), 0,1% Tween 20 (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)) aufgetragen und das Mycel mit einer Öse abgekratzt. Die entstandene sporenhaltige Flüssigkeit wurde in 50 ml Falcontube überführt und mit Abschlämmflösung auf 50 ml aufgefüllt. Um die Sporendichte zu ermitteln wurden 3x 1µl Tropfen ausgezählt.

2.7.3.3 Infektion der Gewächshausbuchen mit *Apiognomonina errabunda*

Ab dem Mai 2004 bis August 2006 wurden jeweils etwa 20 Buchen der Herkunft 810-24 (Schlegel Baumschule, Riedlingen) unter ambienten, 2x ambienten Ozon und 2x ambienten CO₂-Bedingungen kultiviert. Jeweils ab Oktober bis Mitte April standen die Buchen zur Überwinterung unter der GSF-Pergola. Am 29.05.06 wurden je die Hälfte der fünfjährigen Buchen mit *A. errabunda* infiziert (Abbildung 10, Zusammenarbeit mit Arbeitsgruppe Bahnweg).

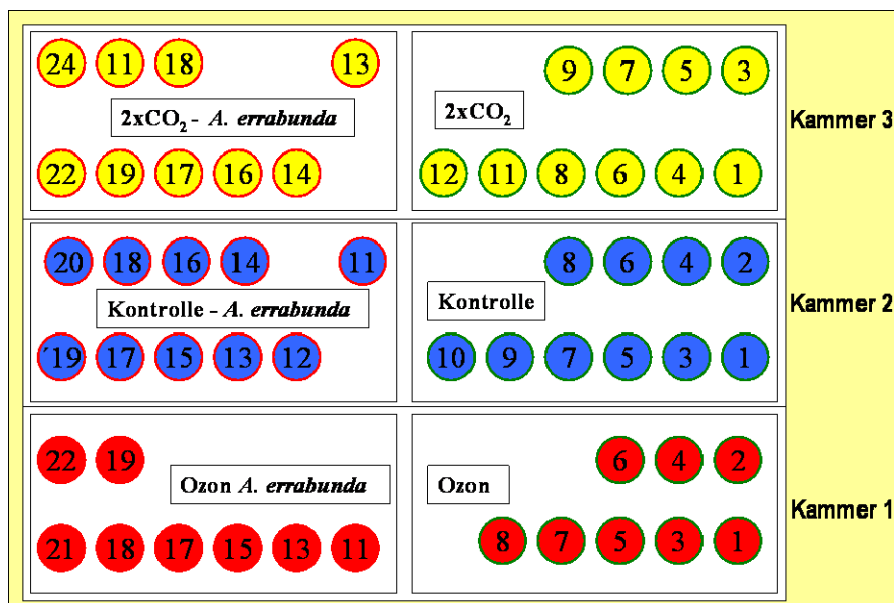


Abbildung 10: Aufstellung der Buchen im Gewächshaus (gelb = 2x ambientes CO₂, blau = ambiente Bedingungen, rot = 2x ambientes Ozon, rot umrandet = *A. errabunda* infiziert, grün = uninfiziert).

Zur Infektion wurden alle Buchen mit einer 60 l Plastiktüte überzogen. Die Kontrollbuchen der jeweiligen Atmosphäre (2x ambient CO₂, 2x ambient Ozon, ambiente Bedingungen) wurden mit etwa 100 ml Abschlämlösung eingesprüht, die zu infizierenden Buchen der unterschiedlichen Atmosphären mit etwa 100 ml sporenhaltiger Lösung (32000 Sporen/ml). Um eine gute Infektion zu garantieren, wurden die Bäume an einem kühlen bedeckten Tag nachmittags behandelt. Für die Gewährleistung eines guten Infektionsmilieus blieben die Bäume über Nacht mit den Tüten überstülpt, die dann am nächsten Morgen entfernt wurden.

Proben wurden am 29.05.06 und 19.06.06, jeweils um 9 Uhr genommen. Vom ersten Probennehmertermin wurden Transkriptanalysen erhoben, um den Einfluss von erhöhtem Ozon und erhöhtem CO₂ zu analysieren. Vom letzten Probennehmerzeitpunkt wurde der Gehalt an genomischer *A. errabunda*-DNA bestimmt und der Einfluss von *A. errabunda* analysiert.

2.7.4 Lysimeterversuch - 2x ambiente Ozonbehandlung

Der Lysimeterversuch wurde innerhalb des SFB 607 durch das Teilprojekt B9 (M. Schloter/J. C. Munch, GSF) durchgeführt. Die Lysimeterzylinder wurden im Jahr 2000 mit Boden aus dem Höglwald gefüllt. Das Bodenmaterial wurde Horizont-weise entnommen und entsprechend der Horizontierung des Standortes sukzessive in die Zylinder gefüllt, verdichtet und mit Schaumstoff abgedeckt. Ein Lysimeter hatte eine Fläche von einem Quadratmeter. Im November 2002 wurden pro Lysimeter vier dreijährige Buchen und zwischen den einzelnen Lysimetern in derselben Dichte zusätzliche Buchen gepflanzt. Im Jahr 2003 wurde der Oberboden der Lysimeterzylinder durch frischen Originalboden (horizontiert, inklusive Streuschicht) aus dem Höglwald ersetzt.

Jedes Lysimeter wurde mit Teflonschläuchen mit jeweils neun Düsen (neun auf der westlichen Seite und neun auf der östlichen Seite der zu begasenden Lysimeter) ausgestattet. Ab Herbst 2002 standen vier Lysimeter unter 1x ambienten und 2x ambienten Ozonbedingungen (bis 150 ppb). Die einzelnen Lysimeter wurden über Plexiglaswände getrennt (Abbildung 11). Die genaue Versuchsanordnung ist (SCHLOTTER et al., 2005) zu entnehmen.



Abbildung 11: Lysimeterbuchen 2003 (Foto von E. Bieber)

Im Jahr 2005 wurden 10 Bäume der Randbepflanzung am 27.07.05, 11.08.05, 23.09.05 und 11.10.05 beprobt. Dafür wurden jeweils zur selben Tageszeit - 9 Uhr - drei Blätter pro Baum genommen. Die Proben wurden zur Inhaltsstoffanalyse sowie zur Transkriptbestimmung genutzt. Im Frühjahr 2005 waren die Buchen stark mit Wollläusen befallen, dass manuelle Bekämpfung und eine zweimalige Spritzung mit Spruzit (Neudorff, Emmerthal) nicht ausreichte. Aus diesem Grund wurde ein systemisches Mittel (Confidor) eingesetzt, weshalb die erste geplante Probenahme im Juni ausfiel.

2.7.5 Versuch Kranzberger Forst - 2x ambiente Ozonbehandlung an Sonnen- und Schattenblättern

Die etwa 60-jährigen Buchen (*Fagus sylvatica* L.) des Kranzberger Forstes (Freising) wurden experimentell unter einer 2x ambienten Ozonkonzentration gehalten (WERNER und FABIAN, 2002). Dafür wurde über ein Freiluftozonbegasungssystem zusätzliches Ozon in die Kronen der Buchen geleitet, wobei Konzentrationen von über 150 ppb vermieden wurden, um akute Ozonschäden zu verhindern. Die Ozonkonzentration wurde über 160 passive Sensoren gemessen (PRETZSCH et al., 1998; NUNN et al., 2002). Es wurden jeweils pro Probennahmezeitpunkt vier Blätter pro Baum jeweils aus Sonnen- und Schattenkrone entnommen. Dafür wurden fünf Bäume unter ambienten und fünf Bäume unter 2x ambienten Ozonkonzentrationen beprobt. Die Erntetermine waren im Jahr 2005 am 12.05., 21.06., 02.08., 13.09., 07.10. und im Jahr 2006 am 27.06., 02.08., 12.09. und 18.10.

2.7.6 Versuch Kranzberger Forst - Ozonbehandlung, Minierung und Lochfraß von *Rhynchaenus fagi* L. und Gallenbildung durch *Mikiola fagi* an Sonnen- und Schattenblättern

Die Blattproben wurden von M. Schardt und R. Schopf (TUM) genommen. 2005 wurden von den unter 2.7.5 beschriebenen Buchen aus dem Kranzberg Forst Blattproben genommen. Es wurden Sonnen- und Schattenblätter unter ambienten Ozon und 2x ambienten Ozon beprobt, die folgende Schadbilder aufwiesen: Gallenbildung durch *M. fagi*, Lochfraß durch den adulten *R. fagi* L. und Blattminen durch sein Imago.

3 ERGEBNISSE

3.1 Buchen cDNA-Microarray

Folgend werden die Resultate der Datenbankanalyse und die Microarraybelegung vorgestellt.

3.1.1 Frühe und späte SSH-Bank

Durch subtraktive suppressive Hybridisierung (SSH) entstanden 1139 Klone, die sequenziert wurden. Unterschieden wurde zwischen der frühen (nach vier, acht, 24 und 32 Stunden) und späten (nach zwei, drei, vier, fünf, sieben, neun, 12, 15, 22, 26 und 30 Tagen) SSH-Bank. Die Datenanalyse mittels BlastN/X ergab für 681 Klone Homologien, für 521 Klone konnte keine Zuordnung getroffen werden. Einen Gesamtüberblick bietet die Tabelle 12. Die Qualität der Homologien ist Tabelle 13 zu entnehmen.

Tabelle 12: Gesamtübersicht der durch BlastN/X gefundenen Homologien der frühen und späten SSH-Bank

	Klone	Homologie	keine Homologie
SSH-früh	618	386	286
SSH-spät	521	295	281
gesamt	1139	681	567

Tabelle 13: Qualität der durch BlastN/X gefundenen Homologien für die frühe und späte SSH-Bank

Gleichheit	E-Wert	BlastN/X	in %
Sehr hoch	0	14	2,1
Hoch	E-174 bis E-100	68	10,0
Mittel Niedrig	E-99 bis E-10	438	64,3
Niedrig	E-9 bis E-1	161	23,6
Total		681	100,0

Die ESTs (Expressed Sequence Tags) der beiden SSH-Banken mit Homologien wurden mittels der MIPS-Datenbank (<http://mips.gsf.de/proj/thal/db>) in funktionelle Klassen eingeteilt (Abbildung 12). Zu den frühen Zeitpunkten reagierten vermehrt ESTs der Proteinsynthese (18%), der Zellstruktur (15%) und des Energiestoffwechsels (11 %) auf die Ozonexposition. Zu den späten Zeitpunkten waren vor allem ESTs des Sekundärstoffwechsels (29%) durch Ozon beeinflusst, wobei die OMT (O-Methyltransferase) bis zu 92% der ESTs des Sekundärstoffwechsels ausmachte. Auch 12% der ESTs der funktionellen Gruppe Abwehr/Krankheit reagierten zu den späten Zeitpunkten auf die erhöhte Ozonkonzentration.

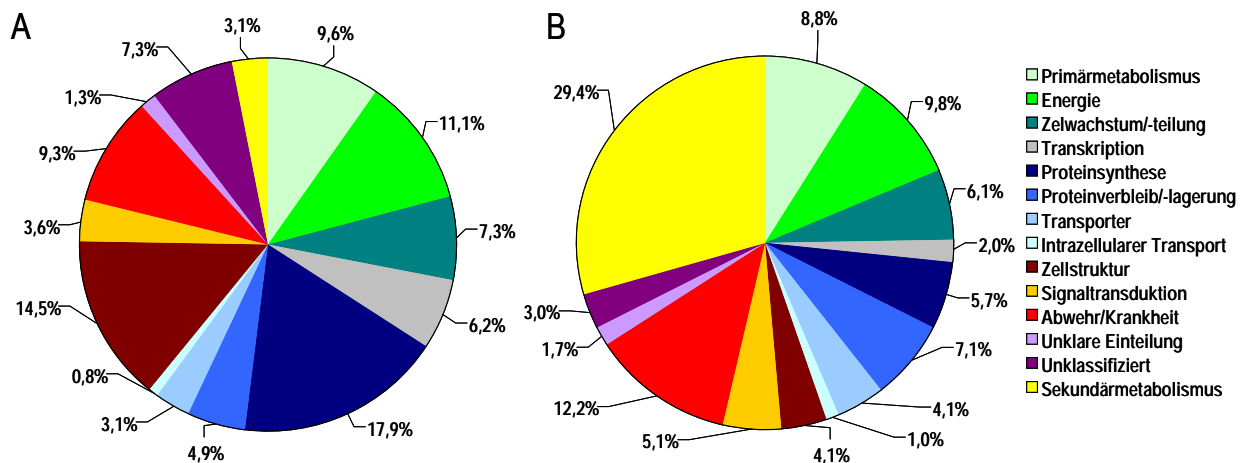


Abbildung 12: Funktionelle Einteilung der bekannten ESTs (Angabe in Prozent; A=frühe SSH; B=späte SSH)

3.1.2 Microarraybelegung

Innerhalb der funktionellen Gruppen wurden redundante Klone entfernt (Abbildung 13). Berücksichtigt wurden bei der Microarraybelegung zusätzlich 28 Gene des Shikimatstoffwechsels (BETZ, 2005) und 11 Gene des Stickstoffstoffwechsels (Gunda Stöcken, Freiburg). Somit waren insgesamt 489 unbekannte ESTs und 419 bekannte ESTs auf dem Microarray.

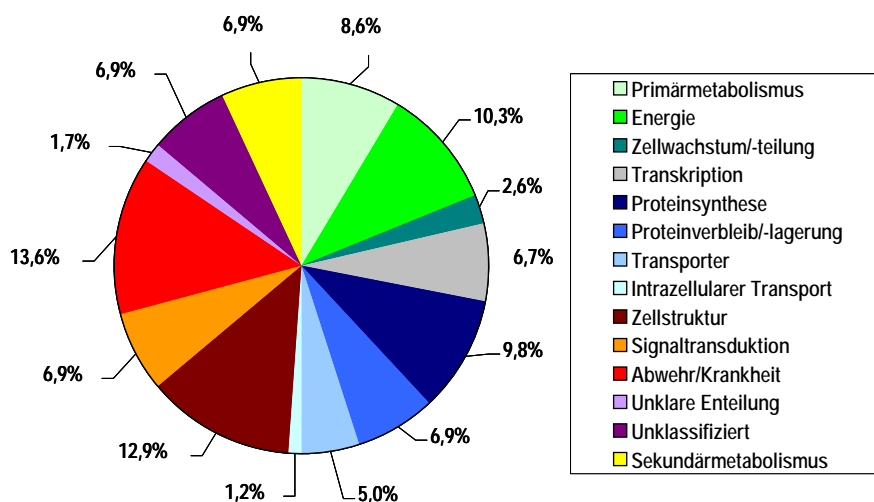


Abbildung 13: Microarraybelegung, funktionelle Einteilung der 489 bekannten ESTs (Angabe in Prozent)

3.2 Klimakammerversuch - CO₂-Einfluss

Untersucht wurde der durch erhöhte CO₂-Konzentration (680 ppm) beeinflusste Transkriptspiegel der dreijährigen Buchen des Klimakammerversuches. Dafür wurde je cDNA von sechs Bäumen aus der erhöhten CO₂-Atmosphäre mit jener der Buchen unter normalen CO₂-Bedingungen der Zeitpunkte 24 Stunden und 16 Tage nach der *P. citricola*-Infektion auf einem Slide hybridisiert.

3.2.1 Bestimmung des Transkriptspiegels mittels Microarray

Zur Auswertung wurden die mRNA-Spiegel herangezogen, die mindestens auf zwei Drittel der Slides waren und deren Korrelationskoeffizienten einen Wert unter 50 aufwiesen (dunkel) oder deren Transkriptspiegel sich aus sechs Medianen zusammensetzten (hell).

Tabelle 14: Durch CO₂-veränderte Transkriptspiegel (log₂Ratio; n=6) der dreijährigen Klimakammerbuchen zu den Zeitpunkten 24 Stunden und 16 Tagen nach der *P. citricola*-Infektion (rot = induziert, CV<50; dunkelgrün = reprimiert, CV<50; orange = induziert, n=6; hellgrün = reprimiert, n=6).

Genname	24h	16d
Primärmetabolismus		
Polysaccharide und Zucker		
Glycoside hydrolase, family 1	0.12	-1.07
Kofaktoren		
Putative reduced viability upon starvation protein 161	1.44	-0.96
Energie		
Elektronentransport		
NADP-dependent malic protein-like mRNA (a)	-1.01	0.24
Zellwachstum/-teilung - Wachstumsfaktor		
Nine 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 1	x	-2.37
Proteinsynthese - ribosomale RNA		
18S ribosomal RNA	-0.54	5.91
18S ribosomal RNA	2.22	-0.65
Partial 16S rRNA	1.90	-1.31
Transporter - ABC-Typ		
ABC transporter family protein	-1.75	0.08
BAT1	-1.77	-0.75
Zellstruktur		
PS II type I chlorophyll a/b-binding protein (lhcb1*7) a	1.53	x
PS II type I chlorophyll a/b-binding protein(lhc b1*7) b	1.26	-1.43
Light harvesting chlorophyll a/b binding protein	1.37	x
Signaltransduktion		
Sonstige		
ACC oxidase 1 a	-1.47	-0.44
Kinase		
Wall-associated kinase	x	-1.16
Abwehr/Krankheit		
Stressantwort		
Abscisic stress ripening protein homolog	-0.54	1.35
Putative drought-induced protein RDI	-5.14	-1.63
Sonstige		
Chitinase-like protein	0.03	1.52
Sekundärmetabolismus		
Phenylpropanoide/ Phenole		
Chalconsynthase	0.61	-1.08
Sonstige		
(-)-isopiperitenone reductase	-0.39	-1.92
Unklare Einteilung		
Expressed protein	-5.18	-0.11

Nach 24 Stunden war der mRNA-Spiegel von neun ESTs durch die Exposition mit 2x ambientem CO₂ verändert (Tabelle 14). Induziert waren ein Kofaktor des Primärmetabolismus, zwei ribosomale RNAs und drei ESTs der Chloroplastenzellstruktur. Zwei Transporter des ABC-Typs und ein EST des Elektronentransportes wiesen reduzierte mRNA-Menge auf. Nach 16 Tagen zeigten eine Glykosidhydrolase der Familie 1 und ein Wachstumsfaktor einen reduzierten Transkriptspiegel. Die 18S ribosomale RNA war zu diesem Zeitpunkt induziert.

ESTs der Signaltransduktion waren sowohl nach 24 Stunden (ACC Oxidase 1a) als auch nach 16 Tagen (Wand-assoziierte Kinase) reprimiert. Nach 16 Tagen wiesen zwei ESTs (Chalkonsynthase und (-)-Isopiperitenonreduktase) des Sekundärmetabolismus durch die erhöhte CO₂-Exposition einen reduzierten mRNA-Spiegel auf, genauso das putative durch Trockenheit-induzierte Protein. Durch erhöhtes CO₂ stieg der Transkriptspiegel von zwei weiteren ESTs der Abwehr/Krankheit nach 16 Tagen an.

Fünf unbekannte ESTs reagierten nach 24 Stunden mit einem Anstieg und vier mit einem verminderten Transkriptspiegel auf erhöhtes CO₂. Ein EST unklarer Einteilung wies nach 24 Stunden einen verminderten Transkriptspiegel auf. Nach 16 Tagen waren je zwei unbekannte ESTs reprimiert und induziert.

3.2.2 Verifizierung der Transkriptspiegel mittels qRT-PCR

Die durch den Microarray ermittelten Daten wurden mit Hilfe der qRT-PCR weitestgehend bestätigt (Tabelle 15). Einzige Ausnahme bildete der BAT1 Transporter, der im Microarray einen verminderten Transkriptspiegel aufwies, in der qRT-PCR allerdings erhöht war.

Tabelle 15: CO₂-beeinflusste Transkriptspiegel der dreijährigen Klimakammerbuchen zu den Zeitpunkten 24 Stunden und 16 Tagen nach der *P. citricola*-Infektion, Vergleich der qRT-PCR- und Microarraydaten (qRT-PCR: orange = induziert, nicht signifikant, gelb = unverändert, Microarray: gelb = unverändert; dunkelgrün = reprimiert, CV<50; orange = induziert, n=6; hellgrün = reprimiert, n=6).

Genname	24h			16d		
	qRT-PCR Mittelwert	Micro- Median	array	qRT-PCR Mittelwert	Micro- Median	array
GADPH1	0.73	0.49	0.34	-0.44	-0.30	-0.09
Chalconsynthase	1.04	1.45	0.61	-0.41	-0.34	-1.08
BAT 1	1.36	3.51	-1.77			
PS II type I chlorophyll a/b-binding protein (lhcb1*7) a	1.56	1.48	1.53			
PS II type I chlorophyll a/b-binding protein(lhc b1*7) b	1.66	1.57	1.26			

3.2.3 Inhaltsstoffanalysen

Von sechs Bäumen je Behandlung (1x ambient CO₂ und 2x ambient CO₂) wurde zu den Zeitpunkten 24 Stunden und 16 Tagen nach der *P. citricola*-Infektion der prozentuale Lignin-, Zellwand- und Zellulosegehalt vom Trockengewicht bestimmt.

Der prozentuale Ligninanteil war in beiden CO₂-Varianten zu dem Zeitpunkt 24 Stunden annähernd gleich (Abbildung 14). Allerdings hatte die Variante 1x ambient CO₂ nach 16 Tagen den höchsten Ligninanteil und die Variante 2x ambient CO₂ den niedrigsten.

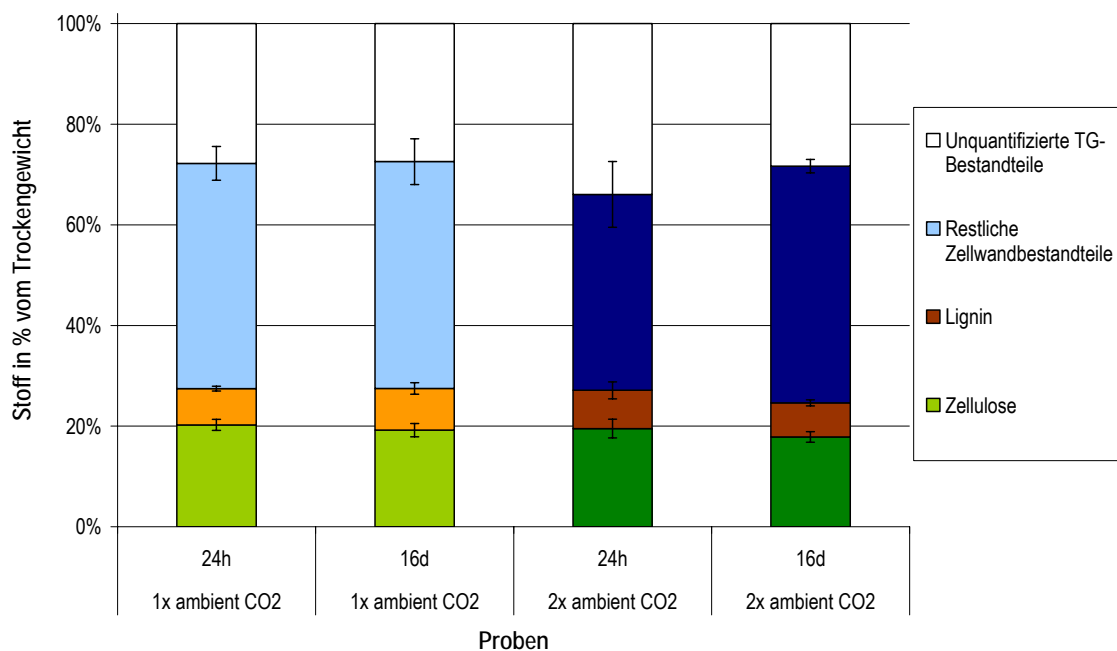


Abbildung 14: Lignin, Zellulose und restlichen Zellwandbestandteile in Prozent vom Trockengewicht der dreijährigen Klimakammerbuchen unter 1x ambientem CO₂ (hell) und 2x ambientem CO₂ (dunkel) zu den Zeitpunkten 24 Stunden und 16 Tagen. Die Zellulose nahm signifikant im Laufe der Zeit ab ($p < 0,05$).

Der prozentuale Zellwandgehalt vom Trockengewicht nahm tendenziell in der 2x ambienten CO₂-Atmosphäre zu, wohingegen unter ambienten Bedingungen die Gehalte gleich blieben. Der prozentuale Zellulosegehalt sank über den Versuchsverlauf in beiden CO₂-Behandlungen signifikant.

3.3 Klimakammerversuch – Einfluss von *Phytophthora citricola*

Der Einfluss der *P. citricola*-Infektion auf die Transkriptebene wurde in den dreijährigen Buchen des Klimakammerversuches unter den unterschiedlichen CO₂-Bedingungen untersucht. Zwei Bäume wurden jeweils gepoolt, so dass drei infizierte Proben mit drei nicht infizierten auf einem

Slide hybridisiert wurden. Zur Farbstoffkontrolle wurde nochmals ein Probenpaar als Farbtasch analysiert. So wurden pro Probennahmezeitpunkt vier \log_2 Ratios erhalten.

3.3.1 Transkriptspiegelbestimmung mittels Microarray

Zur Auswertung wurden die Transkriptspiegel herangezogen, die auf mindestens zwei Drittel der Slides zu sehen waren und deren Korrelationskoeffizienten einen Wert unter 50 aufwiesen (dunkel markiert) oder deren Transkriptspiegel sich aus vier Medianen von je vier verschiedenen Slides zusammensetzten (hell markiert).

Innerhalb des Primärmetabolismus waren durch die *P. citricola*-Infektion in den Buchensämlingen des normalen CO_2 -Milieus ESTs des Aminosäurestoffwechsels, die Acetohydroxysäureisomero-reduktase nach sechs Tagen und das Polyglutamin-bindende Protein nach drei bis 16 Tagen reprimiert und nach 24 und 41 Stunden induziert (Tabelle 16). Des Weiteren war die Acetyl-Co-A Acetyltransferase nach 41 Stunden reprimiert und nach drei Tagen induziert. Ein Kofaktor wies nach sechs und 11 Tagen einen verminderten Transkriptspiegel auf.

In den Blättern der Bäume unter erhöhter CO_2 -Konzentration waren ESTs des Aminosäurestoffwechsels die Acetohydroxysäureisomero-reduktase nach 41 Stunden, die β -Untereinheit 9 der Anthranilatsynthase nach vier Tagen und das Polyglutamin-bindende Protein nach 24 und 41 Stunden sowie drei, vier und 11 Tagen reprimiert. Allerdings war das Polyglutamin-bindende Protein zu drei Zeitpunkten (24 Stunden, sechs und 11 Tagen) induziert.

Nach 24 Stunden hatte der Kofaktor Thiazol-biosynthetisches Enzym a eine erhöhte mRNA-Menge. Darüber hinaus war eine Glykosidhydrolase der Familie 1 nach fünf Tagen induziert. Einen verringerten Transkriptspiegel wiesen die Phosphoglyceromutase (Calvin-Zyklus) nach 41 Stunden und die Amidase nach vier Tagen auf.

Glutaredoxin, Malatdehydrogenase und glyoxysomale Malatdehydrogenase des Energiestoffwechsels waren vier Tage nach der Infektion mit *P. citricola* in den Buchen unter normalen CO_2 -Bedingungen reprimiert (Tabelle 16). Des Weiteren wies die Malatdehydrogenase nach 16 Tagen einen erhöhten mRNA-Spiegel auf. Im 2x ambienten CO_2 war sie nach 11 Tagen reprimiert.

ESTs des Elektronentransportes reagierten zuerst in den Blättern der erhöhten CO_2 -Konzentration auf die *P. citricola*-Infektion. So waren die AAA ATPase nach 24 Stunden und das Cytochrom P450-ähnlichem Protein nach zwei Tagen induziert. Die γ -Untereinheit der ATP-Synthase zeigte nach 41 Stunden einen verringerten Transkriptspiegel. In der normalen CO_2 -Atmosphäre war

eine ATPase der Plasmamembran nach vier Tagen induziert und die Proteolipiduntereinheit der vakuären Proton ATPase reprimiert. Die Oxidoreduktase und die AAA ATPase wiesen nach 11 Tagen eine reduzierte mRNA-Konzentration auf.

ESTs der Photosynthese waren in den Bäumen unter normaler CO₂-Konzentration anfänglich induziert und zu den späteren Zeitpunkten reprimiert. Wohingegen in dem erhöhten CO₂-Level 24 Stunden nach der Infektion die Kern-kodierte Chloroplastenribulose-5-Phosphat 3-Epimerase reprimiert und weitere ESTs der Photosynthese zu späteren Zeitpunkten induziert waren.

Tabelle 16: *P. citricola*-veränderte Transkriptspiegel (log₂Ratio) von ESTs des Primärmetabolismus und des Energiehaushaltes der unter 1x ambient und 2x ambient CO₂ kultivierten dreijährigen Klimakammerbuchen (rot = induziert, CV<50; dunkelgrün = reprimiert, CV<50; orange = induziert, n=4; hellgrün = reprimiert, n=4).

Genname	1xCO ₂								2xCO ₂							
	24h	41h	2d	3d	4d	6d	11d	16d	24h	41h	2d	3d	4d	6d	11d	16d
Primärmetabolismus																
Aminosäure																
Acetohydroxy acid isomeroeductase	0.21	0.35	0.82	-0.03	-0.31	-1.15	-1.28	-0.43	-0.94	-1.05	0.38	-0.45	-0.16	1.04	0.70	-0.49
Anthranilate synthase beta subunit 9	0.11	-0.24	x	1.37	-2.82	-1.41	0.45	x	x	-0.89	-0.07	0.11	-2.25	-0.20	-0.92	x
Polyglutamine binding protein variant 4	0.07	-1.00	-0.54	-0.09	0.24	0.47	-0.24	-0.13	-0.14	0.27	1.19	0.12	-0.93	-0.17	-1.61	-0.34
Polyglutamine binding protein variant 4	-0.34	-0.03	0.63	-1.23	-2.27	-1.84	-2.77	0.26	0.34	-1.99	-0.67	-0.13	-1.65	4.36	0.28	-1.90
Polyglutamine binding protein variant 4	1.32	-0.10	2.06	-1.81	-1.43	-0.38	-2.87	-4.12	1.69	-1.53	0.14	0.34	-2.73	0.67	-1.06	-3.62
Polyglutamine binding protein variant 4	0.32	-0.83	-0.05	0.02	-1.28	-0.25	-0.43	0.98	-0.50	-0.65	-0.25	-1.19	0.10	-0.10	-1.15	-0.83
Polyglutamine binding protein variant 4	-0.13	-0.89	1.38	-1.36	-0.78	0.65	-3.12	-0.83	-1.43	-1.94	-0.80	-0.42	-2.51	x	-0.30	-0.59
Polyglutamine binding protein variant 4	-0.15	-0.60	-0.85	-0.15	0.53	0.24	0.36	-0.44	-0.24	0.20	1.38	-0.13	-0.63	0.77	-1.22	0.26
Polyglutamine binding protein variant 4	-0.46	-0.13	-1.05	-0.62	-0.79	-0.22	-0.82	-0.77	-1.48	-1.04	0.63	0.17	-1.76	0.88	-0.20	0.17
Polyglutamine binding protein variant 4	0.00	-0.71	0.07	-0.53	-0.21	-1.07	-0.43	-1.05	-1.61	0.48	0.43	-0.59	-1.31	-0.46	0.41	0.71
Polyglutamine binding protein variant 4	-0.55	-0.51	3.04	-0.47	1.65	-2.10	-1.98	-3.22	-1.19	1.26	-1.23	-0.78	-1.57	0.36	-0.20	-0.04
Polyglutamine binding protein variant 4	-0.42	0.53	1.45	-0.74	-1.32	-1.41	-1.50	0.57	-0.51	-1.59	1.51	-0.42	-1.05	1.25	0.29	-0.07
Polyglutamine binding protein variant 4	-0.46	2.00	2.04	1.60	-3.37	-1.35	-2.03	x	1.25	-0.62	3.79	-1.16	-3.71	1.38	1.78	-0.06
Polyglutamine binding protein variant 4	-0.35	-0.48	x	0.42	0.38	-1.74	-0.24	-1.44	-1.88	-1.35	-1.76	-0.40	-2.76	-1.00	x	-0.37
Polyglutamine binding protein variant 4	-0.19	x	0.80	-0.38	-1.74	-1.00	-0.54	-0.72	-0.39	-1.10	0.41	-0.08	-0.92	-0.76	-0.59	2.87
Polyglutamine binding protein variant 4	0.99	0.94	0.84	-0.48	-1.18	-0.73	-0.41	1.04	-1.30	0.29	0.17	0.03	-0.14	-2.50	-1.59	-3.35
Zucker und Polysaccharide																
Glycoside hydrolase, family 1	0.60	-0.56	0.37	0.03	-0.04	-0.71	-0.65	-1.42	-0.17	-0.42	-1.42	-0.62	-0.47	1.17	0.58	-2.88
Phospoglyceromutase	0.06	-0.02	-0.32	-0.10	0.42	-0.12	0.48	-1.00	0.60	-1.43	0.58	-0.32	-0.66	0.57	-0.53	0.87
Lipid/Sterol																
Acetyl Co-A acetyltransferase	-0.67	-2.28	x	4.66	-5.63	-3.85	-1.06	-3.22	1.72	0.01	1.91	-2.50	x	-0.16	0.54	x
Amidase	-0.24	1.94	1.57	4.89	0.35	x	-1.16	0.37	x	x	1.65	0.76	-3.98	-0.27	x	3.75
Kofaktoren																
Putative reduced viability upon starvation protein 161	0.13	-0.52	0.20	-0.25	-0.53	-1.22	-1.59	-0.73	-0.16	-1.35	-0.21	-0.43	-0.78	0.26	0.29	-0.03
Thiazole biosynthetic enzyme a	0.19	0.64	-0.51	0.39	0.22	-0.21	0.34	-0.57	1.11	-0.05	-0.44	-0.11	0.48	-0.46	-0.48	0.46
Energie																
Glukoneogenese																
Glutaredoxin I	0.14	0.59	x	-0.78	-1.46	-0.96	-1.99	-0.05	2.36	-1.89	0.02	-0.47	1.33	0.89	-1.27	3.84
Zitronensäurezyklus																
Glyoxysomal malate dehydrogenase	-0.06	-0.04	x	-0.05	-1.03	-1.24	-0.47	-0.70	0.37	-0.39	0.16	-0.54	-1.09	1.85	-1.02	1.51
Malate dehydrogenase	-0.21	0.10	-0.09	-0.65	-1.68	-0.72	-0.66	1.09	x	-0.34	-0.02	0.09	-0.37	0.10	-1.42	1.50
Elektronentransport																
AAA ATPase	-0.02	-0.57	-0.03	-0.80	-0.49	-0.07	-1.18	-0.58	1.99	-0.40	0.83	-0.26	-1.96	1.43	0.85	-3.14
Cytochrome P450 like TBP	-0.46	-0.82	-0.78	-0.20	0.37	0.30	-0.23	-0.25	-0.25	0.07	1.13	-0.11	-0.29	-0.01	-0.74	0.06
Gamma subunit of ATP synthase	-0.58	0.15	-0.25	-0.34	0.55	0.29	0.40	-0.37	0.41	-2.34	-0.26	-0.10	-0.73	0.18	-0.18	-1.14
Oxidoreductase	0.06	0.56	x	-1.26	-1.79	-0.94	-1.58	0.40	-1.97	x	-0.47	-0.48	-0.65	-0.79	-0.57	0.12
Plasma membrane H ⁺ -ATPase	-0.01	0.10	0.17	0.05	1.47	-0.37	-0.04	-0.72	-0.35	-0.19	0.06	0.48	-0.17	0.12	1.14	-0.22
Vacuolar proton ATPase proteolipid subunit	0.08	0.23	-0.46	0.18	-1.48	-1.02	-0.65	x	x	-2.14	0.07	0.05	1.88	-1.49	x	0.53
Photosynthese																
Fructose-bisphosphate aldolase	0.06	0.06	-0.09	-0.27	-0.59	-1.30	-0.31	-0.24	1.12	-0.45	0.62	0.01	0.18	-0.35	-0.04	1.37
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH2)	-0.45	0.42	-0.54	0.05	-0.70	-1.01	-0.18	-2.75	-0.38	-0.99	-0.31	-0.21	-0.48	0.06	-0.12	1.92
Nonphosphorylating NADP-specific GAPDH	0.09	1.10	0.30	0.04	-0.11	0.35	-0.25	0.39	-0.59	-0.09	0.05	0.27	0.04	0.20	0.23	-0.13
Nuclear-encoded chloroplast ribulose-5-phosphate 3-epimerase	1.36	0.03	-0.03	0.57	0.55	-0.13	-1.57	-0.21	-1.47	-0.07	0.12	-0.90	0.03	1.04	0.77	-0.94
Thioredoxin	0.08	-0.75	0.17	-0.46	-1.53	-0.98	-0.44	-0.87	-3.66	-0.67	0.84	-0.19	-1.30	-0.57	-0.90	-0.55

ESTs des Zellwachstums und der Zellteilung, insbesondere der DNA-Synthese und Replikation, blieben in den Buchen (2x CO₂) durch die *P. citricola*-Infektion unbeeinflusst. Wohingegen in den

Buchensämlingen unter normalen CO₂-Bedingungen das Histon 3 nach 41 Stunden induziert und das Nukleosom-zusammensetzende Protein 1 nach vier Tagen reprimiert war (Tabelle 17).

Im normalen CO₂-Niveau zeigten ESTs der Rekombination und Reparatur vor allem nach drei, vier und 11 Tagen einen verminderten Transkriptspiegel. Das putative Cytochrom C Oxidaseprotein hatte 24 Stunden nach der Infektion einen erhöhten Transkriptspiegel, ebenso ein Pseudogen nach zwei Tagen. In der erhöhten CO₂-Konzentration war ein Pseudogen nach zwei Tagen reprimiert und das putative Cytochrom C Oxidaseprotein nach 16 Tagen induziert. Der Wachstumsregulator 9-Cis-Epoxycarotenoiddioxygenase 1 war nach 11 Tagen in den Buchen (1x CO₂) durch *P. citricola* reprimiert.

Tabelle 17: *P. citricola*-veränderte Transkriptspiegel (log₂Ratio) von ESTs des Zellwachstums, der Zellteilung und der Transkription der unter 1x und 2x ambient CO₂ kultivierten dreijährigen Klimakammerbuchen (rot = induziert, CV<50; dunkelgrün = reprimiert, CV<50; orange = induziert, n=4; hellgrün = reprimiert, n=4).

Genname	1xCO ₂								2xCO ₂							
	24h	41h	2d	3d	4d	6d	11d	16d	24h	41h	2d	3d	4d	6d	11d	16d
Zellwachstum/-teilung																
DNA-Synthese/Replikation																
Histone 3	0.03	1.13	0.68	0.19	-0.24	0.10	-0.32	-0.13	-0.28	-0.20	0.11	-0.29	-0.20	-0.15	-0.01	0.10
Nucleosome assembly protein 1	0.04	0.40	1.48	0.10	-1.35	-0.18	-0.58	-0.54	0.02	-0.16	-0.04	0.18	0.24	0.05	0.11	1.40
Rekombination und Reparatur																
Putative cytochrome C oxidase protein	-0.32	0.00	-0.35	-0.23	-0.87	-0.64	-0.01	x	-0.18	-0.12	0.11	-0.39	-0.37	-0.70	-0.58	1.08
Putative cytochrome C oxidase protein	1.85	-0.17	3.98	-1.80	-2.32	0.10	-2.44	-1.27	-3.84	-0.48	0.34	-0.69	-2.09	-0.95	-1.41	-2.22
Ty1-copia-like retrotransposon partial pol pseudogene	-0.35	1.11	1.41	0.73	-1.59	-0.50	-1.31	x	1.25	-0.90	-1.31	-0.59	-1.39	x	-0.69	1.72
Wachstumsregulatoren																
9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 1	0.20	1.08	7.80	0.34	-0.14	-1.22	-1.28	-1.91	0.18	-0.61	0.05	0.04	-0.05	-0.40	-0.27	0.91
Transkription																
mRNA-Synthese																
(Suppressor-of-White-APricot)/surp domain-containing protein/D111/G-patch domain-containing protein	0.11	-0.66	0.69	-1.81	-1.63	-1.39	-0.15	-0.24	x	-0.56	0.45	-0.30	-0.46	0.45	0.16	2.07
Pre-mRNA splicing factor SF2 (SF2)/SR1	-0.03	1.18	0.36	0.21	-0.16	-0.03	0.34	-0.19	0.04	0.04	-0.02	-0.10	0.11	-0.46	0.72	1.52
Ultraviolet-B-repressible protein	-0.12	0.42	-0.09	0.21	-0.22	0.09	0.32	0.04	-0.02	0.05	-0.34	0.46	-0.05	-0.15	0.56	1.21
Transkriptionsfaktoren																
Ankyrin repeat BTB/POZ domain-containing protein	0.77	0.64	-0.91	-1.07	-0.86	-0.03	-2.30	-1.26	-2.02	-2.03	0.27	0.07	-3.00	-0.04	-1.00	1.87
Myb family transcription factor	0.20	0.13	1.65	-0.71	-1.74	-1.67	-0.67	0.58	-0.14	-1.13	0.17	-0.14	1.17	-0.73	0.75	1.64
Plastid-lipid-associated protein, chloroplast precursor	-0.01	-0.78	0.44	-0.69	-0.69	-0.30	-1.36	-0.14	-2.86	-1.80	-0.95	0.02	-1.40	2.35	-0.33	1.90
Putative zinc finger POZ domain protein	-0.41	-0.49	-1.54	-0.72	-0.84	-0.39	-1.25	-1.46	-0.25	-0.63	1.20	0.01	-1.82	0.55	-0.29	0.08
ZIP	-0.34	-0.39	-0.46	-0.46	-1.11	-0.64	0.25	-0.84	1.20	-0.07	1.56	-0.34	-0.88	-0.27	-0.22	0.88
Repressor																
Histone deacetylase	0.20	0.07	0.46	-0.08	-1.52	-0.36	-0.37	-0.54	-0.07	-0.26	-0.19	-0.28	0.18	-0.26	-0.03	1.70

In den Buchen (1x CO₂) war nach drei Tagen ein vermindertes Transkriptspiegel einer EST der mRNA-Synthese und eines Transkriptionsfaktors als Reaktion auf die *P. citricola*-Infektion zu beobachten (Tabelle 17). Weitere ESTs der Transkription, das putative Zinkfinger-Domänenprotein nach 11 Tagen und die Histondeacetylase nach sechs Tagen wiesen reduzierte mRNA-Konzentration auf.

Im erhöhten CO₂-Niveau war nach 24 Stunden eine Induktion des Transkriptionsfaktors ZIP zu sehen. Der Myb Transkriptionsfaktor und ein Plastidenlipid-assoziiertes Protein (Chloroplastenvorläufer) waren 41 Stunden nach der Infektion im erhöhten CO₂-Milieu reprimiert. Eine

Transkriptakkumulation war 16 Tage nach der Infektion für drei ESTs der mRNA-Synthese und der Histondeacetylase zu sehen.

Unter ambientem CO₂ waren vier Tage nach der Infektion innerhalb des Proteinstoffwechsels zwei ribosomale Proteine induziert. Wohingegen das ribosomale Protein L24 nach 16 Tagen reprimiert war (Tabelle 18). Im 2x ambienten CO₂-Niveau war nach 24 Stunden das ribosomale Protein L27 induziert.

Der Translationsinitiationsfaktor 2 β und die Isoform des Translationsinitiationsfaktors 5A I zeigten in der normalen CO₂-Konzentration nach vier und sechs Tagen einen verminderten Transkriptspegel. In der erhöhten CO₂-Konzentration war der mRNA-Spiegel des Translationsinitiationsfaktors 2 β nach vier Tagen vermindert.

In den Buchen (1x CO₂) waren vier ribosomale RNAs 24 Stunden nach der Infektion induziert. Nach 41 Stunden zeigte eine 26S ribosomale RNA einen verringerten Transkriptspegel. Nach zwei Tagen waren die 3-Deoxy-D-Arabino-Heptulosonat 7-Phosphatsynthase und zwei 18S ribosomale RNAs induziert. Nach drei Tagen waren eine 18S ribosomale RNA induziert und vier ribosomale RNAs reprimiert. Vom vierten bis zum 16. Tag nach der Infektion zeigten einige 18S ribosomale RNAs einen verminderten Transkriptspegel sowie am 11. Tag eine 16S partielle ribosomale RNA. Im erhöhten CO₂-Spiegel war die 16S ribosomale RNA nach 41 Stunden und nach 11 Tagen induziert, jedoch nach vier und 16 Tagen reprimiert. Die 18S ribosomale RNA zeigte nach 24 Stunden durch die *P. citricola*-Infektion sowohl einen erhöhten als auch einen verringerten mRNA-Spiegel. Zu den übrigen Zeitpunkten war der Transkriptspegel der 18S ribosomalen RNA verringert mit Ausnahme der 18S ribosomalen RNA, diese war nach 41 Stunden induziert. Die 26S ribosomale RNA war nach 41 Stunden induziert und nach 11 Tagen reprimiert. Eine 26S ribosomale RNA zeigte nur nach vier Tagen einen verminderten RNA-Spiegel.

Betreffs Proteinverbleib/-lagerung zeigte die Peptidylprolyl-cis-trans-Isomerase des Cyclophilintyps in den Blättern der Buchen unter normaler CO₂-Konzentration nach vier Tagen reduzierte und in dem erhöhten CO₂-Milieu nach drei Tagen erhöhte mRNA-Konzentration (Tabelle 18). Die β -Glucosidase war in dem erhöhten CO₂-Milieu nach zwei und nach vier Tagen reprimiert.

Verschiedene ESTs der Proteolyse wiesen in beiden CO₂-Atmosphären einen reduzierten mRNA-Spiegel auf. In der normalen CO₂-Atmosphäre besaßen die Arginindecaboxylase nach vier und 11 Tagen, der Chloroplastauflösungsfaktor 1 a nach 41 Stunden, die Deg P Protease

nach 16 Tagen, das SKP1/ASK1-ähnliche Protein nach vier Tagen und das zur Familie der Ubiquitin-konjugierenden Enzyme gehörende Protein nach sechs Tagen einen verminderten Transkriptspiegel. In der 2x ambienten CO₂-Atmosphäre waren nach 41 Stunden die Arginin-decarboxylase und die Carboxymethylenolidase, nach vier Tagen die Deg P Protease und das zur Familie der Proteasomreifungsfaktoren gehörende Protein sowie nach 16 Tagen das SKP1/ASK1-ähnliche Protein reprimiert.

Tabelle 18: *P. citricola*-veränderte Transkriptspiegel (log₂Ratio) von ESTs der Proteinsynthese, des Proteinverbleibs und der Proteinlagerung der unter 1x ambient und 2x ambient CO₂ kultivierten dreijährigen Klimakammerbuchen (rot = induziert, CV<50; dunkelgrün = reprimiert, CV<50; orange = induziert, n=4; hellgrün = reprimiert, n=4).

Genname	1xCO ₂								2xCO ₂							
	24h	41h	2d	3d	4d	6d	11d	16d	24h	41h	2d	3d	4d	6d	11d	16d
Proteinsynthese																
Ribosomale Proteine																
60S ribosomal protein (rib 60S)	-0.54	x	0.19	-0.65	-2.72	0.00	-0.69	0.10	1.00	-0.73	0.68	-0.62	1.14	-0.72	-0.67	-0.68
Acidic ribosomal protein, putative	-0.31	0.56	-0.17	-0.28	-2.46	-0.38	-0.16	-0.35	-0.66	-0.34	0.12	-0.46	-0.52	0.03	0.29	-0.38
Ribosomal protein L24	-0.22	-0.35	-1.05	-0.87	-0.70	-1.59	-0.18	-1.05	4.88	-1.38	0.89	-0.14	-1.71	0.93	0.48	-0.03
Ribosomal protein L27	-0.36	-0.19	0.81	-0.20	-0.78	-0.20	0.05	-0.25	1.76	-0.67	-0.68	-0.48	0.43	0.02	0.36	-0.26
Translationsfaktoren																
Translation initiation factor 2 beta (eIF-2beta)	0.16	0.10	-0.35	-0.75	-1.11	-1.23	1.08	-0.63	-1.16	-0.93	0.25	-0.03	-1.86	-0.92	-0.61	-1.71
Translation initiation factor 5A isoform I (eIF-5A) mRN	-0.10	-0.12	x	-0.43	-2.94	-0.06	0.31	-0.64	1.02	-0.05	0.36	-0.26	-0.75	-0.17	-0.12	-0.19
Ribosomale RNA																
26S ribosomal RNA	-0.01	-1.10	-0.50	-0.05	0.09	0.46	-0.24	-0.17	-0.10	0.15	1.02	-0.09	-0.97	-0.18	-1.66	-0.22
16S rRNA	0.38	-2.12	1.52	-0.66	-0.81	0.03	x	-1.00	-0.40	1.31	1.38	-0.75	1.52	1.45	-1.24	1.88
18S ribosomal RNA	0.48	-0.78	-0.69	0.03	0.90	0.12	0.07	-0.34	-0.36	0.01	1.60	0.05	-0.51	-0.07	-1.53	0.18
18S ribosomal RNA	1.49	0.63	0.49	0.70	0.33	0.11	-1.86	0.24	-1.62	0.09	0.17	-0.91	-0.02	0.11	1.06	-1.21
18S ribosomal RNA	0.49	-0.90	-0.03	-0.92	-1.77	-0.61	0.12	0.56	-0.45	-0.07	0.48	0.42	-1.27	-0.61	-1.15	-1.24
18S ribosomal RNA	2.99	-0.78	-0.65	2.06	-2.99	-2.40	-2.49	-1.31	-3.05	-2.75	-1.71	-3.12	-0.85	x	1.85	-1.31
18S ribosomal RNA	0.60	0.01	-0.10	-0.57	-2.63	-1.49	-0.75	-0.68	-1.82	-0.04	1.58	-0.21	-1.08	0.42	0.53	-1.98
18S ribosomal RNA	-0.65	x	1.53	-1.05	-2.45	-0.76	-1.09	-1.62	x	-1.11	0.33	-0.32	-1.50	0.35	0.17	-1.90
18S ribosomal RNA	0.03	-0.77	1.08	-0.64	-0.83	0.01	0.06	-0.82	0.17	-0.64	0.45	0.03	-1.09	0.03	-0.04	-1.05
18S ribosomal RNA	0.00	0.07	0.19	-0.17	-0.44	-0.23	-0.25	-1.01	0.12	-0.18	-0.14	-0.01	0.11	0.19	0.03	0.13
18S ribosomal RNA	0.09	0.04	1.08	-1.01	-0.48	-1.18	-1.21	-0.82	-0.38	-0.83	0.44	-0.41	0.16	0.59	0.14	-2.00
18S ribosomal RNA	1.27	0.10	1.40	-2.26	-2.93	-2.28	-1.73	-0.84	2.53	-1.78	-0.42	-0.89	-1.78	-0.54	-0.84	3.05
26 rRNA a	-0.10	0.01	0.41	-0.24	-1.78	-0.71	0.13	-1.32	0.30	-0.66	0.73	-0.39	-1.33	-0.17	1.08	1.42
26 rRNA b	0.00	-0.84	-0.43	0.02	0.30	0.43	-0.13	-0.06	0.01	0.28	1.03	0.05	-0.82	-0.14	-1.89	-0.17
26 S ribosomal RNA	-0.38	-0.68	-0.31	0.12	0.03	0.35	-0.11	-0.87	0.11	0.10	0.89	0.05	-0.53	0.00	-1.09	-0.57
26 S rRNA	-0.07	-0.83	-0.48	0.03	0.36	0.40	-0.15	-0.11	-0.02	0.24	1.03	0.04	-0.82	-0.10	-1.82	-0.16
26S large subunit ribosomal RNA	0.24	-0.89	-0.57	0.27	0.30	0.33	-0.26	-0.13	0.10	0.01	1.10	0.14	-0.85	-0.11	-1.55	-0.34
26S ribosomal RNA	0.65	-0.47	-0.86	0.00	0.92	0.24	0.15	-0.13	0.06	0.27	1.68	0.33	-0.68	-0.02	-1.37	0.23
26S ribosomal RNA	0.57	-0.58	-0.75	0.00	0.90	0.02	0.13	-0.13	-0.32	0.09	1.82	0.22	-0.48	-0.13	-1.55	0.17
26S ribosomal RNA	0.15	-0.94	-0.51	0.05	0.30	0.13	-0.25	-0.39	-0.13	0.21	1.30	0.22	-0.93	-0.23	-1.65	-0.32
26S ribosomal RNA	0.00	-0.64	-0.55	-0.05	0.42	0.22	0.32	-0.53	-0.17	0.08	1.09	-0.04	-0.32	0.11	-1.15	0.25
26S ribosomal RNA	-0.26	-0.75	-0.65	0.00	0.55	0.39	-0.02	-0.58	-0.41	0.15	1.26	0.08	-0.34	0.17	-1.08	0.15
26S ribosomal RNA	-0.49	-0.67	-0.47	0.25	0.11	0.25	-0.14	-0.79	0.02	0.10	0.66	0.07	-0.57	0.03	-1.05	-0.45
26S ribosomal RNA	0.08	-0.85	-0.51	0.03	0.41	0.30	-0.10	0.05	-0.01	0.36	1.09	0.17	-0.76	-0.05	-1.76	-0.11
26S ribosomal RNA	-0.09	-0.68	-0.69	0.23	0.51	0.24	-0.21	-0.55	-0.16	0.09	1.15	-0.10	-0.47	-0.16	-0.93	-0.02
26S ribosomal RNA	0.72	-0.55	-0.77	0.04	0.91	0.22	0.07	-0.13	-0.22	0.17	1.73	0.34	-0.53	-0.12	-1.46	0.20
26S ribosomal RNA c	0.35	-0.50	-0.52	-0.07	0.75	0.18	0.22	-0.05	-0.16	0.25	1.46	0.39	-0.49	-0.13	-1.41	0.43
3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase	0.23	1.40	1.50	0.32	-0.18	0.20	-0.13	0.22	-0.40	-0.40	0.02	0.76	-0.26	-0.10	-0.03	-0.57
Partial 16S rRNA	0.28	1.26	2.11	-1.49	-1.88	-0.65	1.08	0.57	0.51	-5.48	2.51	1.53	-1.77	1.97	-0.39	-0.15
Partial 16S rRNA	1.42	0.49	0.45	0.64	-0.34	-0.27	-1.83	-0.38	-0.77	0.23	-0.19	-0.66	-0.38	0.00	-1.15	-1.07
Proteinverbleib/-lagerung																
Faltung Stabilität																
Beta-glucosidase	-0.42	0.26	2.34	0.44	-1.25	-1.95	0.71	x	0.89	-1.16	-2.53	-0.31	-1.65	0.78	0.39	4.21
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, cyclophilin type	0.67	0.70	0.03	0.89	-1.30	0.02	-0.67	0.15	-0.70	-1.27	-0.55	1.16	0.47	-0.28	-0.06	0.58
Proteolyse																
Arginin decarboxylase	-0.28	-0.60	-0.03	-0.43	-1.35	-0.89	-1.75	-0.08	1.01	-1.43	1.41	-0.40	-1.40	7.33	-0.71	1.29
Chloroplast Release Factor 1a	0.12	-1.78	0.18	-0.82	-2.25	-2.22	-0.58	x	-2.06	-3.80	0.80	-0.44	x	-0.84	-0.39	0.87
DegP protease	0.07	0.09	1.42	-1.55	-1.22	-1.08	0.44	-1.32	-1.33	-1.14	-0.58	-0.22	-2.27	0.67	-0.12	2.56
Dienelactone hydrolase family protein/carboxymethylenolidase	0.05	-0.11	-0.49	x	-1.32	-0.57	-0.19	-0.05	0.83	-1.16	0.38	-0.47	1.11	0.53	0.28	-0.79
Proteasome maturation factor UMP1 family protein	-0.10	-1.47	-0.24	x	0.08	-1.79	-0.08	-0.38	0.70	-0.96	0.18	-0.67	-1.86	-0.33	3.79	2.77
SKP1/ASK1-like protein (skp1)	-0.06	0.05	-1.05	-0.68	-1.50	-0.14	-1.41	-0.41	-4.66	-0.67	-0.47	-0.39	0.51	-1.39	0.13	-1.18
Ubiquitin-conjugating enzyme family protein	-0.33	3.31	4.23	x	-2.61	-1.80	0.22	0.15	1.11	-1.04	0.77	-0.37	x	0.09	0.08	-0.43
Sonstige																
Isochorismatase hydrolase family protein	-0.14	-0.66	-0.14	-0.87	-1.19	-1.58	-0.64	-0.51	0.82	-1.16	0.31	-0.24	-0.61	-0.47	0.17	0.23

Die Betrachtung von ESTs des Transportes ergab in den Buchen des ambienten CO₂-Niveaus eine reduzierte mRNA-Menge des putativen Histidin-haltigen Phosphotransfer-proteins 2 nach vier Tagen und des Phosphattransporters a nach sechs Tagen. Im 2x ambientem CO₂-Level war das putative Histidin-haltige Phosphotransferprotein 2 nach drei und ebenfalls nach vier Tagen reprimiert (Tabelle 19).

Der Phosphattransporter a hingegen war unter den zuletzt genannten Bedingungen nach 16 Tagen induziert. In dem normalen CO₂-Milieu zeigte der BAT1 Transporter nach 24 Stunden sowie nach zwei und drei Tagen einen erhöhten mRNA-Spiegel. Außerdem war er wiederum 24 Stunden und vier bis 11 Tage nach der Infektion reprimiert. Im erhöhten CO₂-Milieu zeigte der BAT1 Transporter nach zwei, sechs und 11 Tagen einen erhöhten Transkriptspegel. Vermindert war er nach 24 und 41 Stunden sowie nach drei, vier, 11 und 16 Tagen. Ansonsten war im erhöhten CO₂-Milieu ein Sulfattransporter nach 41 Stunden reprimiert.

Der Adeninnukleotidtranslokator und ein Kern-kodiertes in der Mitochondrienmembran-sitzendes Trägerprotein waren in der erhöhten CO₂-Konzentration nach 11 Tagen erhöht.

Tabelle 19: *P. citricola*-veränderte Transkriptspegel (log₂Ratio) der Transporter-ESTs der unter 1x ambient und 2x ambient CO₂ kultivierten dreijährigen Klimakammerbuchen (rot = induziert, CV<50; dunkelgrün = reprimiert, CV<50; orange = induziert, n=4; hellgrün = reprimiert, n=4).

Genname	1xCO ₂								2xCO ₂							
	24h	41h	2d	3d	4d	6d	11d	16d	24h	41h	2d	3d	4d	6d	11d	16d
Transporter																
Ionen																
Phosphate transporter a	-0.28	0.80	1.94	0.58	0.11	-1.76	0.33	-0.73	3.18	-2.91	0.27	-0.28	-0.83	0.64	0.17	1.16
Putative histidine-containing phosphotransfer protein 2	-1.05	-0.06	-6.55	1.28	-1.80	-0.88	-3.77	-0.64	-1.78	-1.24	-0.94	-1.11	-1.78	0.73	x	0.10
ABC-Typ																
BAT1	-0.08	-0.76	1.43	-0.53	-0.80	-1.97	-1.44	0.08	-1.09	-1.45	-0.09	-0.51	-1.11	-0.45	0.31	-2.56
BAT1	1.14	0.31	0.62	0.52	0.05	-0.20	-1.57	-0.21	-1.76	-0.31	0.05	-0.64	-0.35	-0.02	1.16	-1.26
BAT1	0.11	-0.05	-0.60	-0.89	-1.11	-0.03	-3.32	-0.09	0.58	-0.63	2.21	-0.47	-1.68	6.24	-1.15	-0.30
BAT1	-0.38	-0.71	1.03	2.88	1.18	-1.97	-0.35	-0.63	0.87	-0.96	0.05	-0.38	-2.04	-0.21	1.51	0.37
BAT1	-1.84	0.52	2.20	-0.49	-0.15	-0.07	-0.81	-0.36	0.87	0.43	1.15	0.25	-0.89	1.03	0.31	-0.15
BAT1	0.43	-1.30	x	0.74	-2.49	0.71	-3.88	1.83	2.21	-1.28	1.77	-2.40	-4.09	-0.72	-1.69	-0.09
BAT1	0.48	0.28	0.73	-0.42	-1.51	-1.75	-1.92	1.52	-1.16	-1.36	0.02	-1.04	-1.29	1.93	-0.08	1.12
BAT1a	-0.32	0.67	2.02	-0.72	0.03	-0.62	-0.85	-0.87	0.45	-2.49	-2.82	-0.48	0.66	-0.91	0.84	1.17
Sonstige																
Sulphate transporter	-0.29	-0.10	x	-1.23	-0.86	-2.24	-3.12	-0.31	-3.53	-1.69	0.45	-0.97	-2.22	0.72	0.33	1.33
Intrazellulärer Transport - Mitochondrien																
Adenine nucleotide translocator	-0.31	0.53	x	-2.07	-0.56	-0.20	0.38	x	x	-0.56	-0.51	-0.40	-2.73	0.07	1.61	2.84

ESTs der Zellstruktur, insbesondere Zellwand/Stressantwort, waren in den Buchen der beiden CO₂-Atmosphären reprimiert (Tabelle 20). Unter ambienten CO₂-Bedingungen wiesen das zur Hydroxyprolin-reichen Glycoproteinfamilie-gehörende Protein nach drei und 16 Tagen sowie ein putatives Membranprotein durch die Infektion mit *P. citricola* einen verminderten Transkriptspegel auf. Im 2x ambientem CO₂-Level waren nach vier Tagen zwei putative Membranproteine und ebenso das zur Hydroxyprolin-reichen Glycoproteinfamilie-gehörende Protein reprimiert. Das zuletzt genannte Protein hatte auch nach 16 Tagen einen verminderten mRNA-Spiegel.

ESTs der Chloroplastenzellstruktur waren in der normalen CO₂-Konzentration 24 und 41 Stunden (Photosystem (PS) II Stabilitätsfaktor HCF136 des Chloroplasten, RNA-bindende Region RNP-1), vier (Chlorophyll a/b-bindendes Protein Typ I b, Chlorophyll a/b-bindendes Protein) und 11 Tage (Chlorophyll a/b-bindendes Protein) nach der Infektion induziert. Einen verringerten mRNA-Spiegel zeigten nach zwei Tagen die Rieske [2Fe-2S] Region, nach vier Tagen das Light harvesting Chlorophyll a/b-bindende Protein, der PS II Stabilitätsfaktor HCF136 des Chloroplasten, das RNA-erkennende Motif-enthaltende Protein und die RNA-bindende Region, nach sechs Tagen das PS II Typ I, Chlorophyll a/b-bindendes Protein b und nach 11 Tagen die Rieske [2Fe-2S] Region. Im erhöhten CO₂-Spiegel war die PS I Untereinheit IV nach drei Tagen induziert. Weitere ESTs des Chloroplasten waren nach vier und nach 16 Tagen reprimiert.

Tabelle 20: *P. citricola*-veränderte Transkriptspiegel (log₂Ratio) von ESTs der Zellstruktur und der Signaltransduktion der unter 1x ambient und 2x ambient CO₂ kultivierten dreijährigen Klimakammerbuchen (rot = induziert, CV<50; dunkelgrün = reprimiert, CV<50; orange = induziert, n=4; hellgrün = reprimiert, n=4).

Genname	1xCO ₂								2xCO ₂							
	24h	41h	2d	3d	4d	6d	11d	16d	24h	41h	2d	3d	4d	6d	11d	16d
Zellstruktur																
Zellwand/ Stressantwort																
Hydroxyproline-rich glycoprotein family protein	-0.41	-0.90	-0.23	-1.10	-2.29	-0.18	-0.66	-1.34	-3.64	-1.25	-0.86	0.29	-1.19	6.92	0.96	-1.16
Putative membrane protein	-0.35	-0.32	1.39	-0.46	-0.67	-0.23	-0.89	-0.64	0.25	-0.59	0.50	-0.43	-1.51	0.29	-0.19	1.14
Putative membrane protein	0.27	-1.87	x	-0.72	-2.16	-0.62	-1.46	x	-0.92	0.37	x	-1.55	-1.57	1.55	0.05	0.16
Chloroplast																
Chlorophyll a/b-binding protein	0.23	0.63	-0.18	0.57	-0.18	-0.31	1.06	-0.51	-0.55	0.15	-0.18	0.17	-0.29	0.53	0.56	-0.51
Chlorophyll a/b-binding protein type I b	0.05	1.09	0.40	-0.03	-0.44	-0.09	0.55	0.06	0.11	-0.18	-0.15	0.13	-0.17	-0.12	0.16	0.14
Chlorophyll-A-B-binding protein	0.06	1.10	0.31	0.38	-0.20	-0.41	0.64	-0.13	-0.42	0.42	-0.26	0.80	-0.83	0.41	0.41	-0.28
PS II type I chlorophyll a/b-binding protein (lhcb1*7) a	-0.05	0.61	0.85	0.14	-0.76	-1.52	0.65	x	-0.56	-0.64	0.29	0.62	-1.84	0.32	0.29	-0.32
PS II type I chlorophyll a/b-binding protein(lhcb1*7) b	-0.05	7.63	0.23	0.28	-0.32	-3.03	-0.01	0.30	-0.62	-0.18	0.99	-0.34	-2.25	0.52	2.07	-0.58
LHCI type III chlorophyll a/b binding protein	-0.25	0.38	-0.15	-0.66	-0.77	-0.87	0.40	0.14	-0.03	-0.56	-0.18	-0.20	0.89	0.13	-0.94	-1.44
Light harvesting chlorophyll A/B binding protein	-0.57	1.07	0.38	-0.02	-1.21	-0.32	0.60	0.04	-0.11	-0.76	-0.13	0.39	-0.22	-0.29	0.04	0.71
Light harvesting chlorophyll A/B binding protein (Lhcb-Pp2)	-0.32	0.29	-0.06	-0.70	-0.19	-0.49	-0.72	-0.01	-1.47	-0.32	0.23	0.00	-0.77	0.13	-0.41	-1.16
Oxygen evolving enhancer protein 1 precursor	0.12	1.08	0.43	0.05	-0.42	0.03	0.33	0.66	0.08	-0.25	-0.05	0.46	-0.04	-0.33	0.26	-0.26
Photosystem I subunit IV	-0.11	0.16	0.95	-0.55	-0.73	-1.47	0.58	-0.17	0.67	-0.90	-0.80	4.05	-0.07	-2.62	-0.24	-0.61
Photosystem II stability/assembly factor HCF136, chloroplast	1.81	-0.01	-1.61	-0.14	-1.60	-2.78	-4.06	-1.26	-0.63	x	2.22	x	0.97	3.00	-1.59	-1.00
Rieske [2Fe-2S] region	0.22	-0.05	-1.02	-0.77	-1.00	-1.88	-1.49	-2.04	-0.67	0.07	0.09	-0.07	2.04	-0.67	-0.57	2.97
RNA recognition motif-containing protein	-0.13	-0.67	-0.70	-0.08	-1.78	-1.31	-1.26	0.17	-0.25	-0.67	-0.50	-0.73	-0.47	-0.74	-0.52	-1.24
RNA-binding region RNP-1	1.02	1.84	0.11	-1.87	-1.76	2.03	-3.11	0.87	0.24	x	-0.15	1.42	-3.07	1.65	-1.03	-0.56
Type II chlorophyll a/b binding protein	-0.07	0.18	0.23	-0.35	-1.54	-0.52	-0.12	-0.10	-1.27	0.17	0.14	-0.20	-1.11	0.88	-0.32	0.44
Signaltransduktion																
Sonstige																
ACC oxidase 1 a	-0.72	0.96	0.77	0.25	0.69	0.49	-1.33	-1.10	0.36	-0.04	0.78	-0.26	-0.61	0.41	0.66	-0.48
ACC oxidase 1 d	-0.48	-1.28	0.95	0.26	-2.03	-0.82	-0.76	-1.06	2.52	-0.55	0.44	-0.18	-0.30	0.02	0.10	0.83
ACC oxidase 1 e	-0.35	0.12	0.87	0.21	0.28	0.57	-0.92	-1.11	0.59	0.06	0.61	-0.11	-0.44	0.41	0.58	-0.42
ACC oxidase b	-0.44	0.17	1.06	0.20	0.31	0.61	-0.92	-1.38	1.20	0.10	0.59	-0.13	-0.49	0.38	0.33	-0.67
ACC Synthase	-0.21	-0.34	x	0.09	-0.45	-0.20	-0.24	0.24	0.67	-0.62	0.95	-0.12	-0.52	0.80	-0.33	1.75
Ethylene resistant	-0.72	0.48	1.04	0.32	0.32	0.82	-1.32	0.13	0.37	0.05	0.79	-0.24	-0.47	0.43	0.37	-0.07
Kinasen																
4-(cytidine 5'-phospho)-2-C-methyl-D-erithritol kinase	-0.19	0.26	0.18	0.27	-0.47	0.66	7.84	-0.64	0.59	-0.30	0.34	-0.06	-0.19	-0.50	-0.20	1.29
Mitogen-activated protein kinase	-0.04	0.35	0.10	-0.07	0.39	0.14	-0.32	0.49	0.33	-0.83	0.15	0.09	-0.05	-0.53	0.03	1.39
Phosphatidylinositol 3- and 4-kinase, catalytic	1.28	-0.06	-0.24	-1.07	-1.98	-0.58	-3.34	-0.94	-2.55	-0.42	3.47	0.86	-1.20	-1.85	-1.27	-3.01
Protein kinase	-0.36	0.28	-0.13	x	-1.01	-0.67	-0.13	-0.48	0.76	-0.22	0.10	0.07	0.47	-0.27	-0.76	2.00
Protein kinase	-0.17	-1.84	0.75	-2.71	5.70	-2.78	-0.42	0.26	-3.32	-2.43	-1.99	-0.25	-3.31	0.78	0.54	-0.15
Protein tyrosine kinase, putative	-0.74	-7.36	1.96	x	-2.38	-1.52	-1.29	-2.06	1.84	-0.05	x	x	-1.09	-0.21	0.36	-0.16
Serine/threonine/tyrosine kinase	0.16	0.08	0.99	-0.21	-0.90	-1.07	0.23	1.00	-0.02	-0.80	0.71	-0.26	1.16	-0.12	-0.54	1.98

In den Buchen des ambienten CO₂-Levels waren durch die *P. citricola*-Infektion die ACC Oxidase b der Signaltransduktion nach zwei Tagen induziert (Tabelle 20). Andere ACC-Oxidase zeigten jedoch nach 11 und 16 Tagen einen reduzierten mRNA-Spiegel. Ebenso nach zwei

Tagen war das Ethylen-resistente Protein induziert, es besaß nach 11 Tagen einen verringerten Transkriptspiegel. Unter erhöhtem CO₂ waren ACC-Oxidase b Transkripte 24 Stunden nach der Infektion akkumuliert. Die ACC-Synthase wies nach 16 Tagen eine Transkriptakkumulation auf. Im normalen CO₂-Milieu waren Kinasen durch die Infektion reprimiert: Proteinkinase nach 41 Stunden und vier Tagen, katalytische Phosphatidylinositol 3- und 4-Kinase nach drei Tagen und die putative Proteintyrosinkinase nach sechs und 11 Tagen. In den Buchen des 2x ambienten CO₂-Milieus hingegen war nach vier Tagen nur die putative Proteintyrosinkinase reprimiert. Induziert waren die katalytische Phosphatidylinositol 3- und 4-Kinase nach zwei Tagen, die 4-(Cytidin 5'-Phospho)-2-C-Methyl-D-Erithritolkinase, die Mitogen-aktivierte Proteinkinase, die Proteinkinase und die Serin-/Threonin-/Tyrosinkinase nach 16 Tagen.

Alle auf die *P. citricola*-Infektion reagierenden ESTs der Stressantwort waren in den Buchen des normalen CO₂-Milieus reprimiert (Tabelle 21). Das auf Kälteakklimatisierung-antwortende Protein zeigte 24 Stunden nach der Infektion einen verringerten mRNA-Spiegel. Des Weiteren waren das putative durch Trockenheit-induzierte Protein nach drei Tagen, das DNAJ Hitzeschock N-terminale Domäne-beinhaltende Protein, das DNAJ Hitzeschock Protein und das Hitzeschock-bindende Protein nach vier und 16 Tagen, Stress- und Pathogen-verwandte Proteine nach sechs und 11 Tagen reprimiert. In den Buchen (2x CO₂) waren die ESTs der Stressantwort, wie Stress- und Pathogen-verwandte Proteine, nach 24 Stunden reprimiert. 41 Stunden nach der Infektion wiesen ein Stress- und Pathogen-verwandtes Protein und der Hitzeschock Proteinvorläufer 70 ebenfalls einen verminderten Transkriptspiegel auf, genauso ein Hitzeschock-bindendes Protein nach 11 Tagen. Zudem waren zwei Stress- und Pathogen-verwandte Proteine nach sechs Tagen induziert. Nach 16 Tagen waren folgende Proteine induziert: Aminoxidase, Cysteinproteinase und DnaJ Protein.

In den Buchen (1x CO₂) war die Mangansuperoxiddismutase nach 41 Stunden und drei bis sechs Tagen reprimiert. Die Eisensuperoxiddismutase war nach sechs Tagen reprimiert. Außerdem zeigten die Peroxidase nach drei Tagen und die Glutathionperoxidase nach 16 Tagen einen erhöhten Transkriptspiegel.

Vor der Infektion war in den Buchen der erhöhten CO₂-Atmosphäre die Katalase b reprimiert. 41 Stunden nach der Infektion waren außerdem die Wund-induzierte Carboxypeptidase, die L-Ascorbatoxidase und die Glutathionsynthetase 2, letztere ebenso nach vier Tagen, reprimiert. Die Mangansuperoxiddismutase hatte nach vier und sechs Tagen einen reduzierten Transkript-

spiegel. Drei Engiftungsenzyme wiesen einen erhöhter mRNA-Spiegel auf: die Katalase b nach zwei Tagen, die Glutamylcysteinsynthetase und die L-Ascorbatoxidase nach 16 Tagen.

Sonstige ESTs der Abwehr/Krankheit waren, wie das Chitinase-ähnliche Protein, in beiden Atmosphären bereits nach 41 Stunden (1xCO₂) oder nach drei und 16 Tagen (2xCO₂) induziert. Das putative Seneszenz-assoziierte Protein war nach vier Tagen (1xCO₂) und 11 Tagen (2xCO₂) reprimiert. Des Weiteren war im erhöhten CO₂-Level eine Isoform des Prunasinhydrolasevorläufers nach 11 Tagen induziert und ein Krankheitsresistenzprotein nach 16 Tagen reprimiert.

Tabelle 21: *P. citricola*-veränderte Transkriptspiegel (log₂Ratio) von ESTs der Signaltransduktion, der Abwehr/Krankheit und des Sekundärmetabolismus der unter 1x ambient und 2x ambient CO₂ kultivierten dreijährigen Klimakammerbuchen (rot = induziert, CV<50; dunkelgrün = reprimiert, CV<50; orange = induziert, n=4; hellgrün = reprimiert, n=4).

Genname	1xCO ₂								2xCO ₂							
	24h	41h	2d	3d	4d	6d	11d	16d	24h	41h	2d	3d	4d	6d	11d	16d
Abwehr/ Krankheit																
Stressantwort																
Amine oxidase	-0.30	0.77	-0.42	0.13	-0.49	-0.47	-0.17	-0.62	-0.15	-0.26	0.07	0.00	0.06	-0.30	-0.08	1.48
Cold acclimation responsive protein BudCAR5	-1.56	0.72	0.11	-0.59	0.64	-0.17	0.13	-1.41	0.66	0.37	0.33	0.32	0.14	0.77	-0.35	0.52
Cysteine proteinase	-0.34	0.38	1.87	-0.38	-0.41	-1.57	0.02	-0.63	2.57	-0.35	0.81	-0.02	1.56	1.48	0.21	2.07
DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein	-0.05	0.42	0.25	0.20	-1.01	0.14	-0.06	0.65	-0.04	-0.25	-0.30	0.06	-0.17	-0.94	-0.13	1.59
DNAJ heat shock protein	0.13	0.02	2.14	x	-1.14	-1.78	-1.15	-0.10	0.25	-0.06	0.42	-0.14	3.99	0.01	0.36	-0.25
DnaJ protein	-0.10	0.34	0.41	0.06	0.31	-0.73	0.39	0.04	-0.04	0.14	0.51	0.00	-0.06	0.16	0.28	1.40
Heat shock protein 70 precursor	0.20	0.47	-0.05	-0.26	-2.14	-0.47	0.58	-0.64	-2.62	-1.02	0.64	0.20	-0.04	0.15	-0.51	0.59
Heat shock protein binding	0.34	x	-1.14	-1.42	-3.37	-2.49	-2.09	-1.49	2.39	x	0.92	-0.94	0.59	-1.92	-1.37	4.66
Putative drought-induced protein RDI	-0.13	x	0.23	-1.80	-2.50	0.00	-0.57	-0.46	0.03	-6.47	5.38	-0.74	-2.02	x	-1.71	-0.25
Stress and pathogenesis-related protein	0.12	-0.29	0.66	0.09	0.45	-1.34	-1.61	-0.78	-0.91	0.11	0.03	-0.68	-0.67	0.93	-0.18	-1.31
Stress and pathogenesis-related protein	1.28	-0.55	0.93	0.25	-1.71	-1.50	-2.63	-1.08	-1.31	-1.02	1.46	-0.44	-0.95	0.56	0.22	1.29
Stress and pathogenesis-related protein	-0.15	1.21	0.97	-0.03	-1.85	-1.38	-1.52	0.14	-1.37	-1.48	2.31	-0.67	-1.27	1.81	0.53	-0.27
Stress and pathogenesis-related protein.	-0.74	0.21	0.87	0.39	-0.02	-0.65	-1.59	0.39	-4.30	-0.22	0.04	-0.43	-0.43	1.20	0.71	-0.25
Entgiftung																
Glutamylcysteine synthetase	0.09	-2.62	-0.70	1.31	-0.63	-2.07	1.88	-0.25	1.05	-4.82	-0.25	0.07	3.88	-0.59	0.32	2.12
Glutathione peroxidase 1	-0.73	15.33	-1.29	0.55	-2.67	-2.56	0.45	3.66	-0.26	-0.89	2.39	-1.19	3.25	-1.48	-0.12	1.72
Glutathione synthetase 2	-0.13	-2.48	-3.32	-0.78	-4.61	-2.42	0.26	x	x	-1.37	x	1.75	-1.72	-0.71	0.59	1.73
Katalase b: PPE132444: catalase 1	0.21	-0.10	0.37	0.01	-0.87	0.09	0.16	-0.07	-1.27	-0.27	1.06	-0.33	0.29	0.52	0.52	-0.12
L-ascorbate oxidase (Ascorbase)	0.05	x	x	-1.70	-0.80	-2.42	-1.61	0.10	3.55	-1.23	5.91	x	-2.81	x	-1.76	1.73
Manganese superoxide dismutase	0.09	-1.20	0.04	-1.09	-1.67	-3.32	-1.19	-0.71	-2.83	1.50	-0.09	0.34	0.47	0.53	0.18	-1.92
Manganese superoxide dismutase	-0.16	-3.22	0.83	0.46	1.82	-1.17	-0.14	-0.60	1.62	-0.43	4.95	-4.19	-2.10	-0.95	-0.95	2.39
Partial mnsod gene for manganese superoxide dismutase	-0.23	-1.11	-0.65	-0.24	0.10	0.42	-0.33	-0.12	-0.13	0.12	0.99	-0.05	-1.05	-0.35	-1.76	-0.37
Peroxidase	-0.20	0.53	0.10	2.37	-3.56	-0.55	-0.29	x	-1.80	-0.70	-4.04	0.14	x	0.17	8.14	0.44
Superoxiddismutase Fe	0.04	-0.55	x	3.72	-3.59	-1.92	0.04	x	x	-2.28	1.22	-0.97	x	x	-0.15	1.80
Wound-inducibile carboxypeptidase	-0.01	0.00	x	2.04	-0.60	-1.78	-0.40	x	0.23	-1.21	0.22	-0.32	1.17	0.64	0.25	3.39
Sonstige																
Disease resistance protein	0.82	-0.06	x	-0.87	-2.02	-0.87	-0.15	-0.71	1.08	-0.28	-0.14	-1.41	-0.07	-0.35	-0.41	-2.08
Prunasin hydrolase isoform PH I precursor (PH-S1)	0.17	0.13	0.00	0.77	0.11	-0.76	-0.46	2.95	-0.50	-0.32	0.49	-0.34	-0.08	-0.27	1.26	-0.22
Putative senescence-associated protein	1.93	-3.43	x	1.63	-3.17	1.06	x	-1.62	-2.93	3.88	-1.93	-0.24	2.21	0.41	3.46	0.33
Putative senescence-associated protein	-0.55	-0.69	-0.43	0.17	0.27	0.28	-0.21	-1.19	0.25	0.14	0.84	0.20	-0.50	0.20	-0.57	0.11
Chitinase-like protein	-0.32	1.88	x	0.01	-0.24	-1.23	0.21	0.44	0.14	0.47	0.08	1.41	-0.54	0.60	-0.03	1.87
Sekundärmetabolismus																
Phenylpropanoide/ Phenole																
Caffeic acid O-methyltransferase	0.22	0.45	0.20	0.25	-0.58	-0.97	-2.80	-0.59	-1.18	-1.14	-0.19	-0.44	-0.53	0.37	0.54	-1.03
Caffeic acid O-methyltransferase	-0.03	0.40	0.03	-0.98	1.40	-1.56	-1.76	-1.22	x	-1.08	-0.14	-1.04	-3.41	0.19	-0.60	0.12
Caffeic acid O-methyltransferase (COMT) Gruppe 1	0.53	0.98	0.37	0.76	0.06	-1.17	-1.31	-0.71	-2.00	-0.59	-3.60	-0.57	-0.35	0.21	0.89	-0.42
Chalconsynthase	0.75	1.49	0.51	0.54	-0.67	0.95	0.44	-0.03	-0.84	-0.04	0.14	0.52	-0.34	-0.01	0.44	-1.33
Cinnamic acid 4-hydroxylase	0.65	1.89	0.55	0.28	-0.55	0.07	0.54	-0.21	-1.35	-0.12	-0.18	1.04	-0.34	-0.19	0.07	-1.32
Flavanone 3-hydroxylase (F3H gene)	0.60	1.68	0.52	0.27	-0.31	0.68	0.35	-0.46	-0.67	-0.40	0.25	1.01	-0.62	-0.57	0.48	-0.83
Isoflavone reductase-related	-0.28	-0.71	-0.43	-0.25	0.00	0.45	-0.16	-1.07	0.17	0.07	0.85	-0.15	-0.68	-0.07	-1.66	-0.32
Methyltransferase MT-A70 family protein	-0.03	0.36	x	-0.57	-3.50	-1.85	-0.49	x	-0.87	-0.31	0.38	-0.08	-1.63	-0.32	0.63	2.25
O-diphenol-O-methyltransferase Gruppe 2	0.24	0.18	0.23	0.15	-1.05	-1.32	-1.45	-1.22	-0.54	-0.47	-2.68	-0.09	-0.62	0.47	0.69	0.54
Phenylalanine ammonium lyase	0.11	-0.67	-0.31	-0.27	-2.16	-0.77	-0.10	0.17	1.33	-0.19	-1.06	-0.11	-1.27	0.70	1.13	x
Sonstige																
(-)-isopiperitenone reductase	0.36	-0.15	-0.34	-0.08	0.48	-0.11	-1.25	-0.47	-1.13	0.18	-0.55	-0.58	0.10	0.40	-0.35	-0.49
1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase	1.40	x	x	-1.63	x	-1.09	-4.38	0.21	2.96	-2.25	-2.55	-0.75	-2.67	-0.37	-2.76	-2.40
Dehydroquinatedehydrogenase-shikimat-dehydratase	-0.31	2.42	0.61	-1.16	-0.86	-1.46	-0.62	0.45	0.99	-2.14	0.33	-0.11	-0.94	-0.92	0.54	3.09
Isoflavone reductase	-0.15	1.30	-0.46	0.07	-0.10	-0.02	0.38	-1.18	-0.58	-0.32	0.21	0.07	-0.21	0.00	-0.08	-0.15
Polyphenol oxidase	-0.47	0.27	1.30	-0.74	-0.80	-0.27	-0.39	0.08	-0.21	-1.06	0.33	-0.80	-0.23	2.68	1.66	1.81
Shikimatkinase	-0.25	0.19	-0.32	0.14	1.02	-0.74	0.05	-0.33	-0.73	-0.37	0.32	0.18	-0.21	-0.82	-0.36	1.62

In den Buchen des normalen CO₂-Niveaus waren die Isoflavonreduktase, die Chalkonsynthase und die Zimtsäure 4-Hydroxylase des Sekundärmetabolismus durch die *P. citricola*-Behandlung nach 41 Stunden induziert (Tabelle 21). Ein verminderter mRNA-Gehalt war nach sechs, 11 und 16 Tagen für die O-Diphenol-O-Methyltransferase Gruppe 2, nach 11 und 16 Tagen für die Kaffeesäure-O-Methyltransferase (COMT) Gruppe 1 und nach 16 Tagen für eine Isoflavonverwandte Reduktase zu sehen.

In den Bäumen (2x CO₂) waren 24 Stunden nach der Infektion die COMT Gruppe 1 reprimiert und die Phenylalanin-Ammonium-Lyase induziert. Darüber hinaus zeigten die Zimtsäure 4-Hydroxylase und die Flavanon-3-Hydroxylase nach drei Tagen einen Anstieg ihres Transkriptspiegels. Außerdem waren die COMT Gruppe 1 und ein Protein der Methyltransferasenfamilie MT-70 nach vier Tagen, die Isoflavonreduktase und die Chalkonsynthase nach 16 Tagen reprimiert.

Vier Tage nach der *P. citricola*-Infektion war in den Buchen der normalen CO₂-Atmosphäre die Shikimatkinase induziert. Des Weiteren waren die 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphatreduktoisomerase nach drei und sechs Tagen, die Dehydroquinatdehydrogenase-Shikimatsynthase nach sechs Tagen und die (-)-Isopiperitenonreduktase nach 11 Tagen reprimiert. Die (-)-Isopiperitenonreduktase war auch im erhöhten CO₂-Milieu 24 Stunden nach der Infektion reprimiert. Ferner waren 41 Stunden nach der Infektion die Polyphenoloxidase, die 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphatreduktoisomerase, letztere auch nach 11 Tagen und die Dehydroquinatdehydrogenase-Shikimatsynthase im erhöhten CO₂-Niveau reprimiert.

Die Aldo-Keto Reduktase war nach sechs Tagen in den Buchen des normalen CO₂-Milieus reprimiert (Tabelle 22). In der erhöhten CO₂-Konzentration zeigten die β-Galactosidase b nach zwei Tagen und vier ESTs unklarer Klassifizierung nach 16 Tagen einen erhöhten mRNA-Spiegel.

Im normalen CO₂-Milieu war nach 24 Stunden eine unklassifizierte ESTs reprimiert. Zudem zeigten verschiedene unklassifizierte ESTs durch die *P. citricola*-Infektion nach drei, vier, sechs und 11 Tagen reduzierte Transkriptspiegel (Tabelle 22). In den Buchen des erhöhten CO₂-Milieus wiesen nach 41 Stunden sowie nach zwei, vier, sechs und 11 Tagen unklassifizierte ESTs reduzierte mRNA-Spiegel auf. Eine Transkriptakkumulation wurde nach zwei und 16 Tagen für die unklassifizierten ESTs beobachtet.

Tabelle 22: *P. citricola*-veränderte Transkriptspiegel (log₂Ratio) unklassifizierter ESTs und ESTs unklarer Einteilung der unter 1x ambient und 2x ambient CO₂ kultivierten dreijährigen Klimakammerbuchen (rot = induziert, CV<50; dunkelgrün = reprimiert, CV<50; orange = induziert, n=4; hellgrün = reprimiert, n=4).

Genname	1xCO ₂								2xCO ₂							
	24h	41h	2d	3d	4d	6d	11d	16d	24h	41h	2d	3d	4d	6d	11d	16d
Unklare Klassifizierung																
Aldehyde dehydrogenase	-0.01	0.72	x	0.86	-0.60	-2.34	-0.80	x	x	-1.13	1.05	-0.78	-0.82	0.10	-0.57	2.43
Aldo-keto reductase	-0.20	0.52	x	-0.49	-0.72	-1.59	-0.68	0.14	x	-0.12	4.10	0.59	-1.88	0.17	0.57	1.85
Aldo-keto reductase/ oxidoreductase	-0.12	0.04	0.41	-0.17	-0.44	-0.13	-0.09	-0.45	-0.08	-0.57	-0.12	0.29	0.17	-0.13	-0.03	1.11
Beta-galactosidase = Lactase a	-0.04	0.82	x	-0.38	-1.34	-2.21	-0.51	-0.84	-1.80	-0.55	0.55	-0.80	-1.52	-1.86	0.31	1.52
Beta-galactosidase = Lactase b	0.07	1.59	0.54	x	-0.62	-1.38	-0.43	-0.89	x	-1.02	1.01	0.41	-1.13	-0.03	0.54	1.99
Klassifizierung																
Expressed protein	0.02	0.83	0.13	-0.18	-0.01	-0.67	-0.19	0.48	-0.65	-0.58	0.35	0.76	-0.13	-1.34	0.58	1.65
Expressed protein	0.01	0.10	-0.17	-0.23	-1.06	-1.80	x	x	-3.55	-0.37	0.44	-0.45	-1.46	-1.94	-0.16	2.15
Expressed protein	-0.19	0.18	-0.11	0.06	-3.71	-0.97	0.42	0.04	1.69	-0.18	0.08	0.17	-0.27	0.59	0.41	1.88
Expressed protein	0.17	0.25	-0.34	-0.09	-0.39	-1.25	2.25	-0.71	-0.06	-0.72	2.41	-0.51	-0.68	-1.39	0.08	1.70
Hypothetical protein	0.13	0.13	0.60	0.38	-0.98	0.13	-1.08	0.15	-0.46	-0.43	-0.20	-0.30	0.40	-0.28	0.45	-0.36
Hypothetical protein	0.64	-0.58	-0.70	0.15	0.83	0.16	-0.05	-0.13	-0.27	0.27	1.48	0.19	-0.36	0.05	-1.28	0.01
Hypothetical protein 3	-0.56	-0.88	-0.63	-0.09	-0.18	0.31	-0.39	-0.86	-0.13	0.14	0.65	-0.20	-0.80	0.01	-1.45	-0.58
Hypothetical protein 3	-0.45	-0.11	-1.15	-1.01	-0.33	-0.30	-1.14	-0.65	1.03	-0.75	0.69	0.06	-0.50	0.62	-1.87	1.05
Microsatellite DNA	0.07	0.66	-0.49	0.47	-3.19	-0.97	-1.12	-1.74	-0.66	-0.41	0.34	-0.08	-0.31	-0.86	1.08	1.11
Microsatellite DNA	-0.66	0.79	0.96	0.63	-3.25	-2.42	-1.13	-0.50	1.68	-1.06	-0.40	-0.15	-0.01	-0.25	-1.00	-2.45
Unknown protein	-0.06	0.06	0.04	0.32	-0.11	-0.40	-0.03	x	0.38	-1.09	0.07	-0.06	0.12	-0.16	0.54	1.60
Unknown protein	1.03	2.53	-0.27	-0.64	-2.40	-1.04	-3.70	-1.22	2.15	2.96	-1.61	-1.86	-2.84	-1.76	-1.41	1.52
Unknown protein	-0.19	-0.34	0.75	-1.11	-0.33	-0.49	-0.24	-0.77	-1.74	0.09	0.51	-0.56	-0.94	0.13	0.01	-0.10
Unknown protein	-0.15	0.90	-0.41	-0.23	-1.35	-1.63	-0.48	0.28	-0.47	-1.99	4.30	-0.24	-0.54	0.14	-0.42	0.19
Unknown protein	-0.01	0.11	-1.70	-1.22	0.04	-0.41	-4.38	-1.42	-4.45	-1.47	-1.64	-0.41	0.96	1.47	-0.51	1.38

Die Anzahl der unbekanntesten ESTs, die durch die Infektion ihren Transkriptspiegel verändert haben, sind Tabelle 23 zu entnehmen.

Tabelle 23: Anzahl der durch *P. citricola* induzierten beziehungsweise reprimierten unbekanntesten ESTs, der unter 1x ambient und 2x ambient CO₂ kultivierten dreijährigen Klimakammerbuchen.

	1xCO ₂								2xCO ₂							
	24h	41h	2d	3d	4d	6d	11d	16d	24h	41h	2d	3d	4d	6d	11d	16d
reprimiert	2	3	3	22	59	34	44	22	14	30	3	17	69	3	16	21
induziert	9	2	11	0	2	1	0	2	4	0	12	0	0	2	5	7

3.3.2 Verifizierung der Transkriptspiegel mittels qRT-PCR

Die Microarrayergebnisse wurden weitestgehend durch die qRT-PCR-Messungen bestätigt (Tabelle 24, Tabelle 25). In den Buchen der normalen CO₂-Atmosphäre wurde die Transkripterhöhung der Chalkonsynthese 41 Tage nach der Infektion nur unzureichend bestätigt.

Die GAPDH wies nach Messung mit dem Microarray einen verminderten Transkriptspiegel auf, in der qRT-PCR war der Transkriptspiegel signifikant erhöht. Darüber hinaus wurde mittels des Microarrays 16 Tagen nach der *P. citricola*-Infektion im erhöhten CO₂-Milieu der mRNA-Spiegel der Chalkonsynthese vermindert, was mit der Hilfe der qRT-PCR unbestätigt blieb.

Tabelle 24: Vergleich der *P. citricola*-veränderten qRT-PCR- und Microarraytranskriptspiegel der dreijährigen Buchen, die in der Klimakammer unter ambientem CO₂ kultiviert wurden (qRT-PCR: rot = induziert, signifikant; orange = induziert, nicht signifikant; hellgelb = unverändert; grün reprimiert, signifikant; n=6; Microarray: rot = induziert, CV<50; orange = induziert; grün = reprimiert, CV>50; n=4).

Genname	1xCO ₂											
	24h			41h			2d			3d		
	qRT Mittelwert	Micro- array Median	Micro- array array	qRT Mittelwert	Micro- array Median	Micro- array array	qRT Mittelwert	Micro- array Median	Micro- array array	qRT Mittelwert	Micro- array Median	Micro- array array
18s	1.97	0.50	0.48							-0.47	-0.49	-0.60
Chalkonsynthase				0.27	0.21	1.49						
Chlorophyll a/b binding protein				0.77	0.55	1.09						
ACC-Oxidase 1e							0.81	0.79	0.87			

Genname	1xCO ₂											
	4d			6d			11d			16d		
	qRT Mittelwert	Micro- array Median	Micro- array array	qRT Mittelwert	Micro- array Median	Micro- array array	qRT Mittelwert	Micro- array Median	Micro- array array	qRT Mittelwert	Micro- array Median	Micro- array array
18s				0.54	1.07	-0.68	-0.91	-0.71	-0.92			
WRKY	-1.06	-1.21	-0.70									
G3DPH2										1.11	0.51	-2.75

Tabelle 25: Vergleich der der *P. citricola*-veränderten qRT-PCR- und Microarraytranskriptspiegel der dreijährigen Buchen, die in der Klimakammer unter 2x ambientem CO₂ kultiviert wurden (qRT-PCR: orange = induziert, nicht signifikant; gelb = unverändert; dunkelgrün = reprimiert, signifikant; n=6; Microarray: gelb = unverändert; hellgrün = reprimiert, n=4; dunkelgrün = reprimiert, CV>50; n=4).

Genname	2xCO ₂														
	-10h			7h			14h			2d			15d		
	qRT Mittelwert	Micro- array Median	Micro- array array	qRT Mittelwert	Micro- array Median	Micro- array array	qRT Mittelwert	Micro- array Median	Micro- array array	qRT Mittelwert	Micro- array Median	Micro- array array	qRT Mittelwert	Micro- array Median	Micro- array array
18S rRNA	1.09	0.70	-0.384	-0.89	-0.48	-0.41	-0.99	-0.90	0.38	-0.42	-0.41	-0.26			
β-Glucosidase							-5.28	-3.35	-2.53						
Chalkonsynthase													0.35	0.34	-1.33

3.3.3 Self-Organizing Maps (SOM)

Bei der Betrachtung des Graphen der SOM stiegen die Transkriptspiegel der ESTs in der SOM2 (Abbildung 15 und Tabelle 26) in den Buchen (1x CO₂) nach zwei Tagen an und sanken bis zum 16. Tag. In den Buchen unter 2x ambientem CO₂ waren die Transkriptspiegel nach 24 Stunden auf einem sehr niedrigen Niveau, welches bis zum sechsten Tag nach der Infektion anstieg, bis zum 11. Tag abnahm und am 16. Tag wieder stieg.

Die ESTs der SOM2 waren das Thioredoxin der Photosynthese, ein Protein der Rekombination und Reparatur, ferner vier ESTs des Proteinstoffwechsels, ein Chlorophyll a/b-bindendes Protein und fünf ESTs der Stressantwort beziehungsweise des Sekundärstoffwechsels.

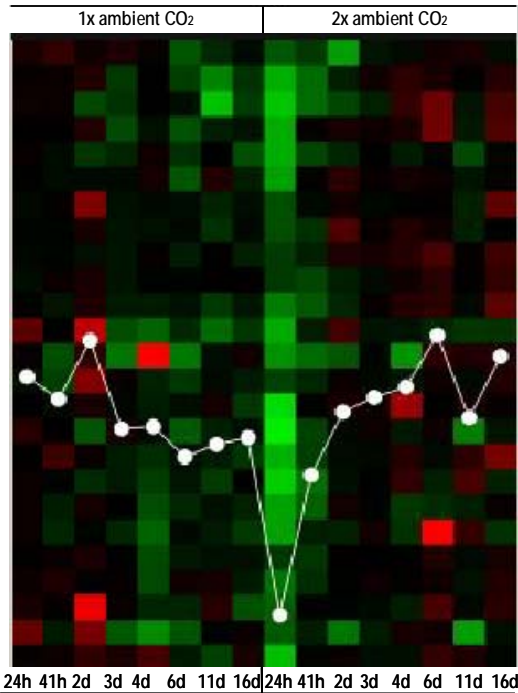


Abbildung 15: SOM2 der dreijährigen Buchen, die in der Klimakammer unter ambienten und 2x ambienten CO₂ kultiviert und mit *P. citricola* infiziert wurden.

Tabelle 26: Nach SOM2 verlaufende ESTs der dreijährigen Buchen, die in der Klimakammer unter ambienten und 2x ambienten CO₂ kultiviert und mit *P. citricola* infiziert wurden.

Energie - Photosynthese
Thioredoxin
Zellwachstum/-teilung - Rekombination und Reparatur
Putative cytochrome C oxidase proteins
Proteinsynthese
Ribosomale Proteine
40S ribosomal protein S25
5S ribosomal RNA
Ribosomale RNA
Aminopeptidase M
Proteinverbleib/-lagerung - Proteolyse
SKP1/ASK1-like protein
Zellstruktur
Zellwand/Stressantwort
Hydroxyproline-rich glycoprotein family protein
Chloroplast
Type II chlorophyll a/b binding protein
Abwehr/Krankheit
Abwehrverwandt
NtPRp27-like protein
Stressantwort
Heat shock protein 70 precursor
Stress and pathogenesis-related protein.
Sekundärmetabolismus - Phenylpropanoide/Phenole
Caffeic acid O-methyltransferase (COMT) Gruppe 1

Die SOM9 beinhaltet ein Entgiftungsenzym, ein Zentralenzym des Sekundärstoffwechsels, ferner zwei ESTs der Chloroplastenstruktur und zwei ESTs der Proteinsynthese (Tabelle 27 und Abbildung 16). Eine Akkumulation von Transkripten war nach 41 Stunden in den Buchen (1xCO₂) zu sehen, ihr Transkriptspiegel sank zunächst bis zum sechsten Tag und stieg danach wieder leicht an. In den Buchen unter erhöhten CO₂-Bedingungen waren diese ESTs nach drei und 11 Tagen leicht erhöht.

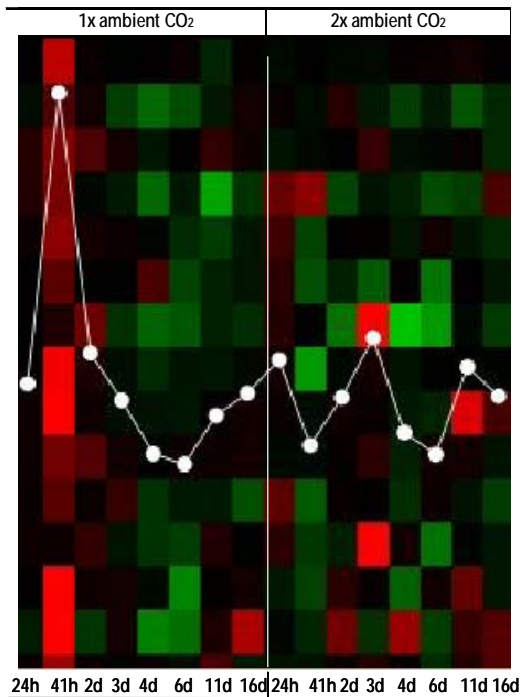


Abbildung 16: A: SOM9 der dreijährigen Buchen, die in der Klimakammer unter ambienten und 2x ambienten CO₂ kultiviert und mit *P. citricola* infiziert wurden.

Tabelle 27: Nach der SOM9 verlaufende ESTs der dreijährigen Buchen, die in der Klimakammer unter ambienten und 2x ambienten CO₂ kultiviert und mit *P. citricola* infiziert wurden.

Proteinsynthese - ribosomale RNA

3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase
Small subunit ribosomal RNA

Transporter - Ion

Phosphate transporter b

Zellstruktur - Chloroplast

PSII type I chlorophyll a/b-binding protein(LHC b1*7) gene b
Photosystem I subunit IV

Abwehr/Krankheit - Engiftung

Glutathione peroxidase 1

Sekundärmetabolismus - Phenylpropanoide/Phenole

Cinnamic acid 4-hydroxylase

Unklassifiziert

Expressed protein

Unknown protein

3.3.4 Maschinelles Lernen - Support Vektormaschinen (SVM)

Zur Veranschaulichung wurden die mRNA-Spiegel einiger auffallend auf *P. citricola* reagierender Probennahmezeitpunkte und CO₂-Expositionen innerhalb der einzelnen funktionellen Klassen aufgereiht. Durch die SVM wurde jede EST als Vektor dargestellt, dessen Koordinaten sich aus den log₂Ratios der verschiedenen Schadbilder einer Exposition zusammensetzten. Die Vektoren, deren Koordinaten alle betragsmäßig kleiner als eins waren, wurden aus der Messreihe gestrichen, die anderen werden im Folgenden dargestellt.

Die Aufreihung der Transkriptspiegel nach den funktionellen Klassen für den Probennahmezeitpunkt 24 Stunden ergab für die Buchen (1x CO₂) eher Werte um Null, wohingegen die log₂Ratios der Buchen in der 2x ambienten Atmosphäre von unter -5 bis 5 streuten (Abbildung 17).

Durch die *P. citricola*-Infektion waren vor allem nach 41 Stunden die Transkriptspiegel der Buchen unter 2x ambienten CO₂-Bedingungen vermindert, wohingegen sie in den Buchen unter 1x ambientem CO₂ um Null schwankten (Abbildung 17).

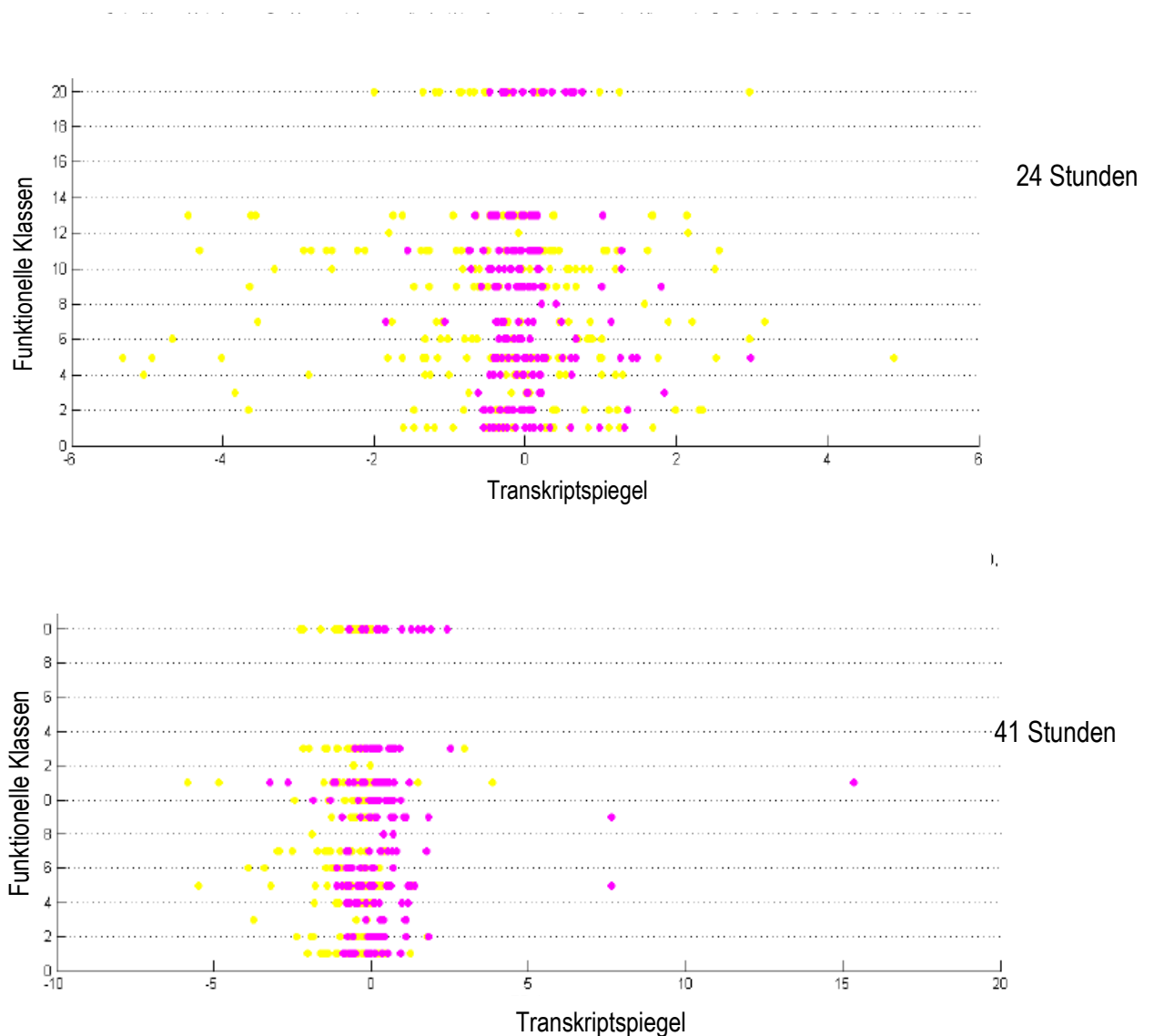


Abbildung 17: Aufreihung der Transkriptspiegel der Klimakammerbuchen unter 1x und 2x ambienten CO₂-Bedingungen, 24 und 41 Stunden nach der Infektion mit *P. citricola* (pink = 1x CO₂; gelb = 2x CO₂). Die Funktionellen Klassen sind von 1 bis 20 durchnummeriert, falls notwendig, werden diese im laufenden Text erklärt.

Tendenziell waren sechs Tage nach der Infektion in den Buchen unter 1x ambienten CO₂-Bedingungen die Transkriptspiegel eher unter Null zu finden, wohingegen die mRNA-Spiegel der 2x ambient CO₂ behandelten Buchen sowohl Werte unter, als auch über Null aufwiesen. Die Transkriptspiegel der Buchen unter 1x ambientem CO₂ zeigten in den funktionellen Klassen Signaltransduktion (10), Sekundärmetabolismus (20), Abwehr und Krankheit (11) log₂Ratios zwischen Null und 1.

Am 16. Tag nach der Infektion wurde eine deutliche Induktion von ESTs aus allen funktionellen Klassen in den Buchen unter 2x ambientem CO₂ festgestellt (Abbildung 18). Die Transkript-

spiegel der Buchen unter 2x ambientem CO₂ streuten eher um Null mit einer leichten Tendenz zu Werten unter -1.

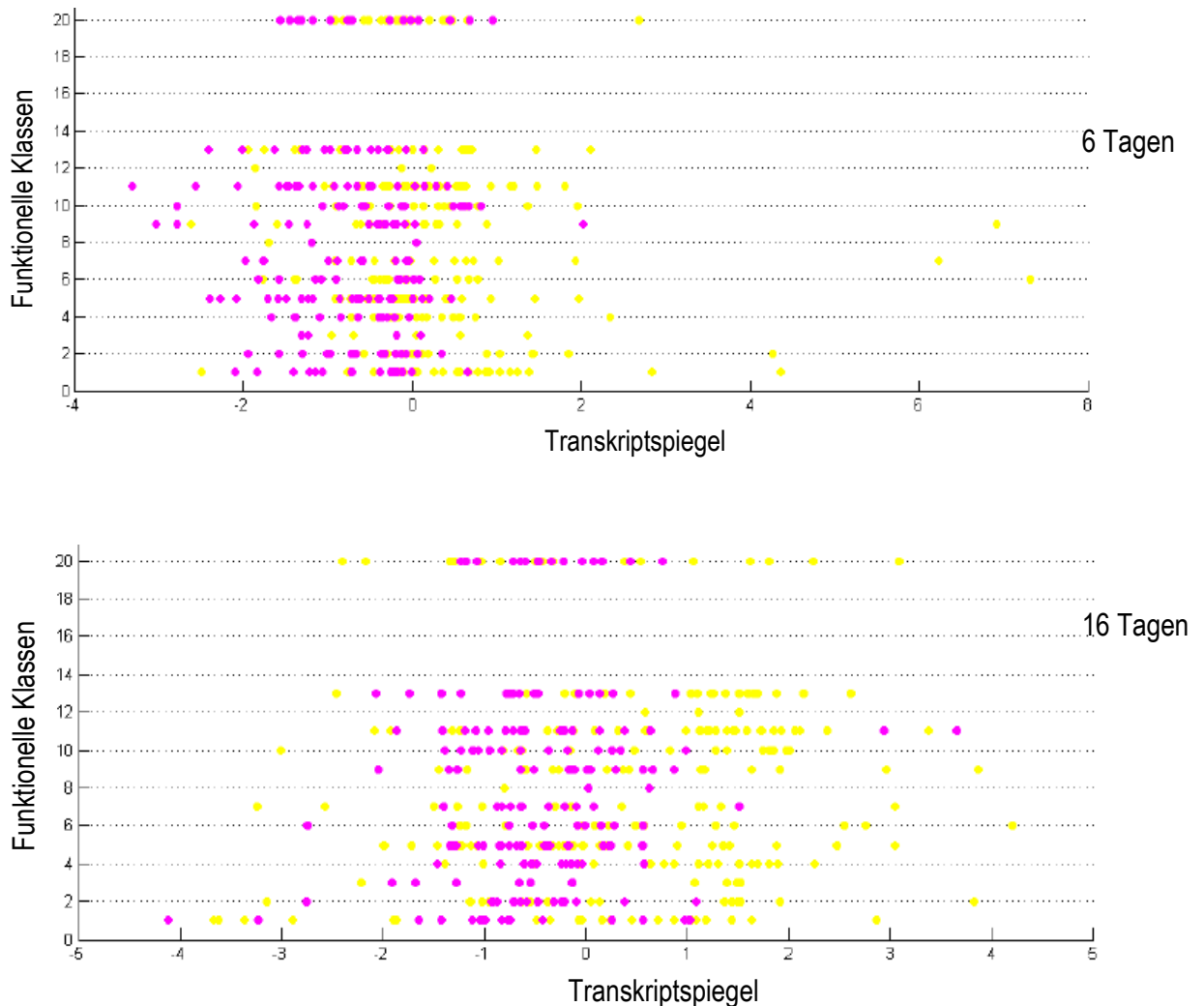


Abbildung 18: Aufreihung der Transkriptspiegel der Klimakammerbuchen unter 1x und 2x ambienten CO₂-Bedingungen, sechs und 16 Tage nach der Infektion mit *P. citricola* (pink = 1x CO₂; gelb = 2x CO₂).

Das Maschinelle Lernen mittels SVM ergab die beste Trefferquote mit 83% in Hinblick auf die CO₂-Exposition unter Einbeziehung von fünf Probenahmeterminen (sechs Tage, 41 Stunden, 16 Tage, 24 Stunden und drei Tage) und aller funktioneller Gruppen (Abbildung 19).

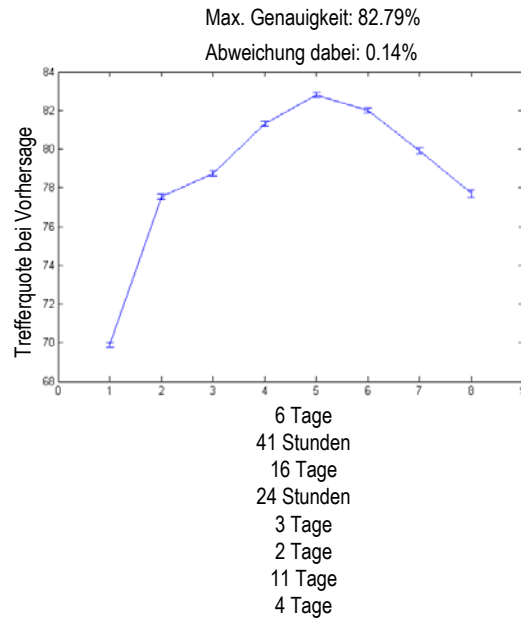


Abbildung 19: Vorhersage der Trefferquote durch die Trennung bezüglich der CO₂-Konzentration durch *P. citricola* Infektion. Trennung unter Einbeziehung aller funktionellen Klassen.

Die mittlere Genauigkeit der Merkmale nach sechs Tagen und 41 Stunden erreichte alleine schon 78% (Abbildung 20).

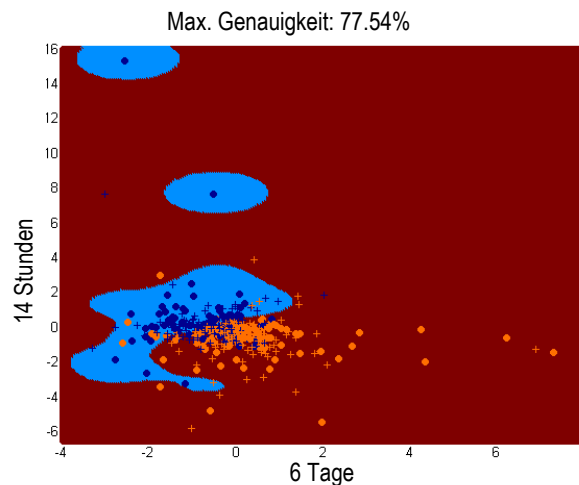


Abbildung 20: Durch SVM generierte Trennbilder bezüglich CO₂-Exposition (blau = 1x CO₂, orange = 2x CO₂) nach der *P. citricola* Infektion. Einbezogen waren alle funktionellen Klassen.

Die gezielte Betrachtung der funktionellen Gruppen des Grundstoffwechsels ergab die beste Trefferquote von 84% bei der Vorhersage der CO₂-Behandlung durch das Heranziehen der vier Probenahmezeitpunkte sechs Tage, 41 und 24 Stunden sowie drei Tage (Abbildung 21).

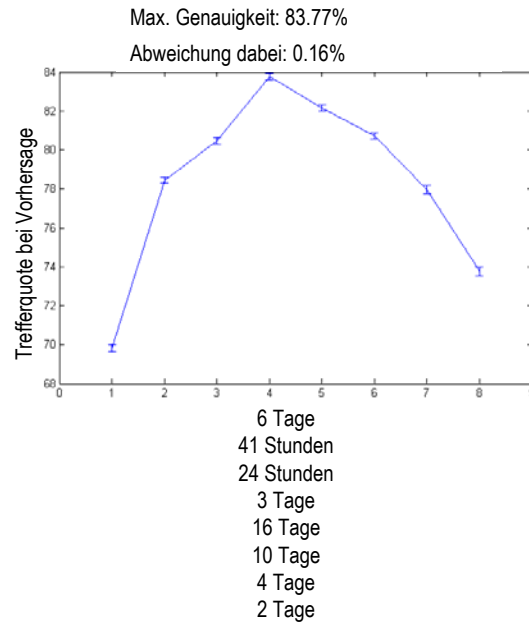


Abbildung 21: Vorhersage der Trefferquote durch die Trennung bezüglich der CO₂-Konzentration durch *P. citricola* Infektion. Trennung unter Einbeziehung der funktionellen Klassen des Grundmetabolismus.

Das zugehörige Trennbild zeigt eine 79% Genauigkeit nach sechs Tagen und 41 Stunden, wobei die Transkriptspiegel nach sechs Tagen im ambienten Milieu eher reduziert waren und nach 41 Stunden eher induziert (Abbildung 22).

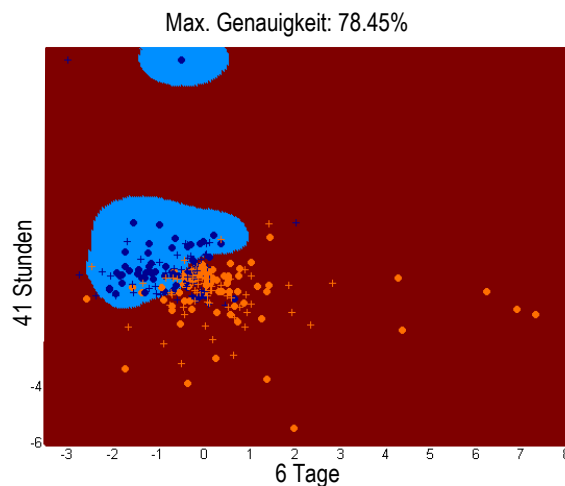


Abbildung 22: Durch SVM generierte Trennbilder bezüglich CO₂-Exposition (blau = 1x CO₂, orange = 2x CO₂), nach der *P. citricola* Infektion. Einbezogen waren die funktionellen Klassen des Grundstoffwechsels.

Wurden nur die funktionellen Klassen Signaltransduktion, Sekundärstoffwechsel, Abwehr/ Krankheit betrachtet, wurde eine Trefferquote von 79% unter Einbeziehung der Probennahmetermine sieben Stunden, fünf Tage, 15 Tage und zwei Tage erhalten (Abbildung 23).

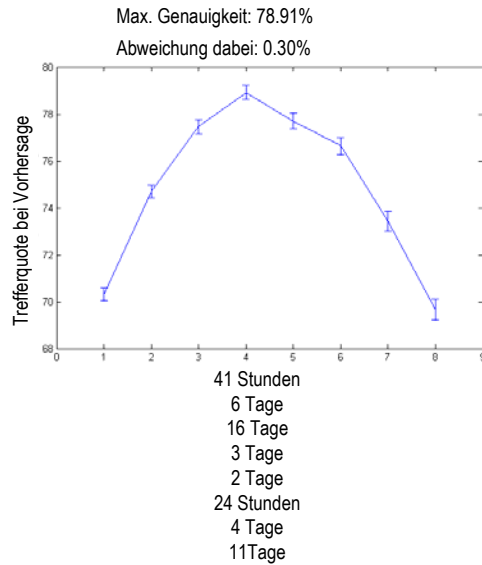


Abbildung 23: Vorhersage der Trefferquote durch die Trennung bezüglich der CO₂-Konzentration durch *P. citricola* Infektion. Trennung unter Einbeziehung der funktionellen Klassen Signaltransduktion, Sekundärmetabolismus, Abwehr und Krankheit.

Bereits nach 41 Stunden und sechs Tagen wurde eine Vorhersagequote von 74% erzielt (Abbildung 24).

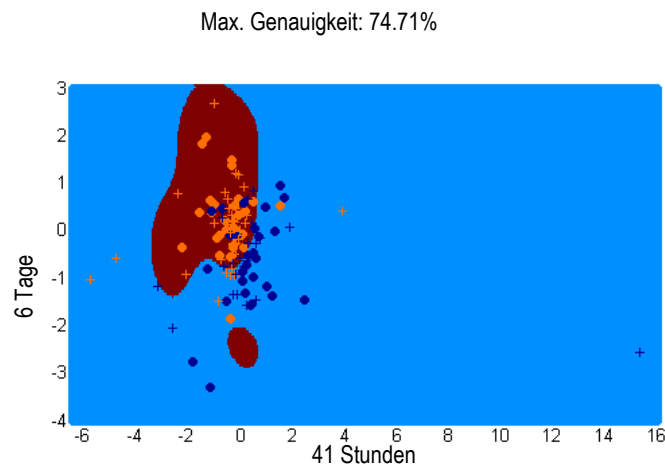


Abbildung 24: Durch SVM generierte Trennbilder bezüglich CO₂-Exposition (blau = 1x CO₂, orange = 2x CO₂), nach der *P. citricola* Infektion. Einbezogen waren die funktionellen Klassen Signaltransduktion, Sekundärmetabolismus, Abwehr und Krankheit.

Insgesamt trug der vierte Tag nach der *P. citricola*-Infektion nicht zur Vorhersage, unter welcher CO₂-Konzentration die Buchen standen, bei. Wichtig für diese Aussage waren immer die Zeitpunkte nach sechs Tagen und 41 Stunden. Um eine gute Trennung zu erreichen mussten wenigstens vier Zeitpunkte berücksichtigt werden.

3.4 Expositionskammerversuch - Ozoneinfluss auf Buchen in Mono- und Mischkultur

Da das Probenmaterial stark begrenzt war, konnten nur für einige Zeitpunkte vier Slides analysiert werden. Zur Auswertung wurden nur die Transkriptspiegel herangezogen, die auf mindestens zwei Drittel der Slides zu sehen waren und deren Korrelationskoeffizienten einen Wert unter 50 aufwiesen (dunkel markiert) oder deren Transkriptspiegel sich aus ein bis vier Medianen von je ein bis vier verschiedenen Slides zusammensetzten (hell markiert).

3.4.1 Bestimmung des Transkriptspiegels mittels Microarray

Die Bäume unter 2x ambientem Ozon erhielten am 09.06.05 eine zusätzliche Ozonerhöhung auf 200 ppb. In Betrachtung des Primärmetabolismus reagierten die Buchen der Reinkultur erst nach 48 Stunden auf den Ozonpeak, zu diesem Zeitpunkt war ein Kofaktor reprimiert. Am dritten Tag nach dem Ozonpeak waren die Phosphoribosylanthranilatisomerase, sowie das Polyglutamin-bindende Protein und die Phosphoglyceromutase induziert.

Tabelle 28: Ozon-veränderte Transkriptspiegel (\log_2 Ratio) von ESTs des Primär- und Energiemetabolismus, der Buchen in Mono- und Mischkultur mit Fichte zu den Probennahmezeitpunkten: 02.06.05; 0 Stunden vor Erhöhung der Ozon-Konzentration auf 200 ppb und 16 Stunden bis 3 Tage danach. (rot = induziert, CV<50; orange = induziert, n=1-4; dunkelgrün = reprimiert, CV<50; hellgrün = reprimiert, n=1-4).

Genname	Monokultur						Mischkultur					
	02.06.	0h	16h	24h	48h	3d	02.06.	0h	16h	24h	48h	3d
Primärmetabolismus												
Aminosäure												
Phosphoribosylanthranilate isomerase	-0.02	-0.19	-0.15	-0.14	0.13	1.72	0.12	-0.10	1.04	0.06	0.20	0.29
Polyglutamine binding protein variant 4 (PQBP1 gene)	-0.19	-0.04	-0.38	0.10	-0.20	1.23	-1.16	0.29	0.66	0.03	-0.27	0.88
Polyglutamine binding protein variant 4 (PQBP1 gene)	-0.26	-0.64	-0.41	-0.53	0.39	0.78	0.19	-0.76	x	-0.24	1.04	0.49
Polyglutamine binding protein variant 4 (PQBP1 gene)	-1.02	0.28	0.58	-0.69	-0.03	x	-0.39	-1.03	0.56	0.49	-1.90	-0.29
Polyglutamine binding protein variant 4 (PQBP1 gene)	-0.09	-0.13	-0.15	0.17	-0.17	3.99	-1.59	0.25	0.95	-0.02	-0.32	-0.22
Polyglutamine binding protein variant 4 (PQBP1 gene)	0.06	-0.02	0.02	-0.07	0.01	1.51	-0.25	0.01	-0.18	0.11	0.21	-0.37
Polyglutamine binding protein variant 4 (PQBP1 gene)	-1.51	-0.08	-0.62	x	-0.22	1.50	-1.44	0.21	2.01	0.06	0.18	0.14
Polyglutamine binding protein variant 4 (PQBP1 gene)	-0.63	-0.64	3.25	x	-0.35	4.08	0.38	-0.61	-2.06	0.43	-2.60	x
Polyglutamine binding protein variant 4 (PQBP1 gene)	1.07	0.14	1.64	x	0.47	1.99	0.92	-0.21	1.50	0.54	0.61	0.00
Zucker und Polysaccharide												
Glycoside hydrolase, family 1	-0.27	-2.21	0.61	3.09	-0.89	2.44	-0.91	1.15	1.80	0.13	-1.58	0.43
Phosphoglyceromutase	0.30	-0.65	0.05	-0.24	-0.34	1.94	0.17	0.07	-0.05	-0.32	0.10	-0.25
Lipide/ Sterole												
Amidase	-0.61	-0.28	0.66	-4.73	0.44	-0.87	0.29	-0.08	0.14	-0.40	1.01	-0.81
Kofaktoren												
Putative reduced viability upon starvation protein 161	-0.09	-0.59	-0.40	-0.14	-1.31	x	-0.62	0.38	0.08	-0.12	-0.76	0.13
Energie												
Glykolyse												
Triosephosphate isomerase	0.23	0.04	0.03	-0.46	0.23	1.58	-0.19	0.05	-0.06	0.27	-0.55	0.28
Glukoneogenese												
Glutaredoxin I	0.44	-0.35	0.06	0.05	-0.04	2.04	0.25	-0.25	0.03	0.06	0.01	-0.54
Glutaredoxin I	-2.28	-0.23	0.81	x	0.02	4.20	-1.07	-1.16	-1.54	-0.17	0.41	1.13
Elektronentransport												
Oxidoreductase	-1.62	0.26	-0.16	x	0.29	-1.77	0.92	-0.33	-0.11	0.04	2.98	0.53
Plastoquinol-plastocyanin reductase = cytochrome b6f	1.26	-0.42	0.36	x	-0.17	3.43	x	-0.07	x	0.31	2.28	0.92
Photosynthese												
Cytosolic aldolase	-0.16	-0.58	-0.04	-0.28	-0.36	1.40	-0.22	0.20	0.03	-0.16	-0.05	-0.40
Nuclear-encoded chloroplast ribulose-5-phosphate 3-epimerase	-2.06	-0.63	-0.97	-0.37	-1.15	0.54	-0.52	0.48	0.55	0.10	-1.24	0.12

In den Buchen in Konkurrenz mit Fichte zeigte das Polyglutamin-bindende Protein durch 2x ambientes Ozon am 02.06.05 einen reduzierten Transkriptspegel (Tabelle 28). Zudem war in diesen Buchen die Glykosidhydrolase zu den Zeitpunkten 0 und 16 Stunden induziert. Außerdem zeigte nach 16 Stunden die Phosphoribosylanthranilatisomerase einen erhöhten mRNA-Spiegel. Das Polyglutamin-bindende Protein war nach 16 und 48 Stunden in den Buchen in Konkurrenz mit Fichte sowohl induziert, als auch reprimiert.

Bezüglich des Energiehaushaltes (Tabelle 28) war die Kern-kodierte Chloroplastenribulose-5-Phosphat 3-Epimerase nach 48 Stunden in den Buchen der Monokultur reprimiert. Transkriptakkumulationen hingegen wurden bei der Triosephosphatisomerase (Glycolyse), dem Glutaredoxin I (Gluconeogenese) und der zytosolischen Aldolase (Photosynthese) festgestellt.

Buchen in Konkurrenz mit Fichte wiesen nach 16 Stunden einen reduzierten mRNA-Spiegel des Glutaredoxins I auf. Nach 48 Stunden zeigten die Oxidoreduktase und die Plastoquinol-Plastocyaninreduktase des Elektronentransportes einen erhöhten Transkriptspegel.

Die Buchen der Mischkultur wiesen bezüglich Zellwachstum/-teilung und Transkriptionsfaktoren keine mRNA-Konzentrationsänderungen auf.

In den Buchen der Monokultur zeigte genau vor dem Ozonpeak ein putatives Cytochrom C Oxidaseprotein einen reduzierten Transkriptspegel (Tabelle 29). Nach drei Tagen waren die 9-Cis-Epoxy-Carotenoiddioxygenase 4 und ein Transkriptionsfaktor des WRKY-Typs induziert.

Tabelle 29: Ozon-veränderte Transkriptspegel (\log_2 Ratio) von ESTs des Zellwachstum, der Zellteilung und der Transkription, der Buchen in Mono- und Mischkultur mit Fichte zu den Probennahmezeitpunkten: 02.06.05; 0 Stunden vor Erhöhung der Ozon-Konzentration auf 200 ppb und 16 Stunden bis 3 Tage danach (orange = induziert, n=1-4; hellgrün = reprimiert, n=1-4).

Genname	Monokultur						Mischkultur					
	02.06. 0h	16h	24h	48h	3d		02.06. 0h	16h	24h	48h	3d	
Zellwachstum/ -teilung												
Rekombination/ Reparatur												
Putative cytochrome C oxidase proteins	-0.41	-1.07	0.09	-0.25	-1.05	x	-0.13	-0.26	-0.40	-0.35	0.25	-0.03
Wachstumsregulatoren												
Nine-cis-epoxycarotenoid dioxygenase4	0.53	0.27	0.16	-0.32	0.83	1.41	0.55	0.11	0.11	0.47	1.31	-0.33
Transkriptionsfaktoren												
WRKY-type transcription factor	-0.42	-0.51	-0.12	-2.13	-0.22	1.64	0.09	0.79	-0.27	-0.34	0.46	0.49

Innerhalb der Proteinsynthese war die 18S ribosomale RNA eine Woche vor Erhöhung der Ozonkonzentration auf 200 ppb und 48 Stunden nach dem Ozonpeak in den Buchen der Monokultur und von 0 bis 48 Stunden in den Buchen der Mischkultur reprimiert (Tabelle 30). Die

3-Deoxy-D-Arabino-Heptulosonat-7-Phosphatsynthase wies vor dem Ozonpeak einen verminderten mRNA-Spiegel in den Buchen der Reinkultur auf. Ein ribosomales Protein (S6), die 26S Proteasom β -Untereinheit und die 26S ribosomale RNA waren in der Monokultur nach drei Tagen induziert. In den Buchen der Mischkultur besaß weiterhin nach 16 Stunden ein ribosomales Protein (Plastid) einen erhöhten Transkriptspiegel.

Nach drei Tagen war jeweils ein EST der Proteolyse in den Buchen der Mono- (SKP1/ASK-ähnliches Protein) und Mischkultur (Arginindecaboxylase) induziert.

Ein BAT1 Transporter wies in den Buchen der Mischkultur durch 2x ambientes Ozon (02.06.05) und in den Buchen der Monokultur zwei und drei Tage nach dem Ozonpeak einen reduzierten Transkriptspiegel auf (Tabelle 30). Der Adeninnukleotidtranslokator war in der Mischkultur nach 48 Stunden reprimiert.

Tabelle 30: Ozon-veränderte Transkriptspiegel (\log_2 Ratio) von ESTs der Proteinsynthese, des Proteinverbleibs, der Proteinlagerung und des Transportes der Buchen in Mono- und Mischkultur mit Fichte zu den Probenahmezeitpunkten: 02.06.05; 0 Stunden vor Erhöhung der Ozon-Konzentration auf 200 ppb und 16 Stunden bis 3 Tage danach (rot = induziert, CV<50; orange = induziert, n=1-4; dunkelgrün = reprimiert, CV<50; hellgrün = reprimiert, n=1-4).

Genname	Monokultur						Mischkultur					
	02.06.	0h	16h	24h	48h	3d	02.06.	0h	16h	24h	48h	3d
Proteinsynthese												
Ribosomales Protein												
Plastid ribosomal protein PRPL5	-0.99	0.29	0.08	0.00	-0.34	-1.35	0.17	-0.22	1.08	-0.14	0.68	0.25
S6 ribosomal protein (rps6 gene)	-0.10	-0.03	0.06	-0.02	0.37	1.17	-0.07	0.23	0.32	0.02	0.03	-0.31
Ribosomale RNA												
18S ribosomal RNA	0.83	-0.22	0.61	-0.19	-0.07	-0.34	-0.53	-1.36	-1.70	-1.74	-2.64	-2.35
18S ribosomal RNA	-2.06	-0.59	-0.91	0.06	-0.81	x	-0.56	0.48	0.69	0.08	-1.22	0.15
18S ribosomal RNA	x	-0.86	-0.66	x	-1.50	0.99	-0.68	0.46	0.53	-0.20	-0.28	-0.05
26 rRNA a	-0.17	0.01	0.19	0.20	0.40	1.82	-0.12	0.06	0.31	0.07	-0.30	-0.23
26S proteasome beta subunit	0.74	-0.42	-0.04	0.08	-0.35	2.37	-1.61	-0.70	0.04	0.06	0.03	0.62
3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase	-0.45	-1.32	0.16	0.54	-0.90	x	0.28	-0.03	0.92	-0.49	-1.74	-0.62
Proteinverbleib/-lagerung - Proteolyse												
Arginin decarboxylase	-0.16	-0.66	0.00	-0.85	-0.51	2.57	-0.55	0.27	0.61	-0.11	0.70	2.02
SKP1/ASK1-like protein (skp1)	-0.11	-0.48	-0.10	-0.10	-0.10	2.19	0.07	-0.35	0.14	0.03	0.00	-0.07
Transporter - ABC-Typ												
BAT1	-0.22	-0.83	0.19	-0.12	0.08	-1.54	0.22	0.78	0.70	-0.24	-0.26	0.67
BAT1	-1.60	-0.05	-0.88	x	-0.22	-1.96	-2.53	0.06	0.96	-0.01	-0.34	0.87
BAT1	-2.02	-0.76	-0.40	0.00	-1.68	0.96	-0.72	0.27	0.66	-0.32	-0.97	-0.16
Intrazellulärer Transport - Mitochondrien												
Adenine nucleotide translocator	-0.15	-0.32	-0.49	0.53	-0.92	x	-0.33	0.12	0.15	0.03	-1.78	-0.20

Am 02.06.05 (2x Ozon) war in den Buchen der Mischkultur die mRNA-Konzentration des α -Tubulins der Zellstruktur erhöht. In den Buchen der Monokultur zeigte unmittelbar vor dem Ozonpeak ein putatives Membranprotein einen reduzierten Transkriptgehalt. Im Übrigen waren drei ESTs der Zellwand/Stressantwort nach drei Tagen und eines nach 24 Stunden induziert, genauso wie zwei ESTs des Zytoskeletts und ein EST des Chloroplasten (siehe Tabelle 31).

In den Buchen der Monokultur reduzierte das Ethylen-resistente Protein durch 2x ambientes Ozon am 02.06.05 seinen Transkriptspiegel, ebenso die ACC Oxidase 1a der Buchen in Konkurrenz mit Fichte (Tabelle 31). Nach 24 Stunden war der mRNA-Spiegel der ACC Synthase in der Mischkultur verringert. Nach drei Tagen war die ACC Oxidase b in den Buchen der beiden Kulturen induziert. In den Buchen der Monokultur zeigten zudem die Kinasen, CBL-interagierende Proteinkinase, Proteinkinase und Wund-induzierte Proteinkinase, erhöhte mRNA-Mengen.

Tabelle 31: Ozon-veränderte Transkriptspiegel (\log_2 Ratio) von ESTs der Zellstruktur und der Signaltransduktion, der Buchen in Mono- und Mischkultur mit Fichte zu verschiedenen Probennahmezeitpunkten: 02.06.05; 0 Stunden vor Erhöhung der Ozon-Konzentration auf 200 ppb und 16 Stunden bis 3 Tage danach (rot = induziert, CV<50; orange = induziert, n=1-4; dunkelgrün = reprimiert, CV<50).

Genname	Monokultur						Mischkultur					
	02.06.	0h	16h	24h	48h	3d	02.06.	0h	16h	24h	48h	3d
Zellstruktur												
Zellwand/Stressantwort												
Hydroxyproline-rich glycoprotein family protein	-0.13	0.13	0.01	2.01	0.02	-0.12	0.24	-0.02	-0.85	-0.14	0.19	0.20
Putative membrane protein	-0.41	-1.15	-0.35	-0.21	-0.25	-2.78	-0.67	-0.69	0.05	-0.37	0.33	0.54
Putative membrane protein (pon1 gene)	-0.61	0.36	0.24	0.09	0.10	1.00	0.04	-0.17	-0.13	0.24	0.05	0.39
Seven transmembrane protein Mlo5	-0.41	-0.31	-0.23	-0.34	-0.03	2.50	0.63	-0.15	-0.13	0.02	0.28	-0.38
Xyloglucan endotransglucosylase-hydrolase XTH5	0.19	-0.13	0.06	-0.09	0.06	1.15	0.47	0.36	0.19	0.09	-0.11	2.00
Zytoskelett												
Actin	0.19	-0.15	0.29	-0.04	0.09	1.08	-0.44	0.02	-0.35	-0.13	0.09	0.39
Alpha-tubulin	0.14	0.62	-0.15	0.23	0.80	1.62	1.51	0.05	0.37	0.43	-0.40	0.19
Chloroplast												
Rieske [2Fe-2S] region	-0.47	0.21	0.75	3.61	-0.44	1.57	-0.21	0.04	x	0.33	0.59	0.18
Signaltransduktion												
Kinasen												
CBL-interacting protein kinase 6	0.23	0.21	0.18	-0.11	0.37	1.33	0.13	0.11	0.42	0.16	0.33	0.28
Protein kinase	0.16	-0.03	0.13	-0.11	0.30	1.34	0.12	0.05	-0.05	0.22	-0.36	-0.12
Wound-induced protein kinase	-2.92	-0.56	-0.38	x	-0.26	2.43	0.07	-1.00	-0.90	-0.11	0.05	0.46
Sonstige												
ACC synthase/ transaminase/ transferase	-0.90	-0.55	-0.34	-0.59	-0.58	-0.15	-0.51	-0.55	-0.43	-1.02	-0.29	0.95
ACC oxidase 1 a	-0.28	-0.29	-0.01	-0.34	0.01	x	-1.03	0.22	0.72	-0.12	0.33	1.57
ACC oxidase b	0.07	-0.62	0.09	-0.49	0.27	x	-0.72	0.29	0.98	-0.02	-0.06	1.26
ACC oxidase b	-0.47	-0.06	0.12	-0.17	-0.07	1.72	-0.90	0.13	0.58	-0.04	0.09	-0.12
Ethylene resistant	-1.54	-0.39	0.27	-0.38	-0.33	0.36	-0.65	0.06	0.98	-0.09	0.31	0.92

In Hinblick auf die funktionelle Klasse Abwehr/Krankheit waren in den Buchen der Mischkultur zum Zeitpunkt 0 Stunden die Lipoxygenase, ein Krankheitsresistenzprotein und die β -Glucanase reprimiert, in den Buchen der Monokultur die Allenoxidsynthase, Glutathion S-Transferase und eine Isoform des Prunasinhydrolasevorläufers (Tabelle 32). Durch 200 ppb Ozon zeigten die β -Glucanase nach 24 Stunden, die Allenoxidsynthase nach 48 Stunden und ein Krankheitsresistenzprotein nach 16 Stunden in der Mischkultur einen reduzierten Transkriptspiegel. Nur die Isoform des Prunasinhydrolasevorläufers war in der Mischkultur nach 16 Stunden induziert.

In den Buchen der Reinkultur war hingegen als Folge auf den Ozonpeak das auf Kälteakklimatisierung-antwortende Protein nach 48 Stunden und ein durch Aluminium-induziertes Protein nach drei Tagen reprimiert. Die acht folgenden ESTs waren in den Buchen der Monokultur drei Tage nach dem Ozonpeak induziert: das 14-3-3 verwandtes Protein, ein Homologe des Abscisin Stress reifenden Proteins, die Cysteinprotease, das DNAJ Hitzeschock N-terminale Domäne-enthaltende Protein, das Schwermetall-assoziierte Domänen-enthaltende Protein/CC-verwandt, die Eisensuperoxiddismutase, die Isoform des Prunasinhydrolasevorläufers und die Zeaxanthinepoxidase.

Tabelle 32: Ozon-veränderte Transkriptspiegel (\log_2 Ratio) von ESTs der Abwehr/Krankheit und des Sekundärmetabolismus, der Buchen in Mono- und Mischkultur mit Fichte zu verschiedenen Probennahmezeitpunkten: 02.06.05; 0 Stunden vor Erhöhung der Ozon-Konzentration auf 200 ppb und 16 Stunden bis 3 Tage danach (rot = induziert, CV<50; orange = induziert, n=1-4; dunkelgrün = reprimiert, CV<50; hellgrün = reprimiert, n=1-4).

Genname	Monokultur						Mischkultur					
	02.06.	0h	16h	24h	48h	3d	02.06.	0h	16h	24h	48h	3d
Abwehr/ Krankheit												
Abwehrverwandt												
14-3-3 related protein SGF14A	-0.05	-0.05	0.03	0.00	0.19	1.78	0.02	-0.01	0.12	0.06	0.08	0.10
Allene oxide synthase	-0.69	-2.29	-0.06	0.09	-0.14	-0.16	1.05	-0.30	-0.02	-0.91	-1.52	0.23
Beta Glucanase	-1.38	-0.87	0.00	0.58	-0.45	0.67	0.23	-1.27	-0.15	-1.40	-1.97	-1.26
Stressantwort												
Abscisic stress ripening protein homolog	-0.01	0.30	-0.09	0.28	0.03	1.19	-0.05	-0.37	0.32	-0.12	-0.18	0.70
Al-induced protein	0.61	0.51	0.42	0.19	0.45	-1.02	0.46	0.47	0.59	0.96	-0.08	-0.48
Cold acclimation responsive protein BudCAR5	0.04	-0.59	-0.33	-0.25	-1.13	0.59	-0.19	-0.42	-0.07	0.12	0.73	-0.20
Cysteine protease	-0.56	-0.32	0.25	0.03	0.00	1.00	0.11	0.03	0.13	0.00	0.27	-0.10
DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein	-0.50	-0.34	-0.43	-0.23	-0.57	1.49	-0.15	-0.48	0.05	0.10	0.35	0.08
Heavy-metal-associated domain-containing protein/ CC-related	-0.37	-0.01	0.23	0.34	-0.49	1.84	0.31	0.08	-0.41	-0.06	0.38	0.39
Entgiftung												
Glutathione S-transferase	-0.35	-1.39	-0.05	-0.02	-1.64	2.55	-0.95	-0.61	0.08	-0.19	-1.14	0.19
Lipoxygenase	0.02	-0.62	0.35	0.24	-0.35	0.57	-1.63	-0.28	0.37	0.62	-0.33	-2.31
Superoxiddismutase Fe	0.35	-0.15	0.16	-0.22	-0.61	1.50	1.67	-1.12	-0.39	0.31	0.20	x
Wundinduziertes Protein												
Disease resistance protein	-2.02	-0.13	-0.04	x	0.15	x	-1.81	-1.27	-1.40	-0.57	0.08	-0.63
Prunasin hydrolase isoform PH I precursor (PH-S1)	-0.11	-1.27	-0.51	1.26	-1.20	1.54	-0.73	0.81	1.20	0.40	-1.51	0.73
Zeaxanthin epoxidase	-0.82	0.22	0.52	-0.16	0.82	1.97	-0.03	0.04	-0.76	0.21	0.28	0.12
Sekundärmetabolismus												
Phenolpropanoide/ Phenole												
4-coumarate:CoA ligase	1.24	-0.43	0.04	x	-0.09	0.82	1.03	-0.09	0.25	0.17	-0.71	x
Anthocyanidin synthase	-0.44	-0.47	0.28	0.96	-0.13	3.03	1.86	0.66	0.39	0.48	0.32	-1.39
Caffeic acid O-methyltransferase	-1.77	-0.54	-0.22	x	-1.59	1.33	-0.36	0.20	-0.28	-0.15	-0.92	-0.10
Caffeic acid O-methyltransferase	-1.12	-0.51	-0.65	x	-1.19	2.62	-0.84	0.46	0.42	-0.13	-0.72	0.02
Caffeic acid O-methyltransferase (COMT) Gruppe 1	-0.88	-0.78	-0.70	-0.52	-1.45	1.58	-0.67	0.31	0.49	-0.14	-0.05	-0.04
Chalconsynthase	-0.31	-0.38	0.44	2.65	-0.84	0.97	1.38	0.27	1.54	0.72	0.64	-1.55
Flavanone 3-hydroxylase (F3H gene)	-0.26	-0.68	0.13	2.31	-0.63	x	0.47	0.63	1.13	0.85	0.67	-1.99
O-diphenol-O-methyltransferase Gruppe 2	-0.43	-0.79	-0.80	-0.15	-1.17	1.73	-0.69	0.29	0.51	0.05	-0.38	0.17
Sonstige												
Benzoyl coenzyme A: benzyl alcohol benzoyl transferase	-0.21	0.02	0.03	0.01	-0.53	1.02	-0.01	0.08	0.03	0.10	0.32	0.29
Chorismatsynthase	-0.08	-0.64	0.40	1.00	0.07	x	0.26	0.21	0.35	-0.28	-0.38	-0.56
Cinnamic acid 4-hydroxylase	-1.96	-0.14	0.63	2.49	-0.89	3.67	0.98	1.00	1.54	0.50	0.29	-1.69
Dehydroquinatehydrogenase-shikimat-synthase	-2.36	-0.23	-0.10	0.37	0.11	1.16	0.28	0.30	0.04	0.27	0.27	-0.48
Polyphenol oxidase	-0.53	-1.21	-0.58	-0.13	-0.03	2.25	0.30	-0.66	0.65	0.50	-0.54	-0.41

Durch 2x ambientes Ozon waren in den Buchen der Monokultur am 02.06.05 die Polyphenoloxidase (Sekundärstoffwechsel) reprimiert und in den Buchen der Mischkultur die 4-Coumarat:CoALigase und Chalkonsynthase induziert (Tabelle 32).

Chalkonsynthase und Flavanon-3-Hydroxylase waren in der Mischkultur (16 Stunden) früher induziert als in der Reinkultur (24 Stunden). Weiterhin reagierten die Buchen in der Konkurrenz mit Fichte ebenso nach 16 Stunden mit einem Transkriptspiegelanstieg der Zimtsäure-4-Hydroxylase, die Anthocyanidinsynthase war nach drei Tagen reprimiert.

Die Buchen der Reinkultur zeigten nach 24 Stunden einen Transkriptanstieg der Chorismat-synthase, nach 48 Stunden waren OMT's reprimiert. Drei Tage nach dem Ozonpeak waren folgende Transkriptspiegel der Buchen in Monokultur erhöht: drei OMT's, Benzoylcoenzyme A: Benzylalkoholbenzoyl-transferase und Dehydroquinatdehydrogenase-Shikimatsynthase.

Die Aldehyddehydrogenase war in den Buchen der Mischkultur mit Fichte am 02.06.05 reprimiert, die Aldo-Ketoreduktase in den Buchen der Monokultur unmittelbar dem Ozonpeak (Tabelle 33). Weiterhin waren in den Buchen der Reinkultur unklassifizierte ESTs am 02.06.05 und 48 Stunden nach Exposition des Ozonpeaks reprimiert während ein anderes nach drei Tagen induziert war. In den Buchen in Konkurrenz mit Fichte zeigte nur eine unklassifizierte EST einen verminderten Transkriptspiegel.

Tabelle 33: Ozon-veränderte Transkriptspiegel (\log_2 Ratio) von unklassifizierten ESTs, der Buchen in Mono- und Mischkultur mit Fichte zu verschiedenen Probenahmezeitpunkten: 02.06.05; 0 Stunden vor Erhöhung der Ozon-Konzentration auf 200 ppb und 16 Stunden bis 3 Tage danach (rot = induziert, CV<50; orange = induziert, n=1-4; dunkelgrün = reprimiert, CV<50; hellgrün = reprimiert, n=1-4).

Genname	Monokultur						Mischkultur					
	02.06.	0h	16h	24h	48h	3d	02.06.	0h	16h	24h	48h	3d
Unklare Klassifizierung												
Aldehyde dehydrogenase	-0.24	-0.15	-0.38	-0.47	-0.19	0.84	-2.46	0.13	-0.26	-0.16	-0.36	-0.56
Aldo-keto reductase	-0.92	-1.09	-0.07	0.15	-0.60	x	-0.82	-0.02	-0.04	0.00	0.10	-1.07
Expressed protein	-0.01	-0.19	-0.11	0.13	-0.35	1.48	0.15	-0.21	-0.08	0.07	-0.02	0.08
Expressed protein	-0.34	-0.49	-0.24	-0.31	-0.07	1.08	0.73	-0.11	0.16	-0.03	0.28	0.27
Hypothetical protein 3	-1.00	-0.53	-0.11	x	-0.49	2.63	0.08	-0.28	-0.33	0.65	0.33	1.33
Microsatellite DNA	-0.22	-0.62	-0.44	-0.48	-1.42	1.52	-0.26	-0.06	0.19	-0.17	-0.21	-0.12
Microsatellite sequence	-0.10	-0.18	0.40	0.01	-1.14	2.73	-2.06	0.68	0.09	0.22	-1.15	-0.04
Unknown protein	-4.04	0.01	-0.15	x	-0.04	x	0.07	0.07	-0.16	0.06	0.21	-1.20
Unknown protein	-0.54	-0.50	-0.22	x	0.38	1.70	0.09	0.00	-0.36	-0.11	0.39	-0.61
Unknown protein	-1.18	-0.12	0.01	-0.21	0.31	2.75	-0.05	-0.21	-0.38	-0.09	-0.22	-0.08
Unknown protein	-0.22	-0.40	-0.08	0.04	-0.17	x	1.09	-0.07	-0.60	-0.06	0.70	-0.73

Die Anzahl der unbekannt ESTs, die auf die Ozonbehandlung und den Ozonpeak reagierten ist Tabelle 34 zu entnehmen.

Tabelle 34: Anzahl der jeweils induzierten oder reprimierten unbekanntesten ESTs der Ozon-behandelten Buchen in Mono- und Mischkultur mit Fichte zu den Probennahmezeitpunkten: 02.06.05; 0 Stunden vor Erhöhung der Ozon-Konzentration auf 200 ppb und 16 Stunden bis 3 Tage danach.

	Monokultur						Mischkultur					
	02.06.	0h	16h	24h	48h	3d	02.06.	0h	16h	24h	48h	3d
reprimiert	16	10	1	1	12	7	15	5	11	0	7	3
induziert	0	2	1	3	2	36	2	3	12	5	3	1

3.4.2 Self-Organizing Maps (SOM)

Insgesamt reagierten die Buchen in Mono- und Mischkultur auf Transkriptebeine sehr unterschiedlich auf den Ozonpeak von 200 ppb, dieses kann sehr gut in SOM3, SOM1, SOM4, SOM5, und SOM9 (Abbildung 25, Abbildung 26, Abbildung 27, Abbildung 28 und Abbildung 29) gesehen werden. Die Buchen in Konkurrenz mit Fichte veränderten ihr Transkriptniveau kaum, nur drei Tage nach Exposition des Ozonpeaks war ein leichter Transkriptrückgang in SOM3, SOM1 und SOM4 zu erkennen (Abbildung 25, Abbildung 26 und Abbildung 27).

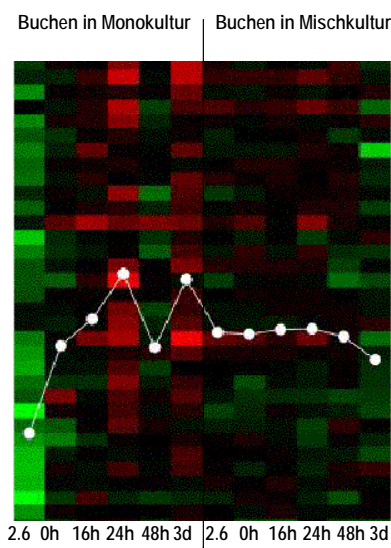


Abbildung 25: SOM3 von den Transkriptdaten der Ozon-behandelten Buchen in Mono- und Mischkultur mit Fichte zu verschiedenen Probennahmezeitpunkten (02.06.05 = 2x ambient Ozon, 0h= genau vor dem Ozonpeak von 200 ppb und 16h, 24h, 48h und 3d danach).

Tabelle 35: ESTs, die nach der SOM3 verlaufen.

Primärmetabolismus - Aminosäure
Polyglutamine binding protein variant 4 (PQBP1 gene)
Zellwachstum/ -teilung - Wachstumsregulator
Auxin-regulated protein gene
Proteinsynthese - Translationskontrolle
S1 RNA-binding domain-containing protein
Transporter - ABC-Typ
BAT1
Zellstruktur - Chloroplast
Light harvesting chlorophyll A/B binding protein (Lhcb-Pp2)
Abwehr/ Krankheit
Abwehrverwandt
Beta Glucanase
Entgiftung
Katalase a_catalase (cat2 gene)
Sekundärmetabolismus
Phenylpropanoide/ Phenole
Chalconsynthase
Cinnamic acid 4-hydroxylase
Sonstige
Dehydroquinatdehydrogenase-shikimat-synthase

Wie aus der SOM3 zu entnehmen ist wiesen die Buchen der Reinkultur am 02.06.05 einen stark reduzierten Transkriptspiegel auf (Abbildung 25). Durch die Ozonexposition waren die ESTs der SOM3 (Abbildung 25) nach 24 Stunden und nach drei Tagen deutlich induziert. Die Hälfte der in der SOM3 repräsentierten ESTs gehörte zum Sekundärstoffwechsel sowie zu Abwehr/Krankheit.

Die unterschiedliche Reaktion der Buchen in Mono- und Mischkultur war am deutlichsten am dritten Tag nach der Exposition von 200 ppb Ozon zu sehen. Zu diesem Probenahmezeitpunkt zeigten viele ESTs der Buchen in Monokultur einen erhöhten Transkriptspiegel, was gut in SOM1, SOM4 und SOM5 (Abbildung 26, Abbildung 27 und Abbildung 28) gesehen wurde. In der SOM1 (Abbildung 26) waren darunter sieben ESTs der Abwehr/Krankheit und drei ESTs des Sekundärmetabolismus sowie der Myb Transkriptionsfaktor (Tabelle 36).

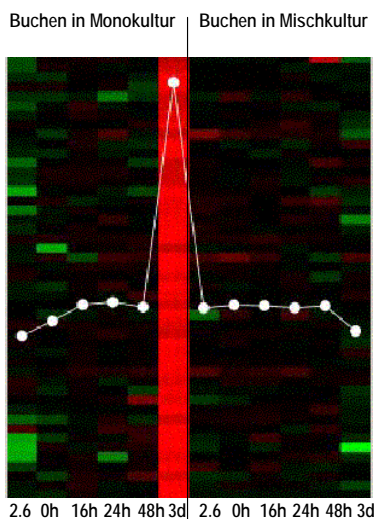


Abbildung 26: SOM1 von den Transkriptdaten der Ozon-behandelten Buchen in Mono- und Mischkultur mit Fichte zu verschiedenen Probenahmezeitpunkten (02.06.05 = 2x ambient Ozon, 0h= genau vor dem Ozonpeak von 200 ppb und 16h, 24h, 48h und 3d danach).

Tabelle 36: ESTs, die nach der SOM1 verlaufen.

Primärmetabolismus	Abwehr/ Krankheit
Aminosäure	Zelltod
Polyglutamine binding protein variant 4	Bax inhibitor
Fettsäurestoffwechsel	Stressantwort
Esterase/lipase/thioesterase	Amine oxidase
Kofaktor	Entgiftung
Putative reduced viability upon starvation protein	Catalytic/ lactoylglutathione lyase
Energie - Elektronentransport	Glutathione peroxidase 1
NADPH: quinone oxidoreductase	Stromal ascorbate peroxidase
Transkription	Superoxiddismutase Mn
Repressor	Sonstige
Histone deacetylase	Chitinase-like protein
Transkriptionsfaktor	Unklare Einteilung
Myb family transcription factor	Expressed protein
Proteinsynthese - Ribosomales Protein	Hypothetical protein
Ribosomal protein L18a	Putative polyketide synthase module
Proteinverbleib/ -lagerung - Proteolyse	Unknown protein
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, cyclophilin type	Sekundärmetabolismus
Struktur - Chloroplasten	Phenylpropanoide/ Phenole
RNA binding / nucleic acid binding	Anthocyanidin synthase
	Shikimatkinase
	Sonstige
	Beta-carotene hydroxylase

Ebenfalls eine Transkriptakkumulation am dritten Tag nach Ozonpeakexposition war in SOM 4 (Abbildung 27) zu sehen. Die ESTs der SOM4 (Tabelle 37) repräsentieren alle funktionellen Klassen. Auffällig war in der SOM4 die vermehrte Anzahl an ribosomalen Proteinen und elf ESTs aus dem Stressmetabolismus, der Klassen der Zellstruktur, der Signaltransduktion, der

Abwehr/Krankheit und des Sekundärstoffwechsels. Des Weiteren verliefen die Transkriptspiegel von neun ESTs des Primärmetabolismus und des Energiestoffwechsels nach der SOM4.

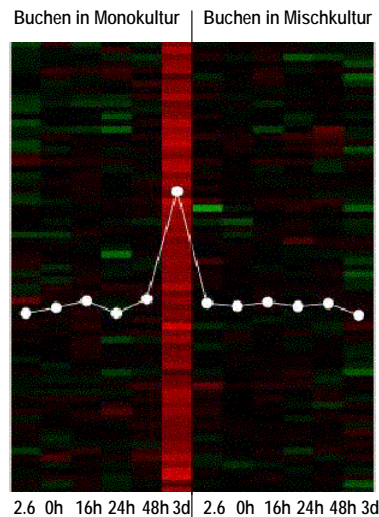


Abbildung 27: SOM4 von den Transkriptdaten der Ozon-behandelten Buchen in Mono- und Mischkultur mit Fichte zu verschiedenen Probenahmezeitpunkten (02.06.05 = 2x ambient Ozon, 0h= genau vor dem Ozonpeak von 200 ppb und 16h, 24h, 48h und 3d danach).

Tabelle 37: ESTs, die nach der SOM4 (Abbildung 27) verlaufen.

Primärmetabolismus	Proteinsynthese	Signaltransduktion - Kinase
Aminosäure	Ribosomales Protein	Wall-associated kinase
Phosphoribosylanthranilate isomerase	60S ribosomal protein (rib 60S)	Abwehr/ Krankheit
Zucker und Polysaccharide	60S ribosomal protein L19 mRNA	Abwehrverwandt
GDP-4-keto-6-deoxy-D-mannose-3	60S ribosomal protein L37 (RPL37C)	14-3-3 related protein SGF14A
Phosphoglyceromutase	Acidic ribosomal protein, putative	Stressantwort
Energie	Ribosomal L27	DNAJ heat shock protein
Glycolyse	Ribosomale RNA	Heavy-metal-associated domain-containing protein/ copper chaperone-rela
Triosephosphate isomerase	26 rRNA a	Protein phosphatase-2-C
Gluconeogenese	Proteinverbleib /-lagerung	Sonstige
Glutaredoxin I	Proteolyse	Aspartic protease
Zitronensäurezyklus	SKP1/ASK1-like protein (skp1)	Zeaxanthin epoxidase
Glyoxysomal malate dehydrogenase	Repressor	Unklare Einteilung
Elektronentransport	Isochorismatase hydrolase family protein	Beta-galactosidase = ?-Galactosidase = Lactase b
Gamma subunit of ATP synthase	Transporter	Expressed protein
NADP-dependent malic protein-like mRNA (a)	Ion	Putative protein
Photosynthese	Putative organic cation transport protein	Unknown protein
Carbonic anhydrase b	ABC-Typ	Sekundärmetabolismus
Zellwachstum/ -teilung - DNA-Synthese/ -replikation	BAT1 homolog mRNA	Phenylpropanoide/ Phenole
Putative transposase	Zellstruktur	Cinnamyl alcohol dehydrogenase
Transkription	Zellwand, Stressantwort	Sonstige
mRNA-Synthese	Seven transmembrane protein Mlo5	(-)-isopiperitenone reductase
Light inducible tissue-specific ST-LS1 gene a	Zytoskelett	Isoflavone reductase
Ultraviolet-B-repressible protein	Alpha-tubulin	
Spezifische Transkriptionsfaktoren	Chloroplast	
Zinc finger Protein T2-6	Red chlorophyll catabolite reductase	
	RNP1 chloroplast RNA binding protein	

Auch die ESTs der SOM5 (Abbildung 28) zeigten nur geringe Schwankungen des Transkriptspiegels zu den verschiedenen Probenahmezeitpunkten der Buchen in beiden Kulturen.

Wiederum waren nur ESTs in der Reinkultur nach drei Tagen induziert. Ein leichter Anstieg der Transkriptspiegel war in den Buchen der Monokultur vom 02.06.05 bis 16 Stunden nach dem Ozonpeak und anschließend ein leichter Rückgang der Transkriptspiegel bis 48 Stunden zu erkennen. Die SOM5 beinhaltete vor allem ESTs, die auf Stress reagierten, wie verschiedene ESTs der Zellstruktur (Zellwand/Stressantwort), zwei Kinasen und sechs ESTs der Abwehr/ Krankheit, darüber hinaus auch ESTs des Energiestoffwechsels (Tabelle 38).

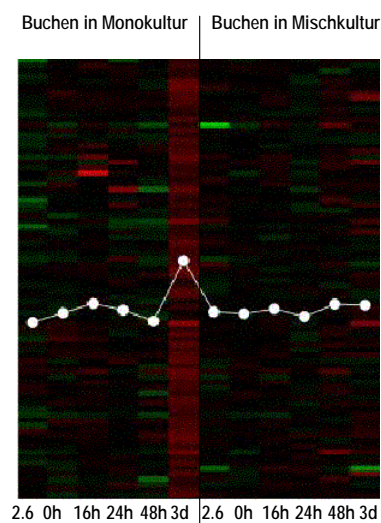


Abbildung 28: SOM5 von den Transkriptdaten der Ozon-behandelten Buchen in Mono- und Mischkultur mit Fichte zu verschiedenen Probenahmezeitpunkten (02.06.05 = 2x ambient Ozon, 0h= genau vor dem Ozonpeak von 200 ppb und 16h, 24h, 48h und 3d danach).

Tabelle 38: ESTs, die nach der SOM5 (Abbildung 28) verlaufen.

Primärmetabolismus	Proteinsynthese	Signaltransduktion - Kinasen
Aminosäure	Ribosomales Protein	CBL-interacting protein kinase 6
Polyglutamine binding protein variant 4 (PQBP1 gene)	S6 ribosomal protein (rps6 gene)	Protein kinase
Kofaktor	Ribosomale RNA	Abwehr/ Krankheit
Thiazole biosynthetic enzyme a	5S ribosomal RNA Length	Stressantwort
Energie	Proteinverbleib/ -lagerung	Abscisic stress ripening protein homolog
Elektronentransport	Faltung und Stabilität	Cold acclimation responsive protein BudCAR5
33kDa polypeptide of the water-oxidizing complex of PS II	Peptidylprolyl isomerase =cyclophilin	Cysteine protease
Ferredoxin-binding subunit (psi-d1)	Proteolyse	Cysteine proteinase
Plasma membrane H ⁺ -ATPase;	P-protein of glycine decarboxylase enzyme	DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein
Vacuolar proton ATPase proteolipid subunit	Transporter - ABC-Typ	Heat shock protein 70 precursor
Photosynthese	ABC transporter family protein	Entgiftung
Aldolase gene	Zellstruktur	Katalase b: PPE132444: catalase 1
Fructose-bisphosphate aldolase	Zellwand/ Stressantwort	Lipoxygenase
Fructose-bisphosphate aldolase	Hydroxyproline-rich glycoprotein family protein	Unklare Einteilung
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH2)	Putative membrane protein (poni1 gene)	Aldehyde dehydrogenase 1 precursor
Rubisco activase precursor b	Zytoskelett	Expressed protein
Zellwachstum/ -teilung - Wachstumsregulator	Actin	Expressed protein
Nine-cis-epoxycarotenoid dioxygenase4	Chloroplast	Hypothetical protein 3
Transkription - Spezifischer Transkriptionsfaktor	NifU-like protein	Unknown
DNA-binding family protein	Photosystem I reaction center subunit XI	Unknown protein
ZIP	chloroplast precursor	Sekundärmetabolismus - Phenylpropanoide/ Phenole
		Benzoyl coenzyme A: benzyl alcohol benzoyl transferase

Die SOM9 zeigt eine Reduktion von Transkripten am dritten Tag in den Buchen der Reinkultur, zu den anderen Zeitpunkten und in den Buchen der Mischkultur schwankten sie leicht (Abbildung 29). Nur eine kleine Anzahl an ESTs war davon betroffen und diese repräsentierten hauptsächlich ESTs der Chloroplastenstruktur beziehungsweise der Photosynthese (Tabelle 39).

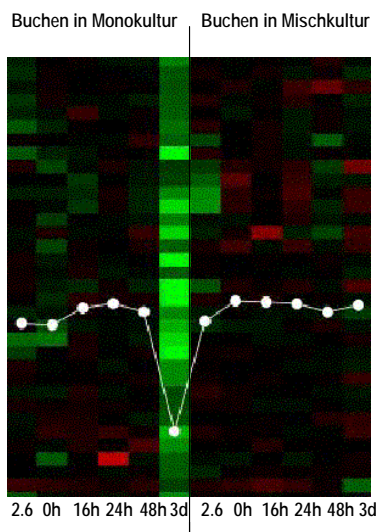


Abbildung 29: SOM9 von den Transkriptdaten der Ozon-behandelten Buchen in Mono- und Mischkultur mit Fichte zu verschiedenen Probennahmezeitpunkten (02.06.05 = 2x ambient Ozon, 0h= genau vor dem Ozonpeak von 200 ppb und 16h, 24h, 48h und 3d danach).

Tabelle 39: ESTs die nach der SOM9 verlaufen.

Primärmetabolismus
Glucosyltransferase-12
Energie - TCA-Zyklus
Malate dehydrogenase
Zellwachstum/-teilung - DNA-Synthese/-replikation
Nucleosome assembly protein 1
Transkription - mRNA processing ?
DEAD/DEAH box helicase
Transporter - ABC-Typ
BAT 1
BAT 1
Zellstruktur
Zellwand/ Stressantwort
Putative membrane protein
Chloroplasten
Chlorophyll a/b-binding protein
Dare PS II type I chlorophyll a/b-binding protein (lhcb1*7) a
PS I reaction center protein subunit II
Thylakoid lumen 15.0 kDa protein
Signaltransduktion - Kinasen
Protein kinase
Abwehr/ Krankheit - Stressantwort
Al-induced protein

3.4.3 Hierarchisches Cluster

Der Stammbaum des hierarchischen Clusters (Abbildung 30) zeigte verwandte Reaktionen zwischen den Buchen der Mischkultur auf Transkriptebene 24 und 48 Stunden nach dem Ozonpeak. Die Buchen der Reinkultur genau vor dem Ozonpeak und die Buchen der Mischkultur eine Woche vor dem Ozonpeak wiesen ein ähnliches Transkriptspiegelmuster auf. Zudem waren die mRNA-Konzentration der Buchen in der Reinkultur vom 02.06.05 sowie 24 und 48 Stunden nach

dem Ozonpeak nah verwandt. Gleichartige mRNA-Gehaltsmuster waren auch in den Buchen der Mischkultur nach 0 und 16 Stunden zu sehen.

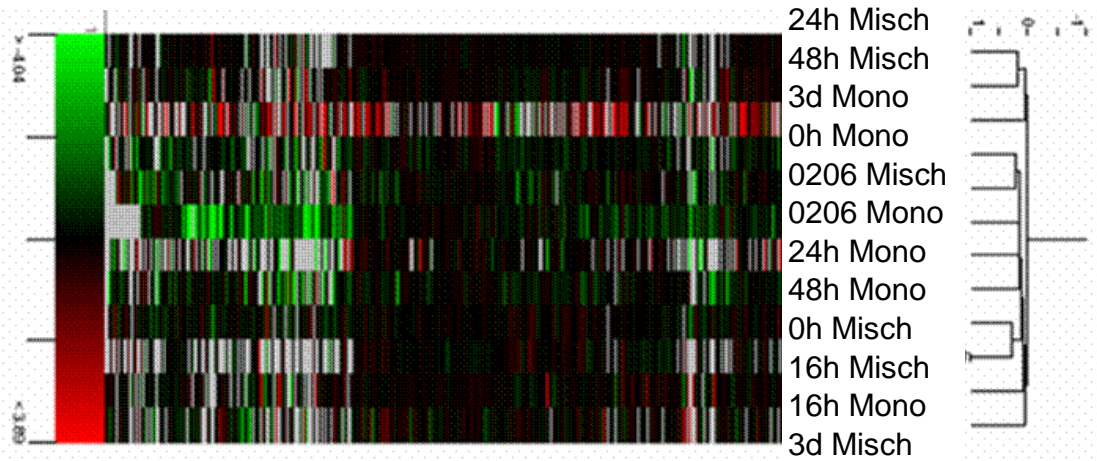


Abbildung 30: Hierarchisches Cluster Transkriptdaten der Ozon-behandelten Buchen in Mono- und Mischkultur mit Fichte zu verschiedenen Probennahmezeitpunkten (02.06.05 eine Woche vor dem Ozonpeak, 0h= genau vor Exposition des Ozonpeaks von 200 ppb und 16h, 24h, 48h und 3d nach Ozonpeak).

3.4.4 Maschinelles Lernen - Support Vektormaschinen (SVM)

Die Abbildung 31 zeigt eine Aufreihung der Transkriptspiegel innerhalb der einzelnen funktionellen Klassen. Exemplarisch sind die Zeitpunkte unmittelbar vor und drei Tag nach dem Ozonpeak dargestellt.

Unmittelbar vor dem Ozonpeak zum Zeitpunkt 0 Stunden, wurde kein deutlicher Unterschied in den Transkriptspiegeln zwischen den Buchen in Misch- und Monokultur gesehen. Nach drei Tagen allerdings wurde eine gute Trennung der Transkriptspiegel in den funktionellen Klassen zwischen Mono- (blau) und Mischkultur (grün) erreicht (Abbildung 31). So wiesen die Buchen der Mischkultur Transkriptspiegel kleiner als 1 und die Buchen der Reinkultur \log_2 Ratios größer als 1 auf.

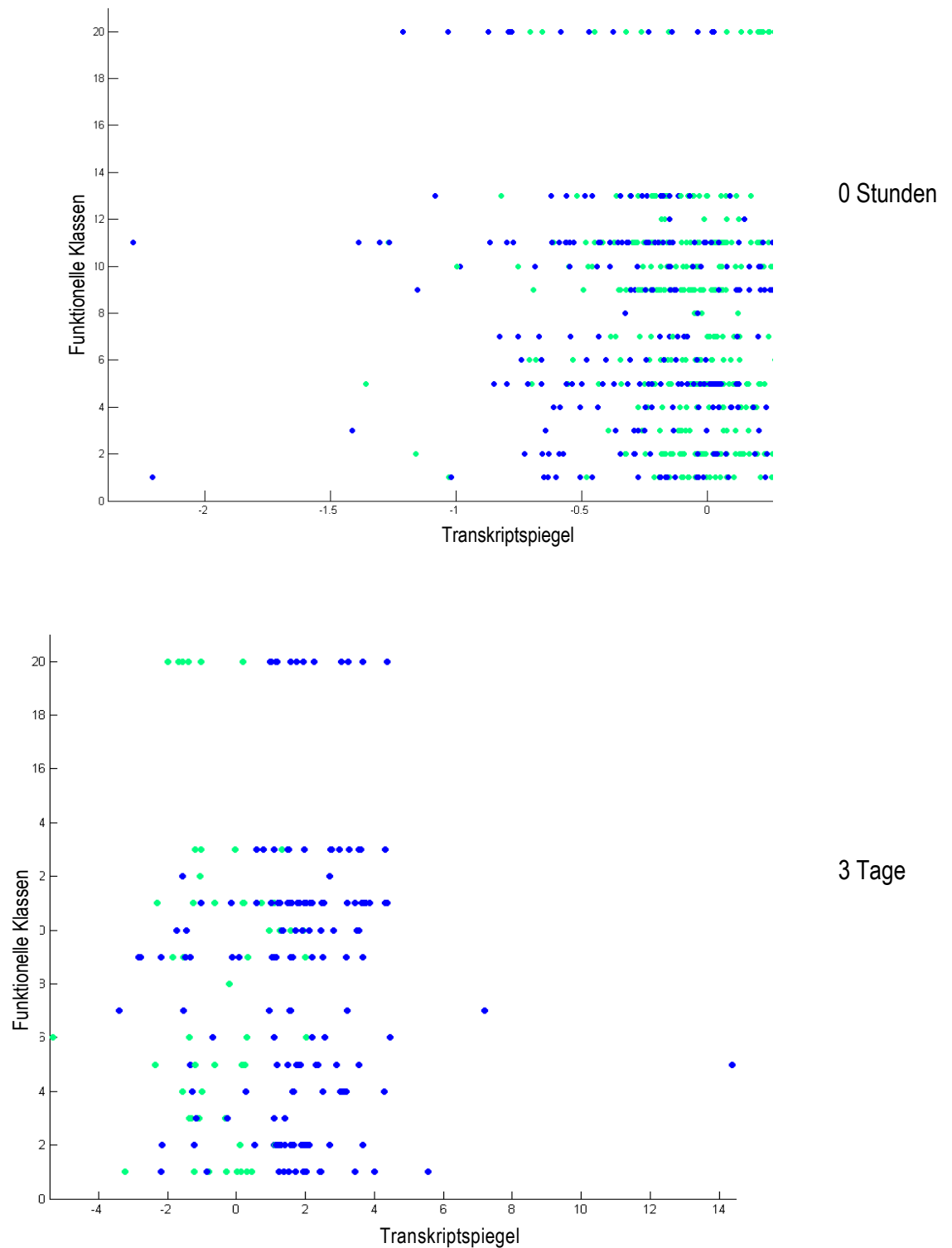


Abbildung 31: Transkriptdaten unmittelbar vor (0 Stunden) und drei Tage nach dem Ozonpeak der Buchen in Mono- (blau) und Mischkultur (grün). Die funktionellen Klassen sind an der y-Achse aufgetragen, die Transkriptspiegel ($\log_2\text{Ratio}$) ohne nur nullnahe Werte auf der x-Achse.

3.4.5 MapMan

In der durch MapMan (<http://gabi.rzpd.de/projects/MapMan/>) generierten Darstellung ließ sich gut erkennen, dass die einzelnen Stoffwechselklassen drei Tage nach dem Ozonpeak in den Buchen der Monokultur (Abbildung 32) induziert waren, während bei den Buchen in Konkurrenz mit Fichte, sie reprimiert beziehungsweise unbeeinflusst waren.

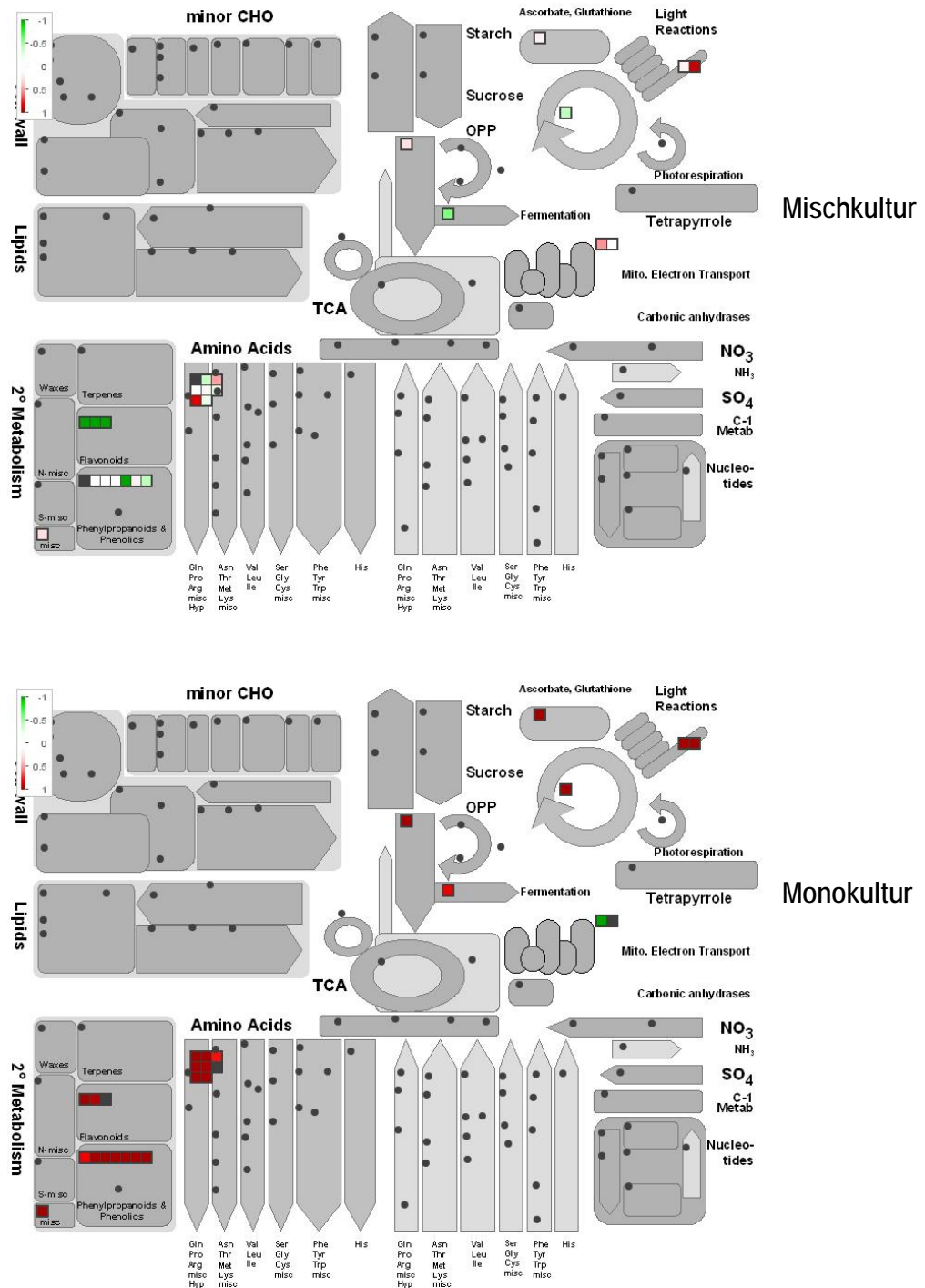


Abbildung 32: Darstellung der induzierten (rot) und reprimierten (grün) ESTs der Buchen in Misch- und Monokultur drei Tage nach Exposition von 200 ppb Ozon innerhalb der einzelnen Stoffwechselwege.

3.5 Gewächshausversuch – Einfluss von Ozon und CO₂

Die fünfjährigen Buchen standen für drei Vegetationsperioden im Gewächshaus, jeweils unter ambienten, 2x ambientem CO₂- und 2x ambientem Ozonniveau. Um den Einfluss der verschiedenen CO₂- und Ozonkonzentrationen auf die Buchen zu erfassen, wurden jeweils die Buchen (ambient) mit den Buchen, die unter 2x ambienten CO₂- und 2x ambienten Ozonbedingungen standen, verglichen.

3.5.1 Bestimmung des Transkriptspiegels mittels Microarray

Mit Hilfe von Acuity wurden aus 23/24 Slides jeweils die Mediane gebildet und ein Korrelationskoeffizient bestimmt. Dunkel wurden jeweils die Mediane markiert, die einen Korrelationskoeffizienten unter 50 besaßen und hell diejenigen, deren log₂Ratio sich aus mindestens aus 15 bis 23/24 Werten zusammensetzte.

Tabelle 40: Veränderung des Transkriptspiegel (log₂Ratio) durch 2x ambientes CO₂ und 2x ambientes Ozon von fünfjährigen Gewächshausbuchen (rot = induziert, CV<50; dunkelgrün = reprimiert, CV<50; orange = induziert, n=15-24).

Name	2x CO ₂	2x O ₃
Energie		
Elektronentransport		
Plastoquinol-plastocyanin reductase = cytochrome b6f	-4.21	1.22
Photosynthese		
Aldolase gene	-0.36	-1.46
Nuclear-encoded chloroplast ribulose-5-phosphate 3-epimerase	2.01	1.39
Proteinsynthese - ribosomale RNA		
18S ribosomal RNA	1.85	1.95
Partial 16S rRNA	-1.77	2.17
Partial 16S rRNA	1.67	1.72
Proteinverbleib- und -lagerung - Proteolyse		
Amino Acid Permease	-4.40	-0.25
Transporter		
Ionen		
Nitrate Chlorate Transporter	-4.27	1.89
ABC-Typ		
BAT1	1.78	1.62
BAT1 homolog mRNA b	-0.70	4.86
Signaltransduktion		
Kinase		
Wound-induced protein kinase	-0.85	2.16
Sonstige		
ACC oxidase 1 e	0.45	1.23
ACC oxidase b	0.01	1.06
Ethylene resistant	0.19	1.36
Sekundärmetabolismus		
Phenylpropanoide/ Phenole		
Chalconsynthase	0.57	1.62
Cinnamic acid 4-hydroxylase	0.26	1.30
Sonstige		
Isoflavone reductase	-0.80	3.36

Am 29.05.06 waren durch die erhöhte CO₂-Atmosphäre in den Gewächshausbuchen vier ESTs reprimiert und vier induziert (Tabelle 40). Die Plastoquinol-Plastocyaninreduktase, eine partielle 16S ribosomale RNA, der Nitratchlorattransporter und ein Transporter des ABC-Typs (Aminosäurepermease) waren reprimiert. Darüber hinaus zeigte die Kern-kodierte Chloroplastenribulose-5-Phosphat 3-Epimerase (Photosynthese), die 18S und 16S ribosomale RNA und ein Transporter des ABC-Typs (BAT1) einen erhöhten Transkriptspiegel.

Durch die Ozonbehandlung zeigte nur die Aldolase einen verminderten mRNA-Spiegel. Erhöhte Transkriptspiegel wiesen, wie in der erhöhten CO₂-Atmosphäre, die Kern-kodierte Chloroplastenribulose-5-Phosphat 3-Epimerase, die 18S und 16S ribosomale RNA und ein Transporter des ABC-Typs (BAT1) auf. Ebenfalls wurden durch Ozon folgende ESTs der Signaltransduktion, wie die Wund-induzierte Proteinkinase, das Ethylen-resistente Protein, die ACC-Oxidase 1e und b und des Sekundärmetabolismus, wie die Chalkonsynthase, die Zimtsäure-4-Hydroxylase und die Isoflavonreduktase, induziert.

Von den unbekanntesten ESTs waren unter 2x ambientem CO₂ wiederum vier induziert und vier reprimiert. Durch 2x ambientes Ozon waren neun ESTs induziert und eine reprimiert.

3.5.2 Verifizierung der Transkriptspiegel mittels qRT-PCR

Die Verifizierung der Microarray-Transkriptdaten wurde in der erhöhten CO₂-Atmosphäre für die 18S ribosomale RNA weitestgehend bestätigt, der mRNA-Gehalt an Kern-kodierter Chloroplastenribulose-5-Phosphat 3-Epimerase hingegen nicht.

Die Ozon-erhöhten Transkriptspiegel der 18S ribosomalen RNA und der Chloroplastenribulose-5-Phosphat 3-Epimerase wurden bestätigt. Bei letzterer war der Unterschied zwischen Kontrolle und Behandlung signifikant. Die durch den Microarray bestimmten mRNA-Gehalte an Ethylen-resistentem Protein und der Chalkonsynthase blieben durch die qRT-PCR unbestätigt.

Tabelle 41: Vergleich der Transkriptspiegel (log₂Ratio) von Microarray und qRT-PCR (dunkelgelb markierte Werte = signifikante Unterschiede zwischen Behandlung und Kontrolle; p<0,05; Microarray: orange = induziert)

Gen	2xCO ₂ n=32; MA n=23			2xOzon n=30; MA n=24		
	qRT Mittelwert	Median	Micro- array	qRT Mittelwert	Median	Micro- array
18S	0.92	0.64	1.85	0.44	0.19	1.95
Nuclear-encoded chloroplast ribulose-5-phosphate 3-epimerase	-0.20	0.05	2.01	0.83	0.46	1.39
Ethylene resistant				-0.46	-0.33	1.36
Chalkonsynthase				-0.30	0.00	1.62

3.6 Gewächshausversuch – Einfluss von *Apiognomonina errabunda*

Die Gewächshausbuchen, die unter ambienten, 2x ambienten Ozon- und 2x ambienten CO₂-Bedingungen standen, wurden am 29.05.06 mit *A. errabunda* infiziert. Die Reaktionen der Buchen wurden durch Bestimmung der Transkripte, Inhaltsstoffe und Chlorophyllfluoreszenz beobachtet. Weiterhin wurde die genomische Pilz-DNA in den Buchenblättern bestimmt.

3.6.1 Bestimmung der genomischen DNA mittels qPCR

Die Konzentration an genomischer *A. errabunda*-DNA erreichte für den letzten Probennahme-termin (19.06.06; t=5) Werte zwischen 0,069 und 0,080 pg DNA/mg Frischgewicht (Abbildung 33). Tendenzielle Unterschiede waren in den Buchen der verschiedenen Behandlungen zu sehen. Die Buchen unter 2x ambientem Ozon enthielten die höchsten Gehalte an genomischer Pilz-DNA, die Buchen unter ambienten Bedingungen die niedrigsten.

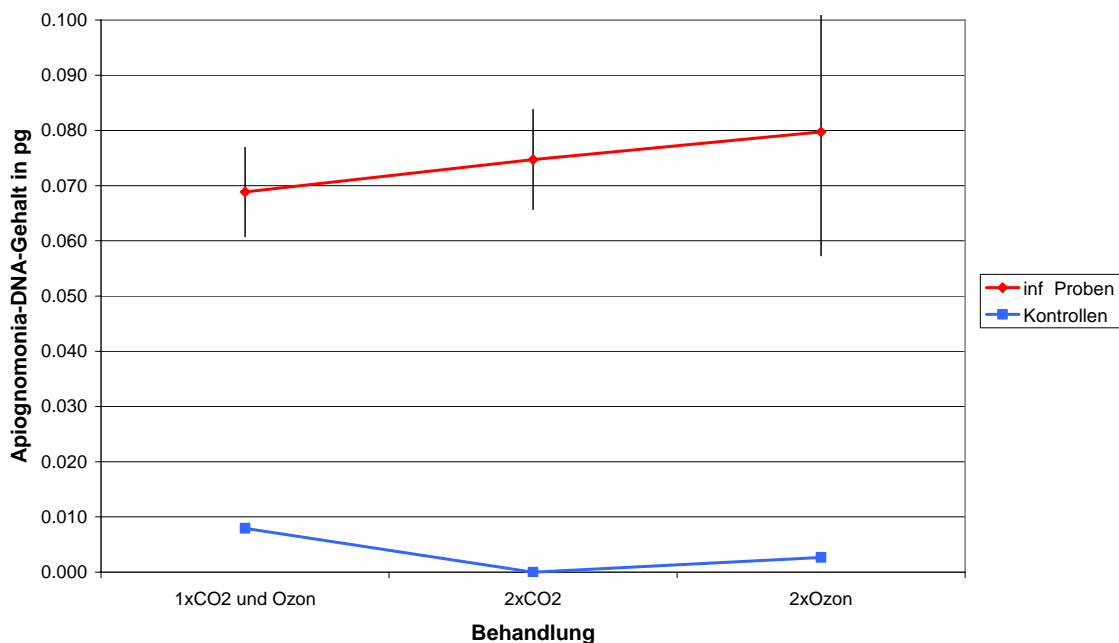


Abbildung 33: Gehalt an genomischer *A. errabunda*-DNA 21 Tage nach der *A. errabunda*-Infektion der fünfjährigen Gewächshausbuchen, die unter verschiedenen Bedingungen (ambient, 2x ambient CO₂- und 2x ambient Ozon) standen.

3.6.2 Bestimmung des Transkriptspiegel mittels Microarray

In der erhöhten CO₂-Atmosphäre waren die Transkriptspiegel der Wand-assoziierten Kinase und der ACC Oxidase 1c (Signaltransduktion) durch die *Apiognomonina*-Infektion reduziert (Tabelle 42). Darüber hinaus war die Shikimatsynthese induziert.

Die Buchen unter ambienten Bedingungen zeigten einen erhöhten mRNA-Spiegel einer 18S ribosomalen RNA und eine verminderte mRNA-Menge eines Chlorophyll a/b-bindenden Proteins durch die Pilzinfektion.

Im 2x ambienten Ozon war ein Auxin-regulierendes Protein und die Glutathion S-Transferase reprimiert. Induziert war die 18S ribosomale RNA, die β -Glucanase und ein unbekanntes Protein.

Tabelle 42: Veränderung des Transkriptspiegel (\log_2 Ratio) von fünfjährigen Gewächshausbuchen, unter ambienten Bedingungen (n=20), 2x ambienten CO₂- (n=18) und 2x ambienten Ozon-Bedingungen (n=16), 21 Tage nach der Infektion mit *A. errabunda* (hellgrün = reprimiert, n=12-20; orange = induziert, n=12-20).

Name	2xCO ₂	Kontrolle	2x Ozon
Zellwachstum - Wachstumsregulator			
Auxin-regulated protein gene	-0.71	-0.28	-2.59
Proteinsynthese - ribosomale RNA			
18S ribosomal RNA	-0.22	1.69	2.30
Zellstruktur - Chloroplast			
Chlorophyll a/b-binding protein	-0.48	-1.02	0.01
Signaltransduktion			
Sonstige			
ACC oxidase 1 c Kinase	-1.08	0.19	-0.44
Wall-associated kinase	-1.12	-0.58	-0.77
Abwehr/ Disease			
Abwehr verwandt			
Beta Glucanase	0.15	-0.21	1.06
Entgiftung			
Glutathione S-transferase	-0.31	0.15	-1.15
Unklassifiziert			
Unknown protein	0.17	0.37	1.27
Sekundärmetabolismus			
Shikimatkinase	3.51	0.01	0.71

Weiterhin waren durch die Pilzinfektion eine unbekannte EST im erhöhten CO₂-Niveau und drei im erhöhten Ozonmilieu induziert. Je eine unbekannte EST war im ambienten sowie im erhöhten Ozonniveau reprimiert.

3.6.3 Verifizierung mittels qRT-PCR

Die mit Hilfe des Microarray ermittelten mRNA-Spiegel konnten mittels qRT-PCR nicht nachvollzogen werden (Tabelle 43). So war keine der drei ESTs (Glutathion S-Transferase, ACC Oxidase c, Chlorophyll a/b-bindendes Protein) in der qRT-PCR signifikant verändert.

Tabelle 43: Vergleich der Transkriptspiegel (\log_2 Ratio) von Microarray- und qRT-PCR-Daten, der fünfjährigen Gewächshausbuchen, unter ambienten Bedingungen (n=20), 2x ambienten CO₂- (n=18) und 2x ambienten Ozon-Bedingungen (n=16), 21 Tage nach der Infektion mit *A. errabunda* (Microarray: hellgrün = reprimiert, n=12-20; orange = induziert, n=12-20; qRT-PCR: gelb = unverändert, nicht signifikant).

Gen	2xCO ₂ n=18			Kontrolle n=20			2xOzon n=16		
	qRT Mittelwert	Median	Micro- array	qRT Mittelwert	Median	Micro- array	qRT Mittelwert	Median	Micro- array
18S				-0,26	-0,43		0,12	0,11	2,30
Glutathion-S-Transferase							-0,02	0,07	-1,15
ACC Oxidase c	0,14	0,09	-1,08						
Chlorophyll a/b-binding protein				-0,27	-0,20	-1,02			

3.6.4 Inhaltsstoffanalysen

Für die Buchen des Gewächshausversuches wurden die löslichen und Zellwand-gebundenen Inhaltsstoffe bestimmt.

3.6.4.1 Lösliche Inhaltsstoffe

Die Gesamtflavonoide, Gesamtflavonole, Hydroxyzimtsäure- und Kämpferolderivate zeigten höchst signifikante Veränderungen ihrer Gehalte zwischen den beiden Probennahmeterminen (Anhang, Tabelle 54). Für die statistische Auswertung fanden jeweils drei Kontrollbäume und ein Ozon-behandelter Baum keine Berücksichtigung, da ihre Werte sich genau gegenläufig zu den anderen Messdaten verhielten und sie somit als Ausreißer deklariert wurden. Außer den acylierten Flavonolglycosiden, den Quercetinderivaten und den Gesamtflavonolen wurden die restlichen Inhaltsstoffe zur statistischen Auswertung logarithmisch transformiert, um das Kriterium der Normalverteilung zu erfüllen. Die zusammenfassende Statistik ist im Anhang (Tabelle 54) dargestellt.

Der prozentuale Anteil an Hydroxyzimtsäure- und Kämpferolderivaten sank innerhalb des dreiwöchigen Versuchszeitraumes in allen Varianten signifikant (Abbildung 34). Die signifikant höchsten Gehalte an Hydroxyzimtsäurederivaten von 1,2% und an Kämpferolderivaten erreichten die Buchen unter 2x ambient CO₂. Die signifikant niedrigsten Gehalte an Hydroxyzimtsäure- und Kämpferolderivaten besaßen die Kontrollbuchen (Abbildung 34).

Die CO₂- und Ozon-Exposition zeigte einen signifikanten Einfluss auf den Quercetinderivatgehalt der Bäume ($p=0.0057$). Die Ozon-behandelten Buchen verfügten über den höchsten prozentualen Quercetinderivatgehalt am Frischgewicht, gefolgt von den CO₂-behandelten Bäumen. Über den Zeitverlauf war keine Veränderung der Konzentrationen in allen Versuchsvarianten zu sehen.

Den höchsten Gehalt an acylierten Flavonolglycosiden, mit 1% vom Frischgewicht, zeigten die Ozon-behandelten Buchen. Über den Versuchszeitraum fielen die acylierten Flavonolglycoside in den Kontrollbuchen und Ozon-gestressten Buchen ab, die Buchen (2x ambientem CO₂) hingegen wiesen zu beiden Zeitpunkten ähnliche Konzentrationen auf.

Der Gehalt an Flavan/Flavanon war zum Zeitpunkt t=0 in den Buchen der 2x ambienten CO₂-Atmosphäre am höchsten und sank bis zum 19.06.06 etwas. Die Flavan-/Flavanongehalte in den Kontrollbuchen und in den Ozon-behandelten Buchen stiegen vom ersten bis zum 5. Proben-nahmetermin. Außerdem hatte die Exposition mit CO₂ und Ozon einen signifikanten Einfluss auf den Gehalt an Flavan/Flavanon ($p=0.0107$).

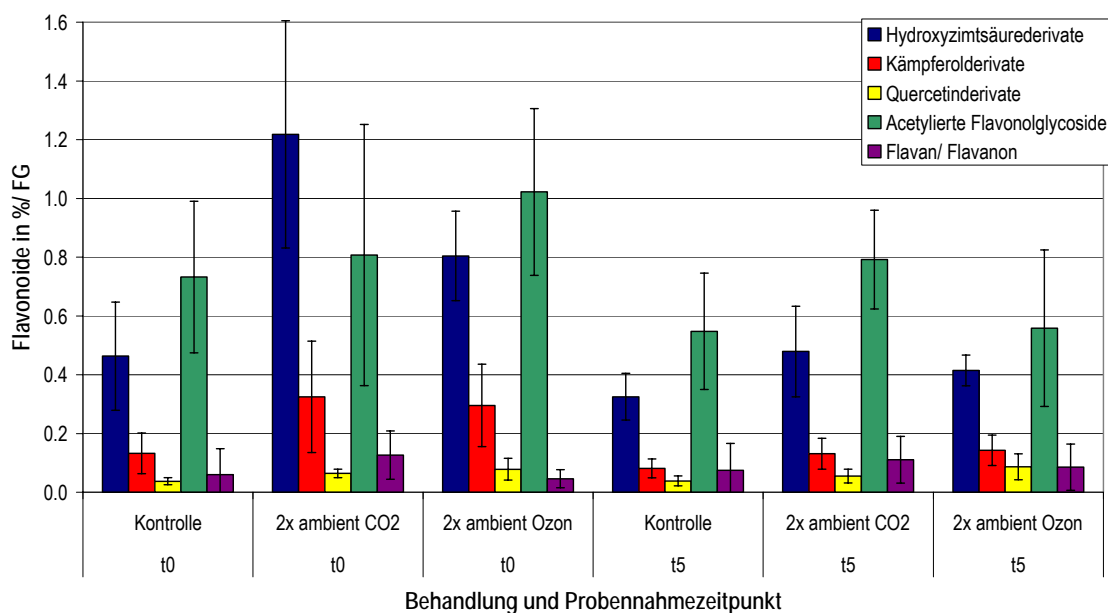


Abbildung 34: Gehalt an Flavonoiden in % vom Frischgewicht der Gewächshausbuchen (Ozon: Bäume 2 bis 8; CO₂: Bäume 1, 3, 4, 6 bis 9, 11, 12; Kontrollbäume: 1 bis 3, 6, 8 bis 10) am 29.05.06 (t=0) und 19.06.06 (t=5) unter ambienten, 2x ambient Ozon- und 2x ambient CO₂-Bedingungen.

Die Buchen verfügten über unterschiedliche Ausgangsgehalte an phenolischen Inhaltsstoffen. So war die Konzentration an Hydroxyzimtsäure am 29.05.06 im Gegensatz zu den Werten der oben beschriebenen Buchen in den Kontrollbuchen am höchsten mit etwa 1%, gefolgt von den Buchen unter 2x ambientem Ozon mit 0.9% und den 2x ambienten CO₂-Buchen mit 0.8% (Abbildung 35). Die prozentualen Hydroxyzimtsäuregehalte vom Frischgewicht sanken wiederum innerhalb von drei Wochen. Die Hydroxyzimtsäuren zeigten eine Korrelation zwischen Behandlung und Infektion ($p=0,0004$), wobei die Gehalte der nicht infizierten Buchen unter CO₂- und Ozon-Erhöhung über den Zeitverlauf abnahmen, in den Kontrollbuchen nahmen sie hingegen zu.

Der prozentuale Anteil an Kämpferolderivaten und an acylierten Flavonolglycoside am Frischgewicht war in den Kontrollbuchen am geringsten und stieg vom 2x ambienten CO₂-Milieu bis zum Ozonmilieu an. Über die drei Wochen fiel die Konzentration in allen drei Varianten ab, so dass zum Versuchende wiederum die Kontrollvariante die niedrigsten und die Ozonvariante die höchsten Gehalte aufwies, allerdings hatten die Ozon und CO₂-Varianten am Zeitpunkt t=5 ähnliche Gehalte an acylierten Flavonolglycosiden.

Keine deutlichen Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungen und den beiden Probennahmezeitpunkten wurden für die Quercetinderivate gesehen.

Der prozentuale Flavan-/Flavanongehalt war in den Kontrollbuchen am höchsten und in den Buchen unter erhöhten Ozonbedingungen am niedrigsten. Die Infektion mit *A. errabunda* zeigte einen signifikanten Einfluss auf die Flavan-/Flavanongehalte ($p=0.0276$). Signifikanten Einfluss auf den Gehalt an Flavan/Flavanon ($p=0.0081$) hatten die unterschiedlichen Standortbedingungen, zusammen mit der *A. errabunda* Infektion, wobei die Gehalte in den CO₂-behandelten Buchen ab und in der Kontrolle beziehungsweise in den Ozon-behandelten Buchen zunahmen.

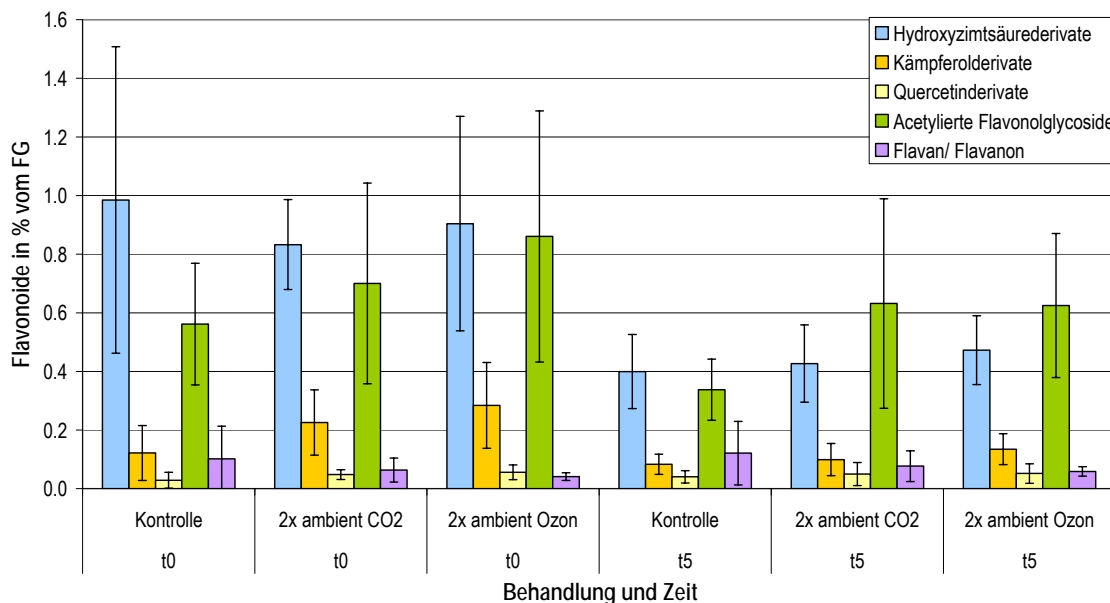


Abbildung 35: Gehalt an Flavonoiden in % vom Frischgewicht der Gewächshausbuchen (Ozon: Bäume 11, 13, 15, 17 bis 19, 21, 22; CO₂: Bäume 13, 14, 16, 17, 19, 21, 22, 24; Kontrollbäume: 12, 14, 16 bis 20) am 29.05.06 (t=0) vor und Gewächshausbuchen am 19.06.06 (t=5) nach der Infektion unter Kontroll-, 2x ambient Ozon- und 2x ambient CO₂-bedingungen.

Für die Gesamtflavonoide ergab sich wiederum ein signifikanter Einfluss des Probennahmezeitpunktes ($p=0.0024$) und der jeweiligen Behandlung ($p=0.017$). Sie sanken signifikant vom

Zeitpunkt t=0 zum Zeitpunkt t=5, zudem waren sie durch die Behandlungen mit CO₂ und Ozon signifikant erhöht. Weiterhin ließ sich eine Korrelation zwischen Behandlung und Infektion erkennen ($p=0.0490$)(Abbildung 36), wobei die *A. errabunda*-Infektion die Gehalte in der Ozon- und in der CO₂-Variante reduzierten, in den Kontrollbäumen blieben sie hingegen unverändert.

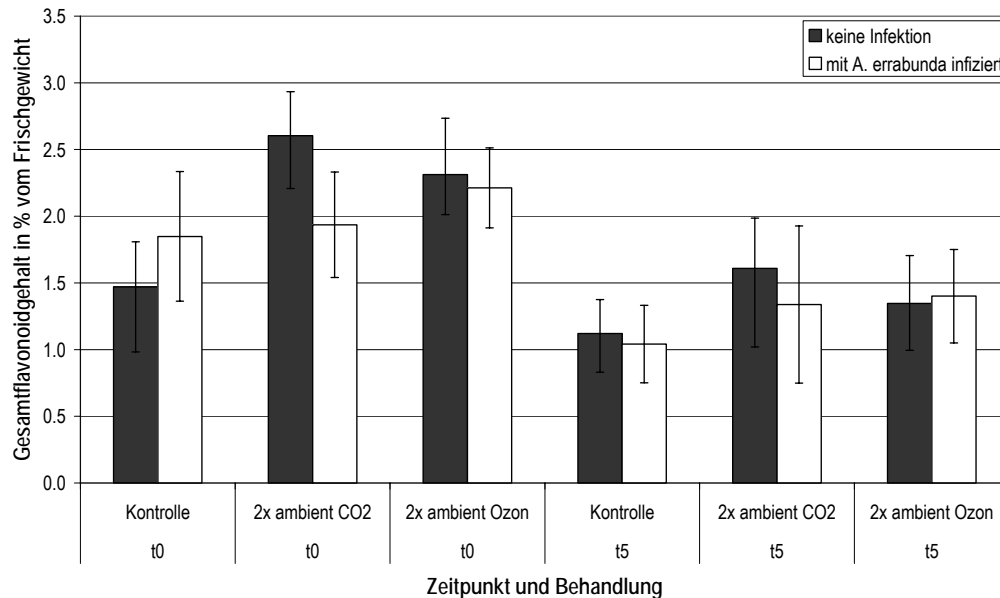


Abbildung 36: Gesamtflavonoide in % vom Frischgewicht der nicht infizierten Gewächshausbuchen (Ozon: Bäume 2 bis 8; CO₂: Bäume 1, 3, 4, 6 bis 9, 11, 12; Kontrollbäume: 1 bis 3, 6, 8 bis 10) am 29.05.06 (t=0) und der infizierten Gewächshausbuchen (Ozon: Bäume 11, 13, 15, 17 bis 19, 21, 22; CO₂: Bäume 13, 14, 16, 17, 19, 21, 22, 24; Kontrollbäume: 12, 14, 16 bis 20) am 19.06.06 (t=5) unter Kontroll-, 2x ambient Ozon- und 2x ambient CO₂-Bedingungen.

3.6.4.2 Zellwand-gebundene Inhaltsstoffe

Der Gesamtgehalt an Zellwand-gebundenen Inhaltsstoffen, hier dargestellt als Flächeneinheit pro mg Frischgewicht, war zum Zeitpunkt t=0 in den uninfizierten Buchen unter ambienten Bedingungen etwas geringer als in den infizierten Buchen (Abbildung 37). In den beiden anderen Varianten besaßen die infizierten Buchen einen höheren Anteil an Zellwand-gebundenen Inhaltsstoffen. Zum Zeitpunkt t=0 traten in den Ozon-gestressten Buchen um 10 Flächeneinheiten höhere Gehalte an Zellwand-gebundenen Inhaltsstoffen auf im Vergleich zu den Buchen unter ambienten und 2x ambienten CO₂-Bedingungen.

Die Verhältnisse an Zellwand-gebundenen Inhaltsstoffen waren am 29.05.06 zum 19.06.06 nur in der Kontrollvariante deutlich unterschiedlich. Die Buchen unter 2x ambientem Ozon zeigten am 19.06.06 gegenüber den anderen Varianten einen etwas niedrigeren Gehalt an Zellwand-gebundenen Inhaltsstoffen.

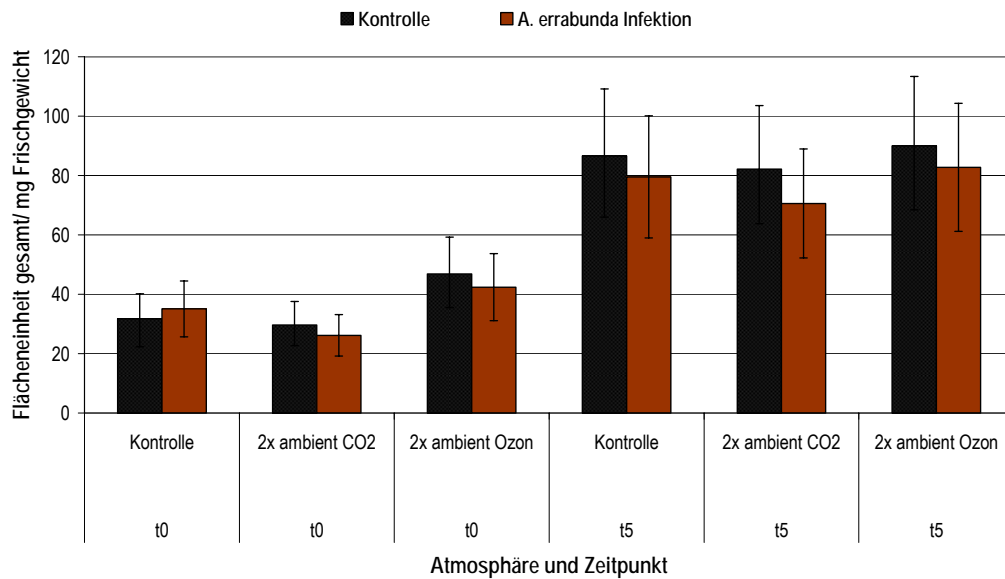


Abbildung 37: Flächeneinheiten der gesamten Zellwandhydrolysen pro mg Frischgewicht der nicht infizierten Gewächshausbuchen am 29.05.06 (t=0) und der infizierten Gewächshausbuchen am 19.06.06 (t=5) unter Kontroll-, 2x ambient Ozon- und 2x ambient CO₂-Bedingungen.

Von den insgesamt 14 gefundenen Stoffen der Zellwandhydrolyse zeigte nur die Substanz, deren Peak nach 33,5 Minuten zu sehen war, einen signifikanten Einfluss ($p=0.0015$) bezüglich der Behandlungen mit Ozon beziehungsweise CO₂ (Abbildung 38).

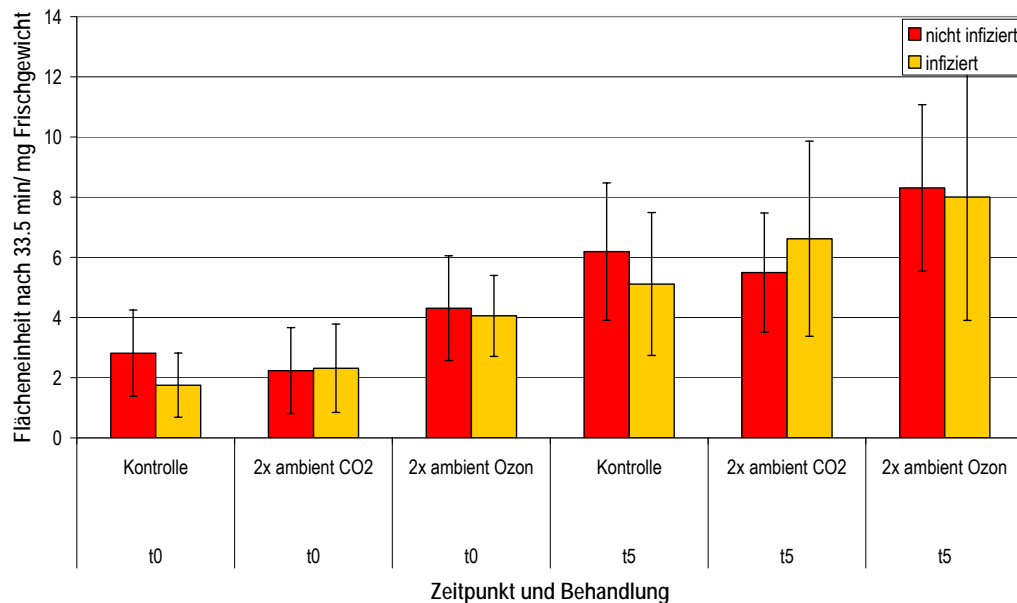


Abbildung 38: Flächeneinheiten der Zellwandhydrolysen nach 33,5 min pro mg Frischgewicht der nicht infizierten Gewächshausbuchen am 29.05.06 (t=0) und der infizierten Gewächshausbuchen am 19.06.06 (t=5) unter ambienten, 2x ambient Ozon- und 2x ambient CO₂-Bedingungen.

3.6.5 Chlorophyllfluoreszenz

Mit der Pulsamplitudenmodulation-Fluoreszenzmethode (PAM) wurde die maximale Quantenausbeute im Photosystem II, mittels eines MINI-PAMs bestimmt. Mit Hilfe des Imaging PAM Chlorophyll Fluorometers war ein visueller Vergleich von uninfizierten und *A. errabunda*-infizierten Buchen unter ambienten Bedingungen möglich.

Mit der MINI-PAM wurde die maximale Quantenausbeute punktuell an einem Blatt pro Baum gemessen. Pro Behandlung (infiziert/nicht infiziert) wurden jeweils neun Buchen unter 2x ambientem CO₂, acht unter 2x ambientem Ozon und 10 unter ambienten Bedingungen analysiert. Sechs Tage vor der Infektion am 23.05.06 lag die durchschnittliche maximale Quantenausbeute bei den Buchen aller Behandlungen bei 0,78 bis 0,79 (Abbildung 39), sie blieb durch die erhöhte Ozon- beziehungsweise CO₂-Konzentration unbeeinflusst.

Zwei Tage nach der *A. errabunda*-Infektion am 31.05.06 sank die durchschnittliche maximale Quantenausbeute um 0,01 im 2x ambienten CO₂-Milieu, um 0,02 im erhöhten Ozonmilieu mit *A. errabunda*-Infektion und im ambienten Milieu, um 0,03 im 2x ambienten Ozonmilieu. Den stärksten Rückgang mit 0,05 wurde an den infizierten Buchen, unter ambienten Bedingungen gemessen. Die einzelnen Behandlungen unterschieden sich nicht signifikant.

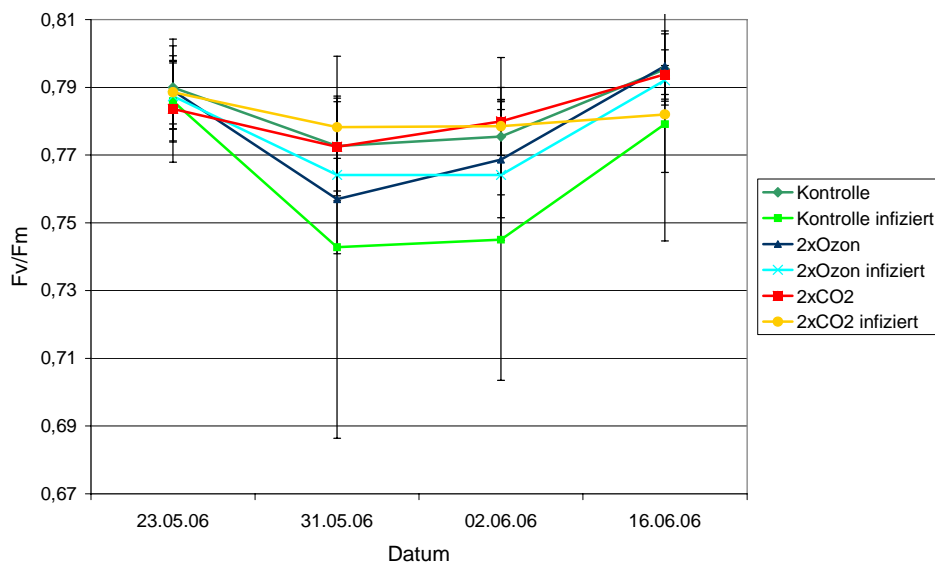


Abbildung 39: Maximale Quantenausbeute der nicht infizierten und infizierten (29.05.06 mit *A. errabunda*) Gewächshausbuchen, die unter normalen, 2x ambienten Ozon und 2x ambienten CO₂-Bedingungen standen (Messdaten: Thorsten Grams, TUM).

Keine signifikanten Unterschiede wurden beim Vergleich der infizierten und nicht infizierten Bäume in den Atmosphären mit 2x ambientem Ozon und CO₂ gefunden. Wohingegen die

Buchen in der ambienten Atmosphäre am 02.06.06 und 16.06.06 mit einer signifikant niedrigeren durchschnittlichen maximalen Quantenausbeute um 0,03 beziehungsweise 0,01 auf die *A. errabunda*-Infektion reagierten (Abbildung 40).

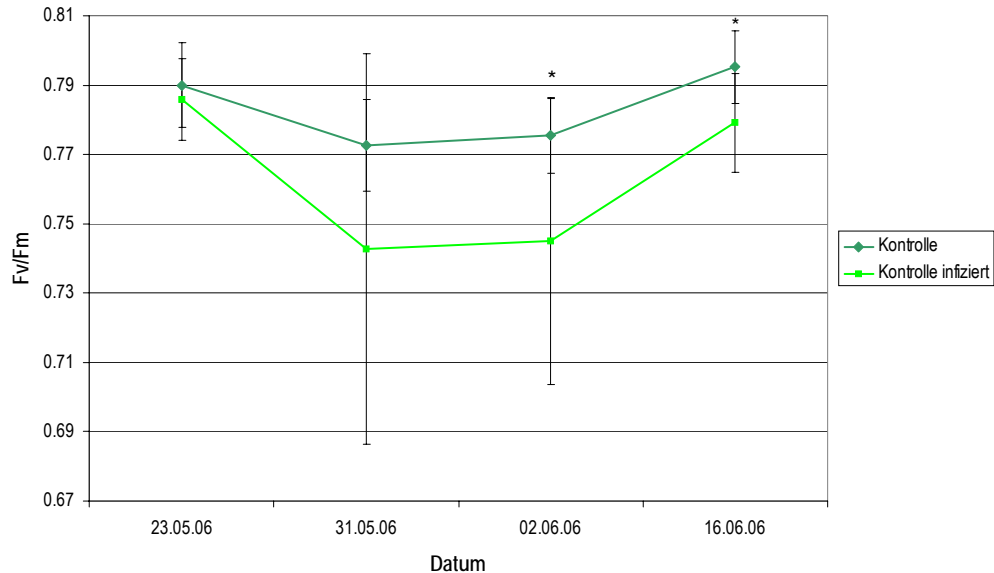


Abbildung 40: Maximale Quantenausbeute der Gewächshausbuchen, die unter normalen Bedingungen standen und am 29.05.06 mit *A. errabunda* infiziert wurden (*signifikant unterschiedliche Werte).

Von zwei Buchen, die im Gewächshaus unter ambienten Bedingungen standen, wurde eine Lichtsättigungskurve über den PAR-Bereich (400 bis 700 nm) mit dem PAM Chlorophyll Fluorometer durchgeführt. Die nicht infizierte Buche gab relativ gleichmäßig Fluoreszenz zurück (Abbildung 41 A). Die infizierte Buche wies zahlreiche Bereiche auf, die vermehrt Fluoreszenz abstrahlten (hellblaue bis grüne Bereiche Abbildung 41 B).

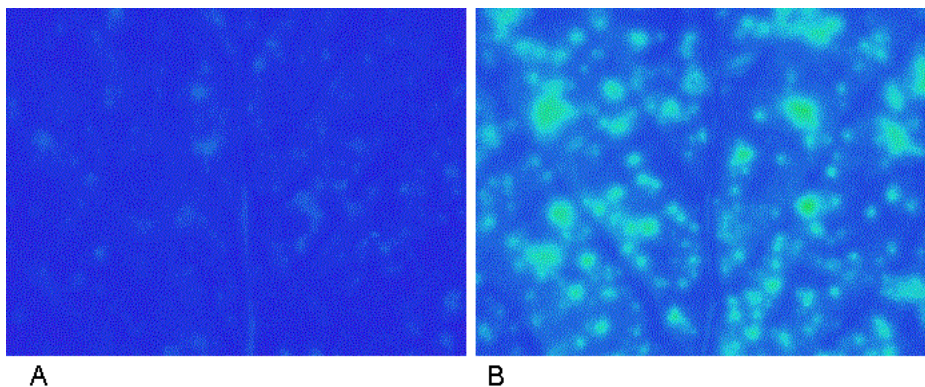


Abbildung 41: Bilder des Imaging PAM Chlorophyll Fluorometer einer nicht infizierten (A) und einer infizierten (B) fünfjährigen Buche, die unter normalen Bedingungen im Gewächshaus standen (Bilder: Thorsten Grams, TUM).

3.7 Lysimeterversuch – Ozoneinfluss

Im Jahr 2005 wurde der Einfluss chronischer Ozonexposition auf den Transkriptspiegel der Europäischen Buche unter kontrollierten Freilandbedingungen untersucht.

3.7.1 Transkriptspiegelbestimmung mittels Microarray

Dunkel markiert wurden jeweils die Mediane, die einen Korrelationskoeffizienten unter 50 besaßen und auf mindestens 15 Slides zu sehen waren. Die Mediane die sich aus mindestens aus 15 bis 20 \log_2 Ratios zusammensetzten wurden hell markiert.

Innerhalb des Primärmetabolismus waren an den Probennahmeterminen im Juli, September und Oktober ein Polyglutamin-bindendes Protein und die Glucosidhydrolase der Familie 1 durch die Ozonexposition induziert (Tabelle 44). Im September waren drei Kofaktoren und ein Protein der Alaninracematfamilie reprimiert.

Vor allem zum Ende der Vegetationsperiode reagierten verschiedene ESTs mit einer Reduktion ihres mRNA-Spiegels. Im September waren 10 ESTs und im Oktober noch vier ESTs der Photosynthese reprimiert. Außerdem wies die glyoxysomale Malatdehydrogenase (Zitronensäurezyklus) ein verringertes Transkriptniveau auf. Im Juli war eine Transkriptakkumulation der Kern-kodierten Chloroplastenribulose-5-Phosphat 3-Epimerase durch die Ozonbehandlung zu sehen.

In der funktionellen Gruppe Zellwachstum zeigte der Wachstumsfaktor 9-Cis-Epoxycarotenoid-dioxygenase 4 (Abscisinsäurebiosynthese) im September und Oktober eine Reduktion der Transkriptspiegel durch die chronische Ozonbehandlung.

In Hinblick auf die Transkription waren vier ESTs der mRNA-Synthese durch die Ozonexposition reprimiert, das UV-B-repressive Protein im Juli, September und Oktober, außerdem der Photolyase/Blaulichtphotorezeptor und ein Protein des Photosystems II im September.

Der Proteinstoffwechsel wies überwiegend erhöhte mRNA-Spiegel auf. So besaßen alle Probenahmezeitpunkte erhöhte Transkriptspiegel ribosomaler RNAs (Tabelle 44). Zum Ende der Vegetationsperiode im September/Okttober war die β -Glucosidase (Proteinfaltung und Protein-stabilität) induziert und nur im September ein S-Adenosylhomocystein der Proteolyse reprimiert.

Tabelle 44: Veränderte Transkriptspiegel (log₂Ratio) von ESTs des Primärmetabolismus, des Energiehaushaltes des Zellwachstums der Transkription und des Proteinstoffwechsels der sechsjährigen Ozonbehandelten Lysimeterbuchen (orange = induziert n=15-20; hellgrün = reprimiert, n=15-20; dunkelgrün = reprimiert, CV<50).

Genname	27.07.05	11.08.05	23.09.05	11.10.05
Primärmetabolismus				
Aminosäure				
Alanine racemase family protein	0.34	0.01	-1.02	-0.52
Polyglutamine binding protein variant 4	1.07	0.61	0.85	0.55
Polyglutamine binding protein variant 4	0.86	0.49	1.86	1.17
Zucker und Polysaccharide				
Glycoside hydrolase, family 1	1.29	0.12	2.03	2.04
Kofaktoren				
Putative reduced viability upon starvation protein 161	0.25	-0.10	-1.01	-0.72
Thiazole biosynthetic enzyme a	-0.22	-0.48	-1.93	-0.97
Thiazole biosynthetic enzyme b	-0.21	-0.31	-1.46	-0.96
Energie				
Zitronensäurezyklus				
Glyoxysomal malate dehydrogenase	0.14	-0.07	-1.54	-1.07
Photosynthese				
Carbonic anhydrase a	-0.23	-0.30	-1.48	-1.64
Chloroplast thioredoxin M-type	-0.08	-0.71	-1.30	-1.32
Fructose-bisphosphate aldolase	-0.11	-0.46	-2.21	-1.53
Fructose-bisphosphate aldolase	0.16	-0.40	-1.51	-1.01
Glycolate oxidase	-0.07	-0.23	-1.04	-0.69
Nuclear-encoded chloroplast ribulose-5-phosphate 3-epimerase	1.22	0.44	0.70	0.44
Plastidic aldolase-like protein a	-0.13	-0.33	-1.19	-0.51
Plastidic aldolase-like protein b	0.01	-0.38	-1.57	-0.70
Putative glycolate oxidase b	0.12	-0.25	-1.31	-0.40
Rubisco activase precursor a	-0.07	-0.44	-1.27	-0.72
Rubisco activase precursor b	0.09	-0.28	-1.14	-0.62
Thioredoxin	0.31	-0.19	-1.42	-1.18
Zellwachstum - Wachstumsfaktoren				
Nine-cis-epoxycarotenoid dioxygenase4	0.20	-0.71	-2.77	-2.44
Transkription - mRNA-Synthese				
10 kDa photosystem II polypeptide a	-0.01	-0.15	-1.02	-0.63
Photolyase/blue light photoreceptor	-0.28	-0.21	-1.18	-0.78
Ultraviolet-B-repressible protein	-1.08	-0.28	-1.21	-1.18
Ultraviolet-B-repressible protein	-1.04	-0.11	-1.22	-1.01
Proteinsynthese - ribosomale RNA				
18S ribosomal RNA	1.27	0.63	0.87	0.79
18S ribosomal RNA	0.97	1.48	1.91	2.49
18S ribosomal RNA	1.65	0.44	1.80	1.04
Partial 16S rRNA	1.35	0.68	0.67	0.72
Proteinverbleib/-speicherung				
Faltung und Stabilität				
Beta-glucosidase	0.70	0.02	1.59	1.80
Proteolyse				
S-adenosyl homocystein	-0.27	0.24	-1.08	-0.38

Im Juli waren durch die 2x ambiente Ozonbehandlung zwei BAT1 Transporter induziert und ein BAT1 Transporter reprimiert (Tabelle 45). Das Aquaporin zeigte Ende September und Anfang Oktober jeweils ein vermindertes Transkriptspiegel.

ESTs des intrazellularen Transportes blieben durch Ozon unbeeinflusst.

Veränderte Transkriptspiegel zeigten die ESTs der Chloroplastenzellstruktur. So war am 27.07.05 ein RNA-Wiedererkennungsmotiv-beinhaltenes Protein reprimiert. Zum Ende der Vegetationsperiode im September/Oktober waren vor allem ESTs des Photosyntheseapparates durch den Ozoneinfluss reprimiert (Tabelle 45).

Tabelle 45: Veränderte Transkriptspiegel (log₂Ratio) von Transporter ESTs und ESTs der Zellstruktur der sechsjährigen Ozon-behandelten Lysimeterrandbuchen (orange = induziert, n=15-20; hellgrün = reprimiert, n=15-20; dunkelgrün = reprimiert, CV<50).

Genname	27.07.05	11.08.05	23.09.05	11.10.05
Transporter				
ABC-Typ				
BAT1	1.21	0.54	0.74	0.67
BAT1	1.04	0.84	0.78	0.59
BAT1	-1.11	-0.10	1.10	-1.51
Sonstige				
Aquaporin (PIP2-1)	-0.55	-0.14	-1.66	-1.00
Zellstruktur - Chloroplast				
Type III chlorophyll a/b binding polypeptide of photosystem I	-0.44	-0.39	-1.28	-0.62
Chlorophyll a/b-binding protein type I a	-0.20	-0.47	-1.73	-0.62
Chlorophyll a/b-binding protein type I b	-0.48	-0.08	-1.22	-0.64
Chlorophyll A-B binding protein 4	-0.36	-0.52	-1.10	-0.62
Chloroplast Rieske FeS precursor protein 2	-0.09	-0.28	-1.03	-0.56
Light harvesting chlorophyll A/B binding protein	-0.19	-0.09	-1.19	-0.42
Oxygen evolving enhancer protein 1 precursor	-0.27	-0.19	-1.10	-0.58
Photosystem I (PS I) reaction center protein subunit II (psaD)	-0.41	-0.12	-1.40	-0.48
Rieske [2Fe-2S] region	-0.51	-0.99	-0.77	-1.24
RNA recognition motif-containing protein	-1.06	-0.69	-1.88	-0.66

Erhöhte Transkripte von ESTs der Signaltransduktion waren vor allem im Juli zu finden. Durch die Ozonbehandlung waren am 27.07.05 drei ACC-Oxidasen, ein Ethylen-resistentes Protein und eine putative Proteintyrosinkinase induziert (Tabelle 46). Weiterhin zeigte die Nukleosiddiphosphatkinase II im September einen verminderten Transkriptspiegel.

Tabelle 46: Veränderte Transkriptspiegel (\log_2 Ratio) von ESTs der Signaltransduktion, der Abwehr/Krankheit und des Sekundärmetabolismus der sechsjährigen Ozon-behandelten Lysimeterrandbuchen (orange = induziert, n=15-20; hellgrün = reprimiert, n=15-20; dunkelgrün = reprimiert, CV<50).

Genname	27.07.05	11.08.05	23.09.05	11.10.05
Signaltransduktion				
Sonstige				
ACC oxidase 1 a	1.23	0.82	-0.58	0.60
ACC oxidase 1 e	1.49	0.70	0.29	0.65
ACC oxidase b	1.64	0.71	0.33	0.67
Ethylene resistant	1.53	0.89	0.17	0.68
Kinase				
Nucleoside diphosphate kinase II	0.16	0.05	-1.56	-0.86
Protein tyrosine kinase, putative	1.21	0.97	0.00	0.19
Abwehr und Krankheit				
Abwehrverwandt				
Allene oxide synthase	0.37	0.43	0.78	1.58
NtPRp27-like protein	0.64	0.21	0.96	1.06
Stressantwort				
Abscisic stress ripening protein homolog	-1.75	0.32	-0.73	-0.54
Protein phosphatase-2-C	0.21	-0.23	-1.19	-0.95
Stress and pathogenesis-related protein	1.15	0.13	0.90	0.24
Stress and pathogenesis-related protein	1.20	0.14	1.00	0.15
Stress and pathogenesis-related protein.	1.02	0.42	0.56	0.49
Entgiftung				
Catalytic/ lactoylglutathione lyase	-0.10	-0.13	-0.98	-1.03
Glutathione S-transferase	0.32	0.87	-0.15	1.80
Lactoylglutathione lyase	0.10	-0.15	-1.51	-0.47
Manganese superoxide dismutase	1.11	-0.03	0.69	0.62
Manganese superoxide dismutase	1.14	-0.38	0.22	-0.24
Sonstige				
Prunasin hydrolase isoform PH I precursor (PH-S1)	0.66	0.54	1.97	1.53
Zeaxanthin epoxidase	-0.37	-0.52	-1.33	-0.99
Sekundärmetabolismus				
Phenylpropanoide/ Phenole				
Chalconsynthase	-1.83	0.48	-0.96	-0.47
Flavanone 3-hydroxylase (F3H gene)	-0.39	0.39	-1.17	-0.24
Flavonoid 3-O-galactosyl transferase	0.02	0.00	-1.16	-0.66
Sonstige				
(-)-isopiperitenone reductase	1.02	-0.05	0.21	-0.38
1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase	-1.26	-0.35	-1.42	-1.57

Eine Vielzahl an veränderten Transkriptspiegeln wurde in der funktionellen Gruppe Abwehr/Krankheit beobachtet (Tabelle 46). Am 27.07.05 waren die Mangansuperoxiddismutase und ein PR-Protein durch die Ozonbehandlung induziert und eine weitere EST der Stressantwort reprimiert. Im September zeigten die Proteinphosphatase 2-C, die Lactoylglutathionlyase und die Zeaxanthinepoxidase eine verminderte mRNA-Menge durch die Ozonexposition. Wohingegen

eine Isoform des Prunasinhydrolasevorläufers einen erhöhten Transkriptspiegel im September/Oktober aufwies. Die Transkriptspiegel Abwehr-verwandter Gene, wie der Allenoxidsynthese und des NtPRp27-ähnlichen Proteins waren am 11.10.05 durch die 2x ambiente Ozonexposition erhöht, genauso wie die Glutathion S-Transferase. Die katalytische Lactoylglutathionlyase zeigte einen verminderten Transkriptspiegel.

Im Sekundärmetabolismus waren im September die Transkripte der Flavanon-3-Hydroxylase, der Flavonoid-3-O-Galactosyltransferase und der 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphatreduktoisomerase verringert. Am ersten Probennahmetermin allerdings war die Chalkonsynthese reprimiert und die (-)-Isopiperitenonreduktase induziert (Tabelle 46).

Ein hypothetisches Protein war im Juli reprimiert (Tabelle 47). Des Weiteren war ein Vorläufer der Aldehyddehydrogenase 1 sowie das hypothetische Protein 3 und ein unbekanntes Protein im September reprimiert. Eine Microsatellitsequenz zeigte im September und Oktober einen erhöhten Transkriptspiegel.

Tabelle 47: Veränderte Transkriptspiegel (log₂Ratio) von ESTs unklarer Klassifizierung und unklassifiziert der sechsjährigen Ozon-behandelten Lysimeterrandbuchen (dunkelgrün = reprimiert, CV<50; orange = induziert, n=15-20; hellgrün = reprimiert, n=15-20).

Genname	27.07.05	11.08.05	23.09.05	11.10.05
Unklare Klassifizierung				
Aldehyde dehydrogenase 1 precursor	-0.01	-0.13	-1.07	-0.51
Unklassifiziert				
Hypothetical protein	1.29	-0.15	0.03	0.28
Hypothetical protein 3	0.45	0.36	-3.12	0.16
Microsatellite sequence	0.39	-0.22	1.76	1.63
Unknown	-0.21	-0.21	-1.00	-0.81

Insgesamt waren am 27.07.05 24 von den unbekanntesten ESTs neun induziert und 24 reprimiert. Im August wurde nur ein induziertes Gen festgestellt. Ende September waren 11 ESTs induziert und neun reprimiert. Anfang Oktober waren acht unbekannteste ESTs induziert und fünf reprimiert.

3.7.2 Verifizierung der Transkriptspiegel mittels qRT-PCR

Die Transkriptspiegel der GAPDH1, des UV-B-repressiven Proteins, der Chalkonsynthese und des PR-Proteins des Probennahmetermins 27.07.05 wurden annähernd bestätigt (Tabelle 48). Nicht bestätigt wurde die Induktion des Ethylen-resistenten Proteins, welches im Array induziert war, in der qRT-PCR allerdings signifikant reprimiert. Auch der Transkriptspiegel der Glutathion-

synthetase 2 wurde im Microarray als unverändert gemessen, war in der qRT-PCR allerdings signifikant reprimiert. Am Probennahmezeitpunkt vom 23.09.05 wurde die verminderte mRNA-Konzentration des Aquaporins bestätigt.

Die GAPDH1 und die 18S ribosomale RNA waren am 11.10.05 im Microarray als unverändert bestimmt worden. In der qRT-PCR allerdings waren beide Transkriptspiegel vermindert und das der GAPDH1 sogar signifikant.

Tabelle 48: Vergleich der qRT-PCR- und Microarraytranskriptspiegel (log₂Ratio), der sechsjährigen Ozon-behandelten Lysimeterrandbuchen (qRT-PCR: dunkelgrün = signifikant reprimiert, rot = signifikant induziert, hellgrün= reprimiert, orange= induziert; Microarray: rot = induziert, CV<50; dunkelgrün = reprimiert, CV<50; orange = induziert, n=15-20; hellgrün = reprimiert, n=15-20).

Gen	27.07.05 (n=20)			23.09.05 (qRT n=18; MA n=20)			11.10.05 (n=20)		
	qRT Mittelwert	Micro- Median	array array	qRT Mittelwert	Micro- Median	array array	qRT Mittelwert	Micro- Median	array array
18s				-1.21	-0.77	0.87	-1.24	-0.48	0.79
Actin				-0.95	-0.45	0.14			
GAPDH1	-0.32	-0.30	0.3				-0.66	-0.40	0.16
UVB-repress-	-1.06	-1.17	-1.08	0.44	-0.12	-1.21	-0.52	-0.65	-1.01
Aquaporin				-1.62	-1.95	-1.66	-0.75	-0.29	-1.00
ET	-0.58	-1.09	1.53						
PR	1.43	1.41	1.20						
Chalkonsynthase	-1.88	-0.57	-1.83	1.46	1.06	-1.00			
Glutathione synthetase 2	-0.83	-0.82	0.27						
Chlorophyll a/b binding protein				0.26	0.01	-1.22			
Glutathion-S-Tranferase							0.44	1.12	1.80

3.7.3 Lösliche sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe

Die Hydroxyzimtsäuren stellten mit Ausgangsgehalten von 3.5% (1x Ozon) und 1.9% (2x Ozon) den größten Anteil an löslichen phenolischen Inhaltsstoffen dar. Über den Jahresverlauf nahmen sie in den Buchen des Lysimeters von Juli bis Oktober ab (Abbildung 42). Die Konzentration an Hydroxyzimtsäurederivaten war in der Kontrollvariante bis auf den Augusttermin höher als in den Ozon-behandelten Buchen. Deutlich war dieser Sachverhalt im Juli zu sehen, wo die Buchen unter 1x Ozon fast 1.7% mehr Gehalt an Hydroxyzimtsäure aufwiesen. Ein signifikanter Ozon-einfluss über die Zeit wurde im nicht linearen Modell festgestellt.

Die Konzentrationen an Kämpferolderivaten der Lysimeterbuchen sanken signifikant von Juli bis September und waren im September und Oktober ungefähr auf gleichem Niveau. Dieser Umstand wurde sowohl im linearen, als auch im nicht linearen Modell ermittelt. Der prozentuale Anteil an Kämpferolderivaten war im Juli in den Lysimeterbuchen der ambienten Ozon-atmosphäre um 0.2% höher als in den Ozon-behandelten Buchen. Ansonsten wiesen die Ozon-

behandelten Lysimeterbuchen einen deutlich höheren Gehalt an Kämpferolderivaten auf. Insgesamt zeigten die Monate Juli/August sehr hohe prozentuale Gehalte an Kämpferolderivaten vom Frischgewicht im Vergleich zu den restlichen Probennahmeterminen.

Der Gehalt an Quercetinderivaten fiel signifikant von Juli bis Oktober ab (lineares Modell). Der prozentuale Gehalt an Quercetinderivaten bezogen auf das Frischgewicht waren in beiden Varianten im September 2005 (0.8%) und Oktober 2005 (0.7%) annähernd gleich. Höhere Werte hatten die Ozon-behandelten Lysimeterbuchen im Juli 2005 um 0.1% und im August 2005 um 0.03%.

Eine signifikante Abnahme an acylierten Flavonolglycosiden von Juli bis Oktober wurde im linearen Modell ermittelt. Der Ozoneinfluss war ebenso signifikant ($p=0.0325$), es wurde in den Ozon-gestressten Buchen im nicht linearen Modell eine stärkere Abnahme an acylierten Flavonolglycosiden als in den Kontrollbuchen beobachtet. Die Buchen unter ambienten Bedingungen besaßen höhere Gehalte an acylierten Flavonolglycosiden im Vergleich zu den Ozon-gestressten Buchen, Ausnahme bildet der August mit 0,12% höheren Gehalten durch Ozon.

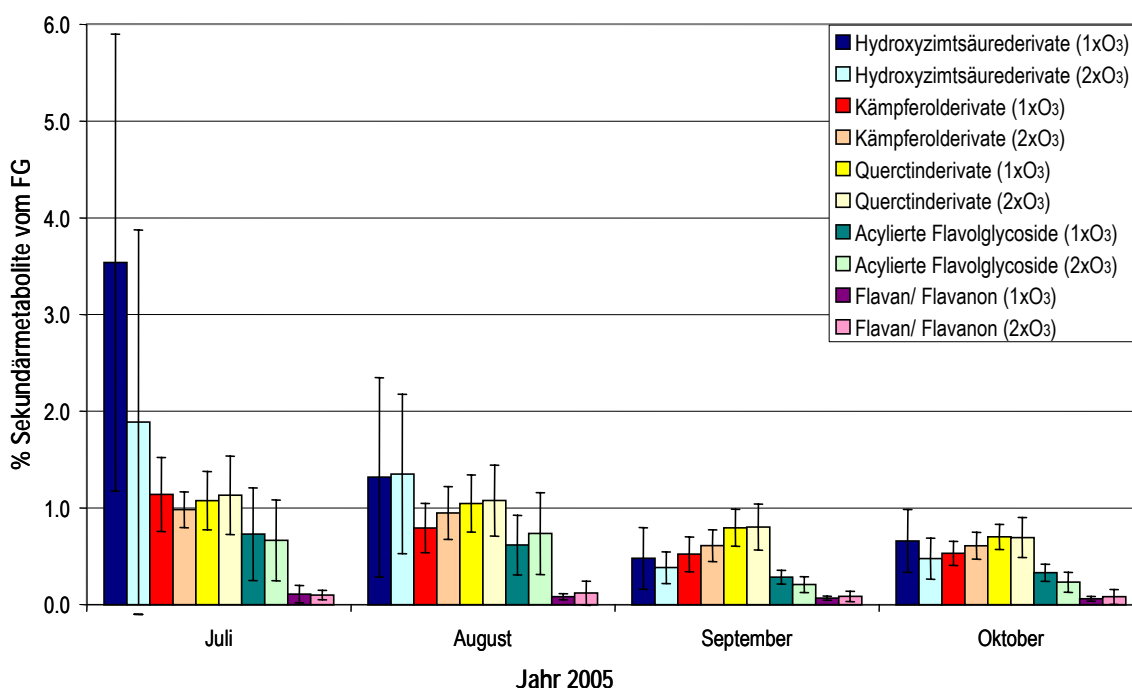


Abbildung 42: Sekundärmetabolite (%) bezogen auf das Frischgewicht der Lysimeterbuchen unter ambienten und 2x ambienten Ozonbedingungen. Eine signifikante Gehaltsabnahme über die Zeit wurde für die Hydroxyzimtsäurederivate (nicht linear), Kämpferolderivate (linear und nicht linear), Quercetinderivate (linear), acylierte Flavonolglycoside (linear) und Flavan/Flavanon (linear) festgestellt. Ein signifikanter Einfluss von Ozon wurde für die Hydroxyzimtsäurederivaten (nicht lineare) und acylierten Flavonolglycoside (linear) gesehen.

Die Flavan/Flavanone stellten bezogen auf das Frischgewicht den kleinsten Anteil löslicher Inhaltsstoffe dar. Im Jahr 2005 stiegen sie von Juli bis August an, sanken zum September und blieben bis zum Oktober auf gleichem Niveau. Ermittelt wurde im linearen Modell ein signifikanter Zeiteinfluss ($p < 0.0001$). Außer im Juli waren die Flavan-/Flavanongehalte in den Ozon-behandelten Lysimeterbäumen höher als in den Bäumen unter ambienten Bedingungen.

Der Gesamtgehalt an Flavonolderivaten war in den Ozon-behandelten Buchen im August um 0.3% und im September um 0.16% höher als in den Kontrollbuchen (Abbildung 43). Im September und Oktober waren die Gesamtflavonolderivatkonzentrationen ähnlich. Zu den übrigen Zeitpunkten waren die Gesamtflavonolderivatgehalte der unbehandelten Lysimeterbuchen höher, als die der Ozon-behandelten Lysimeterbuchen. Außerdem war der Einfluss der zeitlichen Abnahme der Gesamtflavonolderivatgehalte signifikant.

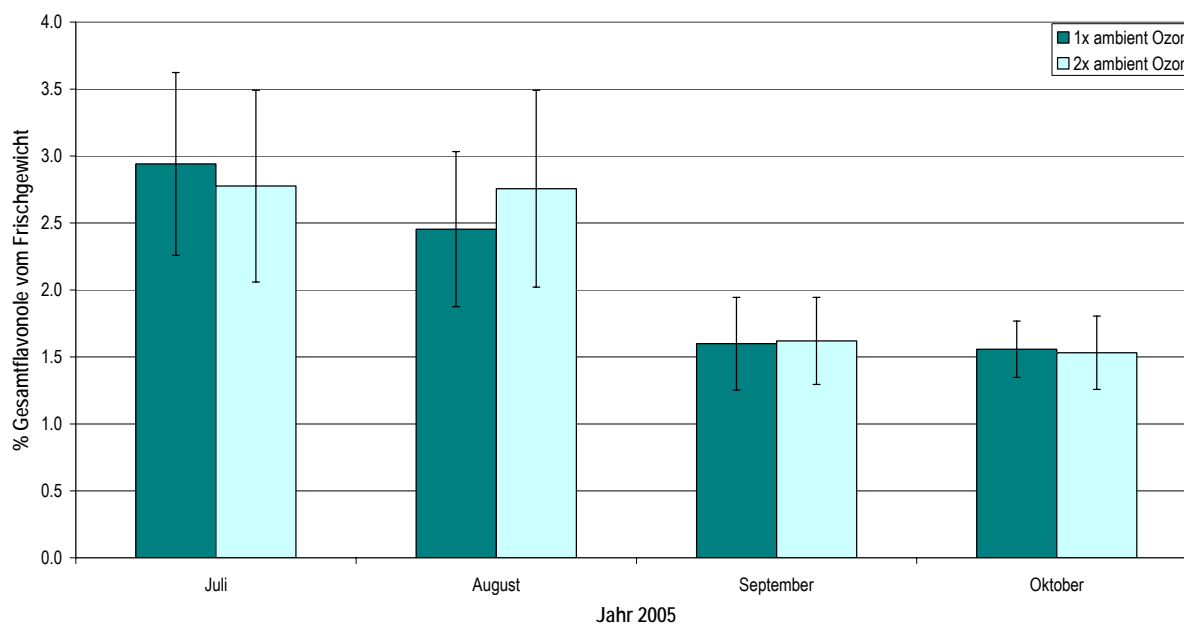


Abbildung 43: Gesamtflavonolderivate (in %) bezogen auf das Frischgewicht der Lysimeterbuchen im Jahr 2005 unter ambienten und 2x ambienten Ozonbedingungen. Signifikante zeitliche Abnahme der Gesamtflavonolderivatgehalte.

Der Gesamtgehalt an löslichen phenolischen Inhaltsstoffen nahm ebenfalls von Juli bis Oktober ab (Abbildung 44). Im zeitlichen Verlauf war ein signifikanter Ozoneinfluss, im nicht linearen Modell (Behandlung* $Tage^2$), im Juli und Oktober zu sehen.

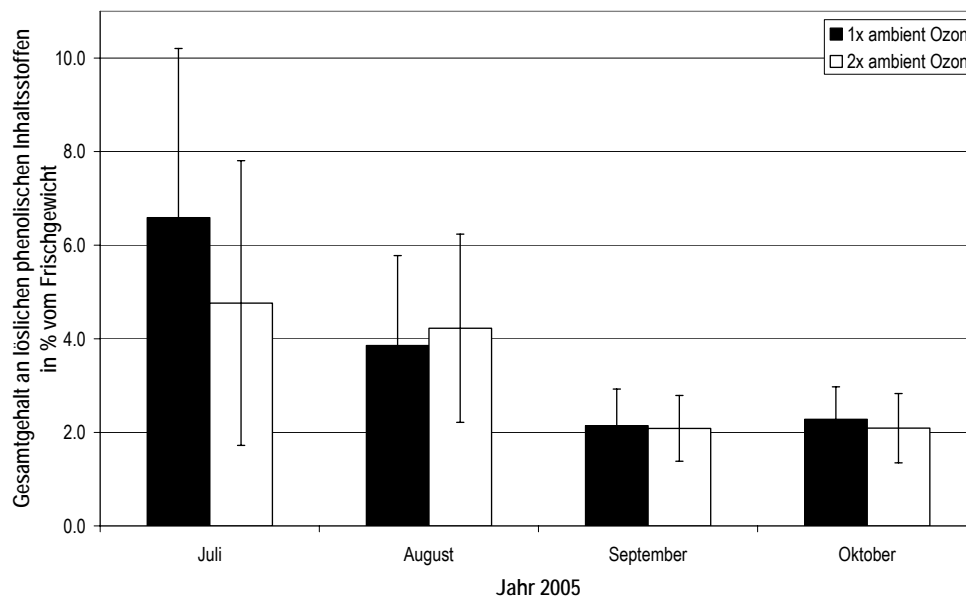


Abbildung 44: Gesamtgehalt an löslichen phenolischen Inhaltstoffen in % vom Frischgewicht im Jahr 2005 der Lysimeterbuchen unter ambientem und 2x ambientem Ozon. Im nicht linearem Modell (Behandlung* $Tage^2$) wurde ein signifikanter Ozoneinfluss im zeitlichen Verlauf im Juli und Oktober festgestellt.

3.8 Versuch Kranzberger Forst – Ozoneinfluss, Sonnen- und Schattenblätter

Dieser Freilandversuch beinhaltet den höchsten Ontogeniegrad mit den etwa 60 Jahre alten Europäischen Buchen. So soll ermittelt werden, in wie weit Ozon adulte Bäume beeinflusst und ob es eine unterschiedliche Reaktion von Sonnen- und Schattenblättern auf chronische Ozonexposition gibt.

3.8.1 Bestimmung des Transkriptspiegel mittels Microarray

Die Transkriptspiegel der etwa 60 Jahre alten Buchen (*Fagus sylvatica* L.) aus dem Kranzberger Forst veränderten sich in den beiden Jahren 2005 und 2006 kaum durch die kontinuierliche Ozonexposition (Tabelle 49 und Tabelle 50).

Am Anfang der Vegetationsperiode 2005 im Mai waren der BAT1 Transporter und die Aldo-Keto-Reduktase in den Sonnenblättern der Kranzberger Forst Buchen induziert und ein putatives mit Seneszenz-assoziiertes Protein und die 4-Coumarat:CoALigase reprimiert. Am 19.09.05 wurden die meisten Veränderungen von Transkripten festgestellt. In den Sonnenblättern war eine Kinase induziert und die Chalkonsynthase reprimiert. In den Schattenblättern zeigte die Fructose-Biphosphataldolase einen erhöhten Transkriptspiegel. Das Polyglutamin-bindende Protein der Variante 4, die 26S ribosomale RNA, die Subtilisin-ähnliche Serinprotease, ein putatives mit

Seneszenz-assoziiertes Protein und ein hypothetisches Protein sowie die Chalkonsynthase waren reprimiert.

Insgesamt reagierten Sonnen- und Schattenblätter der Kranzberger Forst Buchen ganz unterschiedlich hinsichtlich ihres mRNA-Spiegelmusters auf die erhöhte Ozonexposition, nur die Chalkonsynthase war am 19.09.05 in beiden Blatttypen reprimiert.

Tabelle 49: Transkriptspiegel (\log_2 Ratio) der Ozon-behandelten etwa 60 Jahre alten Buchen (*Fagus sylvatica* L.) aus dem Kranzberger Forst, eingeteilt in Sonnen- und Schattenblätter. Die Probenahmen erfolgten über den Jahresverlauf 2005 (rot = induziert, CV<50; dunkelgrün = reprimiert, CV<50; orange = induziert, n=5-10; hellgrün = reprimiert, n=5-10).

Name	Schattenblätter				Sonnenblätter			
	12.05.05	21.06.05	05.08.05	19.09.05	12.05.05	21.06.05	05.08.05	19.09.05
Primärmetabolismus - Aminosäure								
Polyglutamine binding protein variant 4	-1.38	-0.04	-0.29	-1.25	0.80	0.57	-0.25	-0.03
Energie - Photosynthese								
Fructose-bisphosphate aldolase	0.01	-0.10	0.49	1.17	-0.19	0.03	-0.14	0.05
Proteinsynthese - ribosomale RNA								
26S ribosomal RNA	-0.12	-0.08	0.11	-1.08	0.28	-0.03	0.01	-0.90
Transporter - ABC-Typ								
BAT1a	0.26	-0.08	-0.24	0.01	1.05	-0.16	0.02	0.38
Signaltransduktion								
Sonstige								
Subtilisin-like serine protease	-0.51	0.15	-0.15	-1.40	0.06	-0.21	0.10	-0.22
Kinasen								
Phosphatidylinositol 3- and 4-kinase, catalytic	-0.71	0.05	-0.68	-0.08	1.30 inv		-0.20	1.87
Abwehr/ Krankheit - Sonstige								
Putative senescence-associated protein	0.02	0.37	-1.37	0.39	-2.73	-0.17	3.48	0.22
Putative senescence-associated protein	-0.06	-0.11	-0.07	-1.21	-0.10	-0.07	0.24	-0.56
Unklare Einteilung								
Aldo-keto reductase	0.25	0.46	-0.35	-0.02	2.69	-1.22	0.11	-0.01
Hypothetical protein 3	-0.05	-0.03	-0.12	-1.01	0.06	-0.13	0.13	-0.79
Sekundärmetabolismus - Phenylpropanoide/ Phenole								
4-coumarate:CoA ligase	3.10	0.32	-2.70	-3.30	-1.52	-0.59	-1.14	-2.84
Chalkonsynthase	-0.40	0.01	-1.31	-1.18	-0.08	-0.57	-0.18	-1.06

Im Jahr 2006 waren nur sechs ESTs durch die chronische Ozonexposition beeinflusst. Am 27.06.06 wies in den Sonnenblättern der Kranzberger Forst Buchen ein EST des Aminosäuretransportersystems ähnlich zu N2 reduzierte und ein BAT1 Transporter erhöhte Transkriptspiegel auf. Erhöhte mRNA-Spiegel zeigten am 12.09.06 die folgenden ESTs in der Schattenblättern der Ozon-behandelten Buchen: UV-B-repressives Protein, 18S ribosomale RNA, ACC Oxidase 1a und ein Isoflavonreduktase-verwandtes Gen.

In den Blättern der Sonnen- und Schattenkrone waren keine gemeinsamen Reaktionen auf Transkriptebezuglich der Ozonbehandlung zu sehen.

Tabelle 50: Transkriptspiegel (\log_2 Ratio) der Ozon-behandelten etwa 60 Jahre alten Buchen (*Fagus sylvatica* L.) aus dem Kranzberger Forst, eingeteilt in Sonnen- und Schattenblätter. Die Probenahmen erfolgten über den Jahresverlauf 2006 (rot = induziert, CV<50; dunkelgrün = reprimiert, CV<50; orange = induziert, n=5-10).

Genname	Schattenblätter				Sonnenblätter			
	27.06.06	02.08.06	12.09.06	18.10.06	27.06.06	02.08.06	12.09.06	18.10.06
Transkription - mRNA-Synthese								
Ultraviolett-B-repressible protein	-0.20	0.57	1.02	0.14	0.34	-0.37	-0.46	-0.19
Proteinsynthese - Ribosomale RNA								
18S ribosomal RNA	1.21	0.78	1.35	0.16	-0.02	0.29	0.40	0.50
Transporter - ABC-Typ								
Amino acid transporter (AAT) system similiar to N2	-1.21	3.11	2.08	-3.21	-1.34	1.25	0.74	0.69
BAT1	-0.16	-0.10	<invalid>	-0.53	1.05	-0.39	0.83	-0.60
Signaltransduktion - Sonstige								
ACC oxidase 1 a	0.79	-0.30	1.63	0.65	-0.08	0.80	-0.32	-0.54
Sekundärstoffwechsel - Phenylpropanoide/ Phenole								
Isoflavone reductase-related	-0.11	0.12	1.03	0.04	0.69	-0.65	-0.14	-0.13

3.8.2 Verifizierung der Transkriptspiegel mittels qRT-PCR

Um die Transkriptdaten des Microarrays zu verifizieren, wurden von denselben Proben nochmals die Transkriptspiegel für ausgewählte ESTs durch qRT-PCR bestimmt. Der Transkriptspiegel der am 19.09.05 in den Schatten- und Sonnenblättern reprimierten Chalkonsynthase wurde weitestgehend bestätigt, der Transkriptspiegel in den Sonnenblättern war sogar signifikant unterschiedlich (Tabelle 51).

Die Transkripte der ACC-Oxidase 1a (Schattenblätter 12.09.06) sowie des BAT1 Transporters (Sonnenblätter 27.06.06) wurden ebenfalls bestätigt, allerdings waren die Werte nicht signifikant.

Tabelle 51: Verifizierung der durch Microarray erhaltenen Transkriptspiegel (\log_2 Ratio) mittels qRT-PCR der Ozon-behandelten etwa 60 Jahre alten Buchen (*Fagus sylvatica* L.) des Kranzberger Forstes, eingeteilt in Sonnen- und Schattenblätter aus dem Jahren 2005/2006 (qRT-PCR: dunkelgrün = signifikant reprimiert; hellgrün = reprimiert, nicht signifikant; gelb = unverändert; Microarray: hellgrün = reprimiert, n= 5-10; orange = induziert, n=5-10; rot = induziert, CV<50).

Genname	Schattenblätter 19.09.05 (n=20)			Sonnenblätter 19.09.05 (n=20)			Schattenblätter 12.09.06 (n=20)			Sonnenblätter 27.06.06 (n=20)		
	qRT-PCR Mittelwert	Micro- array Median	Micro- array array	qRT-PCR Mittelwert	Micro- array Median	Micro- array array	qRT Mittelwert	Micro- array Median	Micro- array array	qRT Mittelwert	Micro- array Median	Micro- array array
Chalkonsynthase	-0.37	-0.69	-1.18	-1.63	-1.30	-1.06						
ACC oxidase 1 a							0.46	0.85	1.63			
BAT1										1.18	0.43	1.05

3.8.3 Inhaltsstoffanalysen

Ozon-bedingte Veränderungen am Trockengewicht, ACC, Zellulose und Zellwand wurden in den Sonnen- und Schattenblättern der Kranzberger Forst Buchen im Jahr 2005 untersucht.

3.8.3.1 1-Aminocyclopropansäure-1-Carbonsäure

Der Gehalt an freiem ACC in den Buchen des Kranzberger Forstes war insgesamt in den Schattenblättern höher als in den Sonnenblättern (Abbildung 45). Er nahm in den Blättern der Schattenkrone von Mai bis Juni um 0,4 nmol/g Frischgewicht (1x Ozon) und 1,1 nmol/g Frischgewicht (2x Ozon) zu. Im August gingen die freien ACC-Gehalte in den Schattenblättern unter 2x ambientem Ozon wieder auf den Maiwert zurück, wohingegen die Gehalte in den Schattenblättern der Buchen unter ambienten Bedingungen auf Juniniveau blieben. Im September hatten die Schattenblätter (1x und 2x Ozon) die höchsten freien ACC-Gehalte von 2,3 nmol/g Frischgewicht. Im Oktober nahmen diese Werte in den Schattenblättern unter 2x ambientem Ozon um 1 nmol/g Frischgewicht und unter 1x ambientem Ozon um 0,7 nmol/g Frischgewicht ab.

Der Verlauf der freien ACC-Gehalte zeigte in den Schattenblättern über den Jahresverlauf zwei Peaks im Juni und September, wobei in den Sonnenblättern nur einen Peak im September zu verzeichnen war. Dort erreichten die Blätter der Sonnenkrone unter normalen Ozonbedingungen höhere Werte als die Sonnenblätter der Buchen unter 2x ambientem Ozon. Zum Oktober nahmen die freien ACC-Gehalte in beiden Ozonvarianten ab.

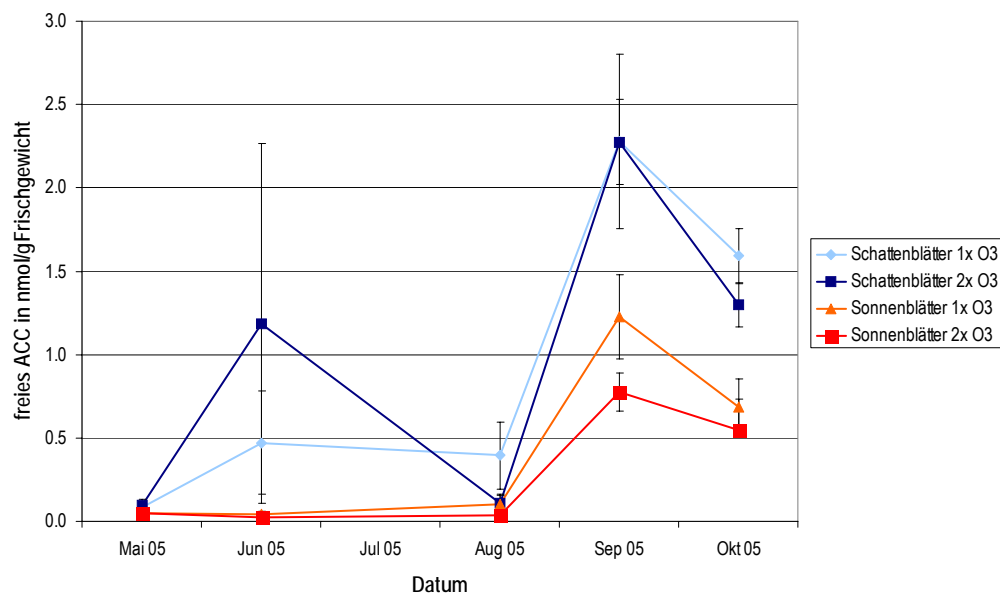


Abbildung 45: Gehalt an freiem ACC in nmol/g Frischgewicht, der Buchen des Kranzberger Forstes unter ambientem und 2x ambientem Ozon. Die Probenahme der Schatten- und Sonnenblätter fand an folgenden Terminen statt: 12.05., 21.06., 05.08., 19.09., 13.10.2005.

Die Gehalte an konjugiertem ACC waren insgesamt ebenfalls in den Schattenblättern höher als in den Sonnenblättern (Abbildung 46). Die Schatten- und Sonnenblätter der Bäume unter erhöhten Ozonbedingungen hatten einen höheren Gehalt an konjugiertem ACC als die Bäume unter 1x

ambienten Ozonbedingungen, wobei im September im Bereich der Schattenkrone die höchsten Werte an konjugiertem ACC gemessen wurden. Im Gegensatz dazu zeigten die Sonnenblätter beider Ozonregime im September die niedrigsten Gehalte an konjugiertem ACC, wobei die Variante unter erhöhten Ozonbedingungen geringere ACC-Gehalte aufwies als die unter normalen Ozonbedingungen.

Interessanterweise wurden im Mai sehr hohe Anfangsgehalte von 23,3 nmol/g Frischgewicht in den Sonnenblättern der erhöhten Ozonkonzentration festgestellt, in den anderen drei Varianten wurden Werte zwischen 12,3 und 13,8 nmol/g Frischgewicht erreicht.

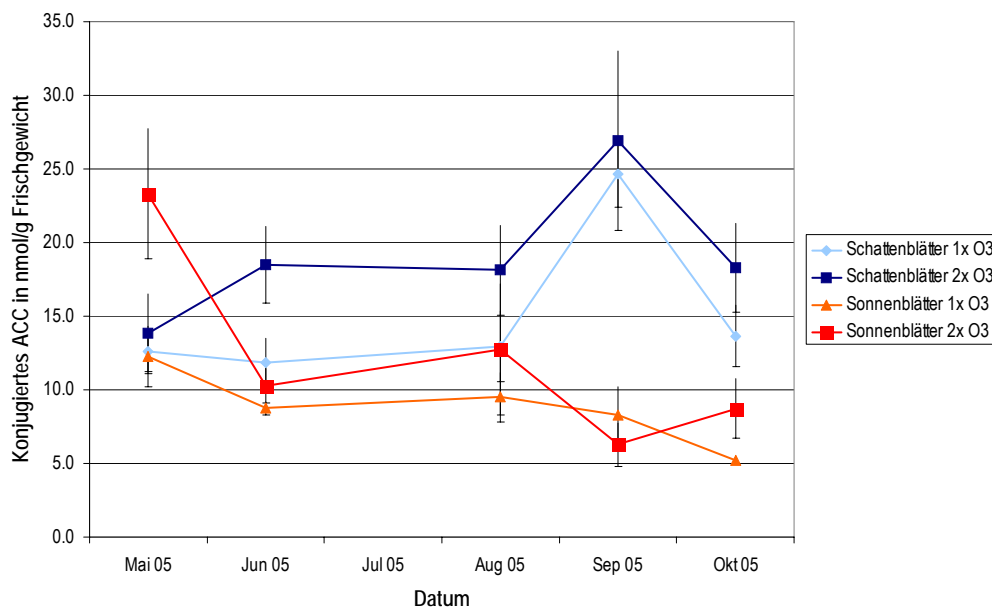


Abbildung 46: Gehalt an konjugiertem ACC in nmol/g Frischgewicht der Buchen des Kranzberger Forstes unter ambientem und 2x ambientem Ozon. Die Probennahme der Schatten- und Sonnenblätter fand an folgenden Terminen statt: 12.05., 21.06., 05.08., 19.09., 13.10.2005.

Die Gehalte an Zellwand-gebundenem ACC nahmen von Mai bis August zu und bis September/Oktober ab. Nur in den Schattenblättern der Buchen unter Kontrollbedingungen erreichte der Zellwand-gebundene ACC-Gehalt schon im Juni den höchsten Wert von 8,8 nmol/g Frischgewicht und fiel bis zum Oktober kontinuierlich auf einen Wert von 1,9 nmol/g Frischgewicht ab.

Das in die Zellwand eingebundene ACC erreichte im Mai in den Sonnenblättern der Buchen unter 2x ambientem Ozon den höchsten Gehalt (4,5 nmol/g Frischgewicht), in den Schattenblättern unter denselben Bedingungen wurde der geringste Gehalt (2,3 nmol/g Frischgewicht) verzeichnet (Abbildung 47).

Der insgesamt höchste Zellwand-gebundene ACC-Anteil von 12,5 nmol/g Frischgewicht war in den Sonnenblättern der Buchen unter 2x ambienten Bedingungen im August zu sehen.

Für die Zellwand-gebundenen ACC-Gehalte wurde ein signifikanter zeitlicher Verlauf im linearen sowie im nicht linearen Modell (Tage^2) festgestellt, wobei die Sonnenblätter (2x Ozon), im Juni die höchsten Konzentrationen an Zellwand-gebundenem ACC aufwiesen, diese sanken allerdings bis Oktober am stärksten. Der zeitliche Verlauf an Zellwand-gebundenem ACC in den Sonnenblättern unter ambienten Ozonbedingungen war ähnlich zu dem unter erhöhtem Ozon, allerdings etwas moderater. Die Schattenblätter der Bäume (1x Ozon) hatten im Mai die geringsten Ausgangswerte, dafür im Oktober die größte Gehaltszunahme an Zellwand-gebundenem ACC zu verzeichnen, einen ähnlichen wiederum gemäßigeren Verlauf wurde in den Schattenblättern unter erhöhtem Ozon ermittelt.

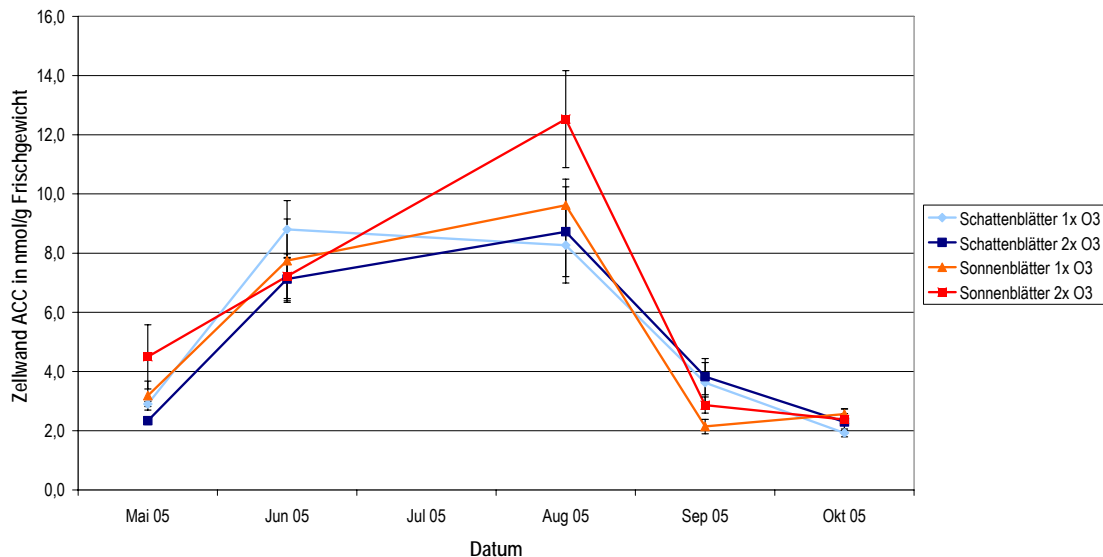


Abbildung 47: Zellwand-gebundener ACC-Gehalt in nmol/g Frischgewicht der Buchen des Kranzberger Forstes unter ambientem und 2x ambientem Ozon. Die Probennahme der Schatten- und Sonnenblätter fand an folgenden Terminen statt: 12.05., 21.06., 05.08., 19.09., 13.10.2005.

Der Gesamt ACC-Gehalt war in den Schattenblättern der Buchen des erhöhten Ozonmilieus über den Jahresverlauf am höchsten, einzige Ausnahme bildete der Maitermin, wo die Sonnenblätter unter erhöhten Ozonbedingungen den höchsten Wert aufwiesen (Abbildung 48).

In den Schattenblättern nahm der ACC-Gehalt von Mai bis August zu und erreichte im September den höchsten Gehalt. Dieser fiel zum Oktober auf einen Gehalt von etwa 2 nmol/g Frischgewicht zurück.

In den Sonnenblättern der Buchen (1x Ozon) nahmen die Gesamt-ACC-Gehalte kontinuierlich von Mai bis August zu und sanken bis zum Oktober stark.

Die Sonnenblätter der Buchen unter erhöhten Ozonbedingungen wiesen extreme Schwankungen auf. Sie hatten im Mai das höchste Gesamt-ACC Ausgangsniveau, dieses nahm bis Juni stark ab, stieg im August auf 25 nmol/g Frischgewicht, nahm wiederum bis September um 16,1 nmol/g Frischgewicht ab und bis Oktober wieder leicht zu.

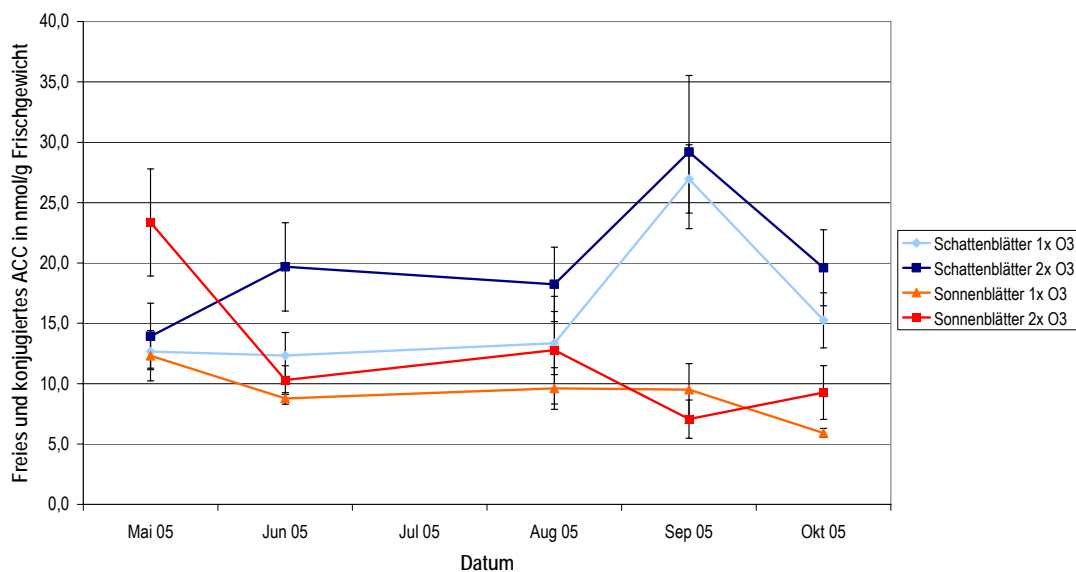


Abbildung 48: Gesamt ACC-Gehalt in nmol/g Frischgewicht der Buchen des Kranzberger Forstes unter ambientem und 2x ambientem Ozon. Die Probennahme der Schatten- und Sonnenblätter fand an folgenden Terminen statt: 12.05., 21.06., 05.08., 19.09., 13.10.2005.

3.8.3.2 Strukturelle Inhaltsstoffe

Das Trockengewicht der Sonnenblätter war signifikant höher als das der Schattenblätter (Abbildung 49). Über den Jahresverlauf änderten sich die Trockengewichte beider Blattarten signifikant (nicht linear), so nahm das Trockengewicht der Schattenblätter zu. Einzige Ausnahme bildeten die Schattenblätter der Kontrollbedingungen im September, sie wiesen geringere Trockengewichte auf als im August.

Der Vergleich der Schattenblätter unter den verschiedenen Ozonbedingungen ergab, dass die Schattenblätter der Bäume unter Kontrollbedingungen im allgemeinen ein höheres Trockengewicht erreichten, nur im September waren die Trockengewichte der Schattenblätter der Bäume unter 2x ambientem Ozon höher, im Juni waren sie gleich.

Das Trockengewicht der Sonnenblätter erreichte im August den höchsten Wert von 39 mg/100 mg Frischgewicht. Im September sank das Trockengewicht und stieg bis zum Oktober wieder an.

Die Sonnenblätter der Buchen unter erhöhten Ozonbedingungen hatten, verglichen mit den Buchen (1x Ozon) von Mai bis September etwa um 1 mg höhere Trockengewichte. Nur im Oktober wiesen die Sonnenblätter der Buchen unter erhöhten Ozonbedingungen 1,5 mg mehr Trockengewicht auf.

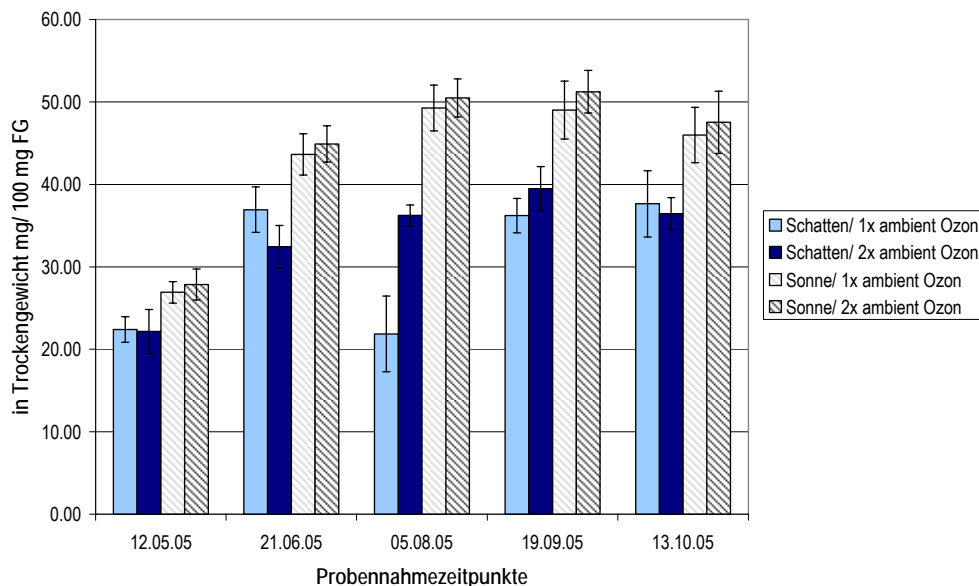


Abbildung 49: Trockengewicht in mg, der Kranzberger Forst Buchen unter ambientem und 2x ambientem Ozon. Die Probennahme der Schatten- und Sonnenblätter fand an folgenden Terminen statt: 12.05., 21.06., 05.08., 19.09., 13.10.2005. Das Trockengewicht der Sonnenblätter war signifikant höher, als das der Schattenblätter, des Weiteren wurde im nicht linearen Modell eine signifikante Änderung der Trockengewicht über den Jahresverlauf festgestellt.

Der prozentuale Zellwandgehalt pro Trockengewicht nahm in den Schattenblättern der Buchen unter normalen Bedingungen von Mai bis Oktober zu, wobei im Oktober die höchsten Zellwandgehalte von 79% unter ambienten und 77% unter 2x ambienten Ozonbedingungen erreicht wurden (Abbildung 50). Die Schattenblätter unter 2x ambientem Ozon hatten im Mai und Juni einen höheren Zellwandgehalt, bezogen auf das Trockengewicht als die Schattenblätter der Buchen unter Kontrollbedingungen. Dieser Gehalt glich sich allerdings im August und September an das Zellwandniveau der Schattenblätter unter normalen Bedingungen an und nahm im Oktober wieder etwas zu, erreichte aber nicht so hohe Werte wie in den Schattenblättern unter normalen Bedingungen.

Die Sonnenblätter hatten insgesamt im Juni den höchsten Zellwandgehalt von 77% (1x Ozon) und 72% (2x Ozon) bezogen auf das Trockengewicht. Im Mai wiesen die Sonnenblätter der Buchen unter erhöhten Ozonbedingungen einen höheren Zellwandanteil pro Trockengewicht im

Vergleich zu den Sonnenblättern der Buchen unter normalen Ozonbedingungen auf. Im weiteren Jahresverlauf hatten immer die Sonnenblätter unter normalen Bedingungen höhere prozentuale Zellwandanteile als die Buchen unter erhöhten Ozonbedingungen. Der maximal prozentuale Zellwandgehalt pro Trockengewicht in den Sonnenblättern im Juni nahm bis zum August um etwa 2 bis 5% ab und blieb bis zum Oktober auf diesem Niveau.

Der prozentuale Zellwandgehalt wies signifikante Veränderungen im nicht linearen Modell über den Jahresverlauf auf. Ferner war ein signifikanter Einfluss der Blattart und der Exposition mit Ozon zu sehen. Signifikante Unterschiede wurden zum einen über den zeitlichen Verlauf in Relation zum Blattpfand und zum anderen in Relation zur Ozonexposition gesehen.

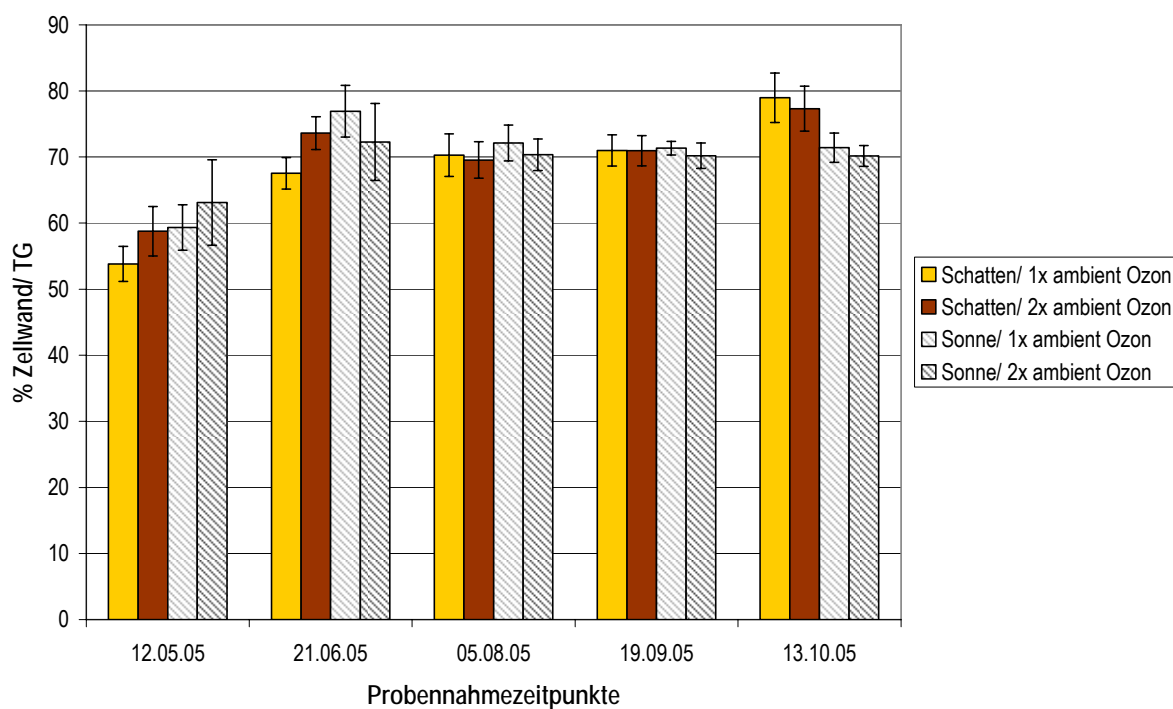


Abbildung 50: Prozentualer Zellwandgehalt vom Trockengewicht der Kranzberger Forstbuchen unter ambientem und 2x ambientem Ozon. Die Probennahme der Schatten- und Sonnenblätter fand an folgenden Terminen statt: 12.05., 21.06., 05.08., 19.09., 13.10.2005.

In den Schattenblättern der Buchen unter erhöhten Ozonbedingungen war ein höherer prozentualer Zellulosegehalt bezogen auf das Trockengewicht zu sehen, als in den Buchen unter normalen Ozonbedingungen (Abbildung 51). Insgesamt nahm der Zellulosegehalt in den Schattenblättern von Mai bis Juni zu, fiel im August ab und erreichte im September ungefähr das

Juniniveau. Im Oktober wurden die höchsten Zellulosegehalte von 27,9% (1x ambient Ozon) und 28,5% (2x ambient Ozon) erreicht.

In den Sonnenblättern der Buchen unter normalen Ozonbedingungen wurde interessanterweise im Mai ein sehr hoher prozentualer Zellulosewert pro Trockengewicht von 27% festgestellt, wohingegen die Sonnenblätter der Buchen unter erhöhten Ozonbedingungen nur 13% aufwiesen. Der prozentuale Zellulosegehalt nahm, ähnlich zu den Schattenblättern, von Mai bis Juni zu, im August ab und stieg bis Oktober an. Insgesamt nahm der Zellulosegehalt über das Jahr signifikant zu (nicht lineares Modell bezogen auf die Zeit).

Im Vergleich von Sonnen- und Schattenblättern wiesen die Schattenblätter im Juni und Oktober höhere prozentuale Zellulosegehalte auf als die Sonnenblätter. Ansonsten waren die Werte ungefähr gleich, einzige Ausnahme bildete der hohe prozentuale Zellulosegehalt von 27% in den Sonnenblättern der Buchen unter normalen Ozonbedingungen im Mai.

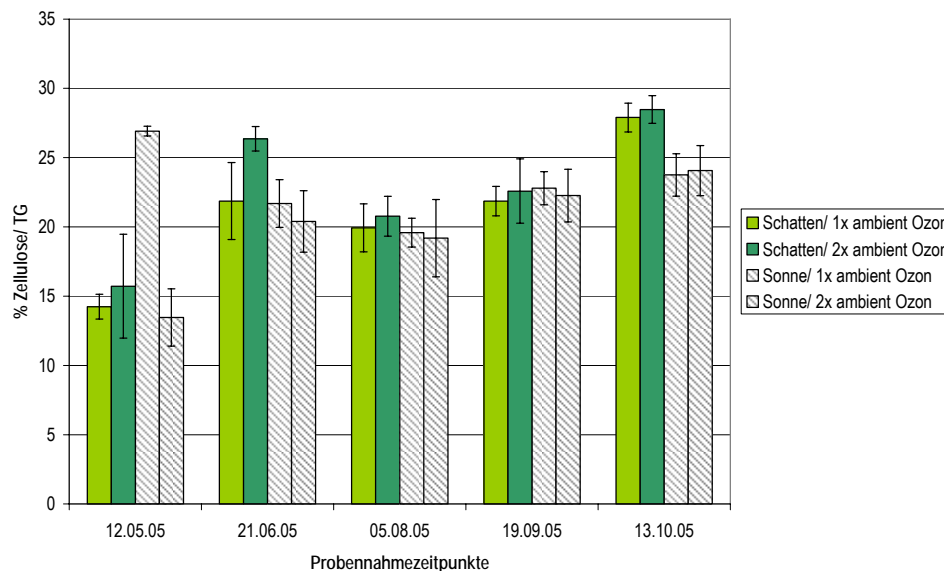


Abbildung 51: Prozentualer Zellulosegehalt vom Trockengewicht der Kranzberger Forst Buchen unter ambientem und 2x ambientem Ozon. Die Probennahme der Schatten- und Sonnenblätter fand an folgenden Terminen statt: 12.05., 21.06., 05.08., 19.09., 13.10.2005. Signifikante Zunahme der Zellulose über die Zeit.

3.9 Kranzberger Forst – Einfluss von Ozon und Insekten

Die Reaktion der adulten Buchen auf erhöhtes Ozon und Insektenschädigung wurden in diesem Abschnitt betrachtet.

3.9.1 Bestimmung des Transkriptspiegels mittels Microarray

Im Folgenden werden die veränderten Transkriptkonzentrationen der durch Insekten geschädigten Blätter der Sonnen- und Schattenkrone der Europäischen Buchen des Kranzberger Forstes unter ambientem und 2x ambientem Ozon vorgestellt. Wegen des geringen Probenumfangs wurden pro Schadbild im 2x ambienten Ozonmilieu ein Slide und im normalen Milieu zwei Slides hybridisiert.

Im Vergleich von Sonnenblättern unter ambienten und 2x ambienten Ozonbedingungen und nachfolgendem Insektenbefall wurde festgestellt, dass die Ozon-behandelten Buchen auf der Transkriptebene stärker auf den Insektenbefall reagierten (Abbildung 12). Dieser Aspekt rührte vor allem von den zahlreich veränderten Transkripten der Lochfraß-geschädigten Sonnenblätter unter 2x ambienten Ozon her. Aber auch in den durch Minierung geschädigten Blättern der erhöhten Ozonkonzentration zeigte eine größere Anzahl an ESTs einen veränderten Transkriptspiegel, als in den Sonnenblättern unter ambienten Bedingungen.

Genname	2x ambient Ozon						Kontrollbedingungen					
	Schatten		Sonnenblätter				Schattenblätter		Sonnen			
	M	LF	M	LF		G	M	LF	M	LF	G	
Primärmetabolismus	■		■	■	■			■	■		■	■
Energie		■	■	■	■		■	■	■	■		■
Zellwachstum		■	■	■	■			■	■	■		■
Transkription		■	■	■	■			■	■	■		■
Proteinsynthese	■	■	■	■	■		■	■	■	■		■
Proteinverbleib/-speicherung	■	■	■	■	■		■	■	■	■		■
Transporter	■	■	■	■	■		■	■	■	■		■
Intrazellulärer Transport		■	■	■	■			■	■	■		■
Zellstruktur		■	■	■	■		■	■	■	■		■
Signaltransduktion	■	■	■	■	■		■	■	■	■		■
Krankheit/ Abwehr		■	■	■	■		■	■	■	■		■
Sekundärmetabolismus		■	■	■	■		■	■	■	■		■
Unklare Einteilung		■	■	■	■		■	■	■	■		■
Unklassifiziert	■	■	■	■	■		■	■	■	■		■

Abbildung 52: Zusammenfassung der reprimierten (grün) und induzierten (rot) ESTs in den einzelnen funktionellen Klassen, eingeteilt nach Sonnen- und Schattenblätter und den einzelnen Schadbildern (M= Minierung durch *R. fagi*, LF= Lochfraß durch *R. fagi*, G= Gallenbildung durch *M. fagi*).

Die Transkriptspiegel der Schattenblätter unter den verschiedenen Bedingungen verhielten sich genau gegensätzlich. So waren die mRNA-Spiegel unter erhöhten Ozonbedingungen durch die Minierung eher erhöht, unter ambienten Bedingungen eher vermindert. Die Transkriptkonzentrationen stiegen durch den Lochfraß in den Schattenblättern (1x Ozon) an, wobei sie unter 2x ambienten Ozonbedingungen eher reduziert waren.

Unterschiede im mRNA-Niveau zwischen Grund- und Abwehr- beziehungsweise Sekundärmetabolismus wurden kaum gesehen. Unter erhöhten Ozonkonzentrationen in den minierten Schattenblättern waren ESTs des Grundmetabolismus erhöht, wobei der Abwehr- beziehungsweise Sekundärmetabolismus durch Minierung unverändert blieb.

In Betrachtung des Primärmetabolismus waren die Transkriptspiegel eines Polyglutamin-bindenden Proteins und einer Glykosidhydrolase in den minierten Schattenblättern, unter 2x ambientem Ozon erhöht (Anhang, Tabelle 55). Die zuletzt erwähnte, zeigte ebenso eine erhöhte mRNA-Menge in den minierten Sonnenblättern (2x Ozon), wobei die Transkriptspiegel der Glykosyltransferase und des Alaninracematfamilienproteins vermindert waren.

Vermindert waren 11 Transkriptspiegel von ESTs des Primärmetabolismus in den Lochfraß-geschädigten Sonnenblättern der Buchen unter 2x ambienten Ozonbedingungen, nur eine Glykosidhydrolase und ein Polyglutamin-bindendes Protein waren induziert. Auch in den Schattenblättern der Buchen unter erhöhten Ozonbedingungen und in den Sonnenblättern der Buchen unter ambienten Bedingungen war der mRNA-Spiegel des Polyglutamin-bindenden Proteins durch Lochfraß vermindert. Allerdings zeigten das Polyglutamin-bindende Protein und die Phosphoglyceromutase der Lochfraß-geschädigten Schattenblätter unter 1x ambientem Ozon einen erhöhten Transkriptspiegel. Die Intramolekulare Transferase wies einen verminderten Transkriptspiegel durch die Gallenbildung in den Sonnenblättern der Kontrollbuchen auf.

Die Transkriptmengen von ESTs des Energiemetabolismus der Sonnenblätter (1x Ozon) blieben durch Insektenschaden unverändert (Anhang, Tabelle 55). In den Schattenblättern der Buchen unter ambienten Bedingungen war die mRNA-Menge des Glutaredoxins durch die Minierung vermindert, genauso wie die der Chloroplastenquinonoxidoreduktase durch den Lochfraß. Lochfraß-induziert waren allerdings die Oxidoreduktase und das Glutaredoxin in den Schattenblättern (1x Ozon). Lochfraß an den Schattenblättern der erhöhten Ozonkonzentration reduzierte den Transkriptspiegel des Glutaredoxins und der AAA ATPase. In den Sonnenblättern der Buchen unter 2x ambienten Ozonbedingungen war das Glutaredoxin, die Oxido- und die Plastoquinolreduktase durch die Minierung induziert. Elf ESTs des Energiestoffwechsels zeigten durch den Lochfraß verminderte Transkriptspiegels. Die Gallenbildung ließ der Transkriptspiegel der zytosolischen Aldolase in den Sonnenblättern der Buchen (2x Ozon) ansteigen.

Bezüglich des Zellwachstums reagierten nur die Sonnenblätter unter ambienten Bedingungen mit einer Reduktion des mRNA-Spiegels eines Auxin-regulierenden Proteins auf die Gallenbildung (Anhang, Tabelle 55). Des Weiteren waren in den Schattenblättern derselben Buchen durch den Lochfraß das Nukleosom-aufbauende Protein induziert und die Gibberellin 20 Oxidase durch Minierung reprimiert. In den Schattenblättern der Ozon-behandelten Bäume zeigte nur das putative Cytochrom C Oxidaseprotein durch den Lochfraß verminderte mRNA-Konzentrationen. Sechs ESTs des Zellwachstums waren in den Sonnenblättern der Ozon-behandelten Bäume durch Lochfraß reprimiert, nur einer durch Minierung.

Drei ESTs der Transkription waren in den minierten Schattenblättern (1x Ozon) reprimiert und durch Lochfraß zwei Transkriptionsfaktoren induziert (Anhang, Tabelle 56). Des Weiteren zeigten zwei Transkriptionsfaktoren in den minierten Sonnenblättern der Kontrollbuchen eine reduzierte mRNA-Konzentration. Ebenfalls eine verringerte mRNA-Menge zeigten 10 ESTs durch den Lochfraß in den Sonnenblättern (2x Ozon) sowie drei durch Minierung. Nur ein EST zeigte durch den Lochfraß in den Schattenblättern unter erhöhtem Ozon eine Reduktion der Transkriptmenge.

In den Schattenblättern (1x Ozon) zeigten nur drei ESTs der Proteinsynthese veränderte mRNA-Konzentrationen: zwei Lochfraß-induzierte ESTs und ein durch Minierung reprimierter EST (Anhang, Tabelle 56). Die Ozon-gestressten Schattenblätter reagierten mit der Induktion zweier ESTs auf die Minierung und mit der Reduktion von vier ESTs auf den Lochfraß. Die Lochfraß-geschädigten Sonnenblätter (2x Ozon) wiesen 26 reprimierte ESTs und eine induzierte EST auf. Durch Minierung war ein ribosomales Protein induziert.

Ein EST von Proteinverbleib/-speicherung war durch Minierung in den Ozon-behandelten Blättern induziert, genauso wie durch Lochfraß in den Schattenblättern der Buchen unter ambienten Bedingungen (Anhang, Tabelle 56). Ebenfalls induziert waren unter den zuletzt genannten Verhältnissen drei ESTs der Proteolyse, wie die Aminomethyltransferase, die ebenso in den Sonnenblättern unter erhöhtem Ozon durch Minierung und Lochfraß induziert war. Eine verminderte mRNA-Menge wies das Ubiquitin-konjugierte Enzymfamilienprotein in den durch Lochfraß- und Gallenbildung-geschädigten Sonnenblättern (2x Ozon) sowie in den minierten Schattenblättern (1x Ozon) auf. Das Proteasomreifungsfaktorfamilienprotein war durch Minierung und das S-Adenosylhomocystein durch Lochfraß in den Schattenblättern (1x Ozon) reprimiert. Neun ESTs waren in den Lochfraß-geschädigten Sonnenblättern der Ozon-behandelten Buchen reprimiert

Zwei Transporter des ABC-Typs reagierten in den Lochfraß-geschädigten Schattenblättern (1x Ozon) mit einem Anstieg ihres Transkriptspiegels (Anhang, Tabelle 57). Ein ABC-Transporter war in den Sonnenblättern (1x Ozon) reprimiert, genauso wie ein Multidrugresistenz-assoziiertes Protein in den minierten Schattenblättern. Die minierten Schatten- und Sonnenblätter der Buchen (2x Ozon) wiesen eine Induktion des BAT1 Transporters auf, wohingegen dieser in den Lochfraß-geschädigten Schattenblättern reprimiert war. In den Ozon-behandelten Sonnenblättern war der BAT1 durch die Gallenbildung reprimiert. Reduzierte Transkriptkonzentrationen waren nach Lochfraß für verschiedene Transporter zu erkennen, wobei ein BAT1 Transporter war induziert. Zwei intrazelluläre Transporter wiesen einen verminderten mRNA-Spiegel in den Sonnenblättern der Ozon-behandelten und durch Lochfraß geschädigten Buchen auf.

Bezüglich der Zellstruktur waren in den Sonnenblättern unter ambienten Bedingungen durch Minierung ein Chlorophyll a/b-bindendes Protein und durch Gallenbildung ein α -Tubulin induziert (Anhang, Tabelle 57). In den Schattenblättern war ebenfalls das α -Tubulin durch Lochfraß sowie drei ESTs der Chloroplastenstruktur induziert. Durch die Minierung waren unter denselben Bedingungen zwei ESTs der Chloroplastenstruktur reprimiert. In den Schattenblättern (2x Ozon) zeigte nur ein putatives Membranprotein durch Lochfraß eine verminderte Transkriptmenge. Dieses Protein war auch in den Sonnenblättern unter erhöhtem Ozon durch Gallenbildung reprimiert. Dort reagierten zwei ESTs der Chloroplastenstruktur auf die Minierung mit einem vermindertem und zwei mit einem erhöhten mRNA-Spiegel. Außerdem waren durch den Lochfraß ebenfalls in den Sonnenblättern unter erhöhten Ozonbedingungen acht ESTs der Chloroplastenstruktur reprimiert, genauso wie das α -Tubulin des Zytoskeletts.

In den Sonnenblättern (1x Ozon) war eine Proteinkinase der Signaltransduktion durch Minierung reprimiert (Anhang, Tabelle 57). In den Schattenblättern wiesen zwei Kinasen ebenfalls durch Minierung einen verminderten Transkriptspiegel auf. In den Ozon-behandelten Schattenblättern waren durch Lochfraß eine Kinase reprimiert und das Ethylen-resistente Protein induziert. Darüber hinaus zeigten die minierten Sonnenblätter (2x Ozon) einen reduzierten Transkriptspiegel der ACC Oxidase. Die ACC Oxidase war genauso wie ein Alkalisationsfaktor in den Lochfraß-geschädigten Sonnenblättern reprimiert. Außerdem waren durch Lochfraß sieben mRNA-Spiegel von Kinasen reduziert und zwei erhöht.

Durch die Gallenbildung waren in beiden Ozonkonzentrationen jeweils ein Chitinase-ähnliches Protein (Krankheit/Abwehr) induziert (Anhang, Tabelle 58). Ferner zeigten unter 1x ambientem Ozon die Superoxiddismutase und ein Krankheitsresistenzprotein durch *M. fagi* verminderte mRNA-Menge. Unter 2x Ozon war die L-Ascorbatoxidase reprimiert.

Durch den Lochfraß waren in den Schattenblättern (1xOzon) drei ESTs der Abwehr/Krankheit induziert. Zudem waren die Transkriptspiegel in den Schattenblättern der Ozon-behandelten Bäume von drei ESTs der Abwehr/Krankheit reduziert. Auf die Minierung reagierten nur die Sonnenblätter (2x Ozon) mit einem reduzierten und zwei induzierten Transkriptspiegeln. Insgesamt 19 ESTs der Lochfraß-geschädigten Sonnenblätter in der erhöhten Ozonkonzentration antworteten wiederum mit einem verminderten mRNA-Spiegel.

Die Sonnenblätter antworteten unter Ozoneinfluss auf den Lochfraß mit der Reduktion verschiedener ESTs des Sekundärmetabolismus (Anhang, Tabelle 58). Durch Gallenbildung war die 4-Coumarat:Coligase und die Phenylalanin-Ammonium-Lyase induziert. In den Sonnenblättern (1x Ozon), hatte die Phenylalanin-Ammonium-Lyase in den Blättern mit Gallen einen reduzierten Transkriptspiegel.

Nur in den Lochfraß-geschädigten Sonnenblättern der Buchen unter erhöhten Ozonbedingungen zeigten fünf ESTs unklarer Einteilung einen reduzierten Transkriptspiegel (Anhang, Tabelle 59).

In den Sonnenblättern (2x Ozon) waren 12 unklassifizierte ESTs durch Lochfraß reprimiert, durch Minierung vier. In den Buchen (2x Ozon) zeigte ein unbekanntes Protein einen erhöhten mRNA-Spiegel in den minierten Schattenblättern, durch Lochfraß waren zwei Proteine reprimiert. Unter 1x ambienten Ozon waren in den minierten Schattenblättern fünf ESTs reprimiert, in den minierten Sonnenblättern nur ein EST. Durch den Lochfraß waren in den Schattenblättern zwei Transkriptspiegel erhöht, in den Sonnenblättern eines erhöht und eines reduziert.

Die Anzahl der veränderten Transkriptspiegel der unbekanntesten EST ist Tabelle 60 (Anhang) zu entnehmen.

Zusammengefasst waren die ESTs der Lochfraß geschädigten Sonnenblätter der Buchen unter 2x ambienten Ozonbedingungen durch alle Stoffwechselwege hindurch eher reprimiert.

3.9.2 Hierarchisches Cluster

Dieser Stammbaum verdeutlicht, dass die Transkriptebene der Insekten-geschädigten Bäume abhängig vom Blattpfand und der Ozonbehandlung war (Abbildung 53). Der Stammbaum des hierarchischen Clusters teilt sich in zwei Äste. Ähnliche Reaktionen auf Transkriptebene zeigten die Insekten-geschädigten Sonnenblätter (1x Ozon) und Lochfraß-geschädigte Schattenblätter (2x Ozon). Die Insekten-geschädigten Sonnenblätter der erhöhten Ozonkonzentration reagierten ähnlich wie die minierten beziehungsweise durch Lochfraß geschädigten Schattenblätter (1x Ozon) und die minierten Schattenblätter (2x Ozon). Die Sonnenblätter der zwei verschiedenen Ozonmilieus mit Galle zeigten keine enge Verwandtschaft.

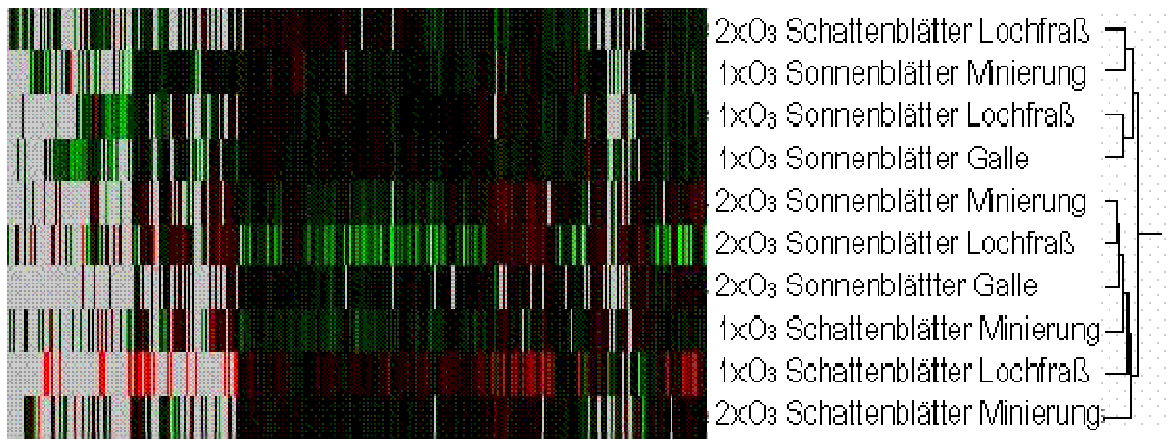


Abbildung 53: Hierarchisches Cluster der durch Insekten veränderten Transkriptspiegel aller ESTs des Buchen-Microarrays. Die etwa 60 Jahre alten Buchen (*Fagus sylvatica* L.) des Kranzberger Forstes wuchsen in unterschiedlichen Ozonkonzentrationen und sind in Sonnen- und Schattenblättern und nach den verschiedenen Schadbildern eingeteilt.

3.9.3 SOM

Einen im Vergleich stark reduzierten Transkriptspiegel der nach der SOM6 (Abbildung 54) verlaufenden ESTs (Tabelle 52) haben vor allem die Lochfraß-geschädigten Sonnenblätter der Buchen, die unter erhöhten Ozonkonzentrationen standen. Einen ebenfalls leicht geringeren Transkriptspiegel dieser ESTs wiesen die minierten Sonnenblätter der Buchen erhöhter Ozonkonzentration auf. Eine leicht steigende mRNA-Menge zeigten die Lochfraß-geschädigten Schattenblätter der Buchen unter ambiente Ozonkonzentration. Die ESTs, die in der SOM6 zusammengefasst sind, waren in fast allen funktionellen Klassen zu finden, mit Ausnahme der Klasse der Transporter.

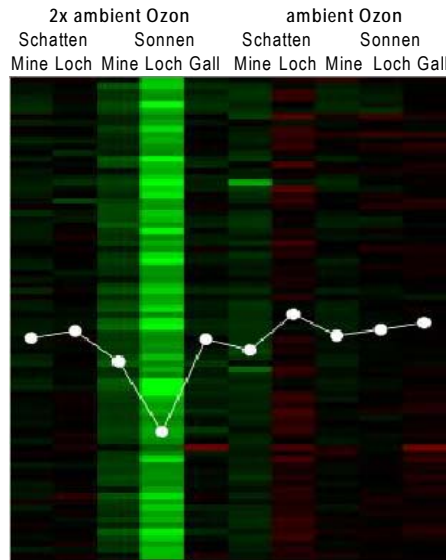


Abbildung 54: SOM6 der etwa 60 Jahre alten Buchen (*Fagus sylvatica* L.) des Kranzberger Forstes unter 1x und 2x ambivalentem Ozon, eingeteilt in Sonnen- und Schattenblättern und nach den verschiedenen Schadbildern.

Tabelle 52: ESTs die nach der SOM6 verlaufen.

Primärmetabolismus	Zellstruktur
Aminosäure	Zytoskelett
Alanine racemase family protein	Alpha-tubulin
Polyglutamine binding protein variant 4 (PQBP1 gene)	Chloroplast
Zucker und Polysaccharide	Dare PS II type I chlorophyll a/b-binding protein(lhc b1*7) b
GDP-4-keto-6-deoxy-D-mannose-3	Signaltransduktion
Glucosyltransferase-12	Sonstige
Energie	ACC oxidase b
Gluconeogenese	Kinasen
Glutaredoxin I	Nucleoside diphosphate kinase II
TCA-Zyklus	PfkB-type carbohydrate kinase family protein
Malate dehydrogenase	Protein kinase
Zellwachstum	Serine/threonine/tyrosine kinase
DNA-Synthese/ -Replikation	Abwehr/ Krankheit
Putative transposase	Stressantwort
Rekombination/ Reparatur	Amine oxidase
Putative cytochrome C oxidase proteins	Cysteine proteinase
Ty1-copia-like retrotransposon partial pol pseudogene	DNA-binding family protein
Wachstumsregulator	DNAJ heat shock protein
Auxin-regulated protein	Stress and pathogenesis-related protein
Gibberellin 20-oxidase	Entgiftung
Transkription	Glutamylcysteine synthetase
mRNA-Synthese	Glutathione S-transferase
(Suppressor-of-White-APricot)/surp domain-containing protein/ D111/G-patch domain-containing protein	Katalase a_ catalase (cat2 gene)
Transkriptionsfaktor	Lipoxygenase
Homeobox leucine zipper protein	Lipoxygenase
ZIP	Wound-inducible carboxypeptidase
Proteinsynthese	Unklare Einteilung
Ribosomales Protein	β-galactosidase = Lactase a
Ribosomal protein L24	β-galactosidase = Lactase b
Translationsfaktor	Putative permease gene
Translation initiation factor 2 beta (eIF-2beta)	Unklassifiziert
Proteinverbleib/ -lagerung - Proteolyse	Expressed protein
26S proteasome beta subunit	Expressed protein
Chloroplast Release Factor 1a	Microsatellite sequence
Chloroplast Release Factor 1b	Unknown protein
DegP protease	Sekundärmetabolismus
Dienelactone hydrolase family protein=carboxymethylenolidase	Phenylpropanoide
SKP1/ASK1-like protein (skp1)	Methyltransferase MT-A70 family protein
	Sonstige
	Chalcone reductase-like protein

Eine stark verminderte Transkriptkonzentration zeigten die Lochfraß-geschädigten Sonnenblätter unter erhöhtem Ozon im Vergleich zu den anderen Schadbildern und Behandlungen in der SOM3 (Abbildung 55). Diese ESTs repräsentierten vor allem ribosomale RNAs, aber auch verschiedene andere ESTs aus anderen funktionellen Klassen (Tabelle 53).

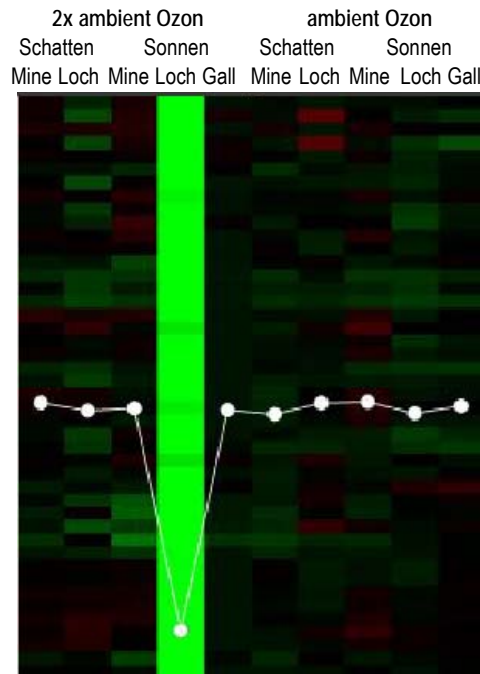


Abbildung 55: A: SOM 3 der etwa 60 Jahre alten Buchen (*Fagus sylvatica* L.) aus dem Kranzberger Forst unter 1x ambientem und 2x ambientem Ozon, eingeteilt in Sonnen- und Schattenblättern und nach den verschiedenen Schadbildern.

Tabelle 53: ESTs die nach der SOM3 verlaufen.

Primärmetabolismus - Aminosäure	Proteinsynthese - Ribosomale RNA
Polyglutamine binding protein variant 4 (PQBP1 gene)	18S ribosomal
Polyglutamine binding protein variant 4 (PQBP1 gene)	26 rRNA b
Energie - Elektronentransport	26 S ribosomal RNA
AAA ATPase	26 S rRNA
Cytochrome P450 like TBP	26S large subunit ribosomal RNA
NADP-dependent malic protein-like mRNA (b)	26S ribosomal RNA
Zellstruktur - Chloroplast	26S ribosomal RNA
Aminolevulinic acid dehydratase	26S ribosomal RNA
Abwehr/ Krankheit	26S ribosomal RNA
Entgiftung	26S ribosomal RNA
Manganese superoxide dismutase	26S ribosomal RNA
Sonstige	26S ribosomal RNA
Putative senescence-associated protein	26S ribosomal RNA
Unklassifiziert	26S ribosomal RNA
Expressed protein	26S ribosomal RNA
Hypothetical protein 3	26S rRNA c
Sekundärmetabolismus - Phenylpropanoide/ Phenole	60S ribosomal protein L37 (RPL37C)
Isoflavone reductase-related	

3.9.4 Maschinelles Lernen mit Support Vektor Maschinen (SVM)

Nachfolgend ist die Aufreihung der Transkriptspiegel der Schadbilder, Expositionen und Blatttypen der einzelnen funktionellen Klassen zu sehen. Durch die SVM wurde jede EST als Vektor dargestellt, dessen Koordinaten sich aus den \log_2 Ratios der verschiedenen Schadbilder einer Exposition zusammensetzten. Die Vektoren, deren Koordinaten alle betragsmäßig kleiner als eins waren, wurden aus der Messreihe entfernt, die anderen werden im Folgenden dargestellt.

Innerhalb der Schatten- und Sonnenblätter waren mehr \log_2 Ratios unter -1 beziehungsweise über 1 in den Ozon-behandelten Bäumen im Vergleich zu den Kontrollbäumen zu beobachten (Abbildung 57, Abbildung 56).

Bei den Lochfraß-geschädigten Sonnenblättern unter 1x ambientem Ozon war ein deutlicher Anteil an Transkriptspiegeln reprimiert, das heißt sie wiesen Werte unter -1 auf. Demgegenüber schwankten die Werte der Buchen (1x Ozon) wieder um Null (Abbildung 56).

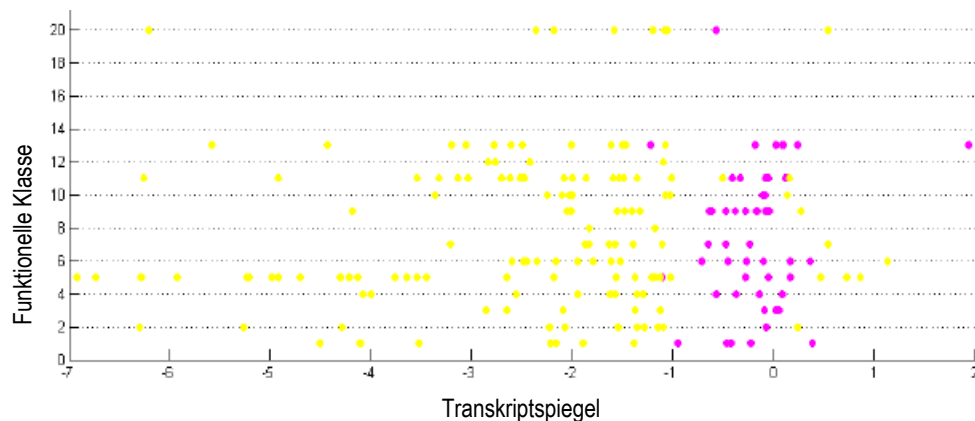


Abbildung 56: Transkriptdaten der Kranzberger Forst Buchen, Schadbild Lochfraß an Sonnenblättern (pink = 1x Ozon, gelb = 2x Ozon). Die funktionellen Klassen sind an der y-Achse aufgetragen, die Transkriptspiegel (\log_2 Ratio) an der x-Achse.

Die Aufreihung der funktionellen Klassen in den durch Lochfraß geschädigten Schattenblättern der Kranzberger Forst Buchen ergab für die Buchen (1x Ozon) ein recht einheitliches Bild (Abbildung 57). Die zugehörigen \log_2 Ratios lagen in Großen und Ganzen um Null, wohingegen die mRNA-Spiegel der Buchen (2x Ozon) sehr schwankten und eher Geninduktionen zeigten. Auch in den minierten Schattenblättern der Buchen unter 1x ambienten Ozonbedingungen lagen die Transkriptspiegel um null. Die mRNA-Menge der Buchen unter 2x Ozon streuten zwischen -1,8 und 1,2.

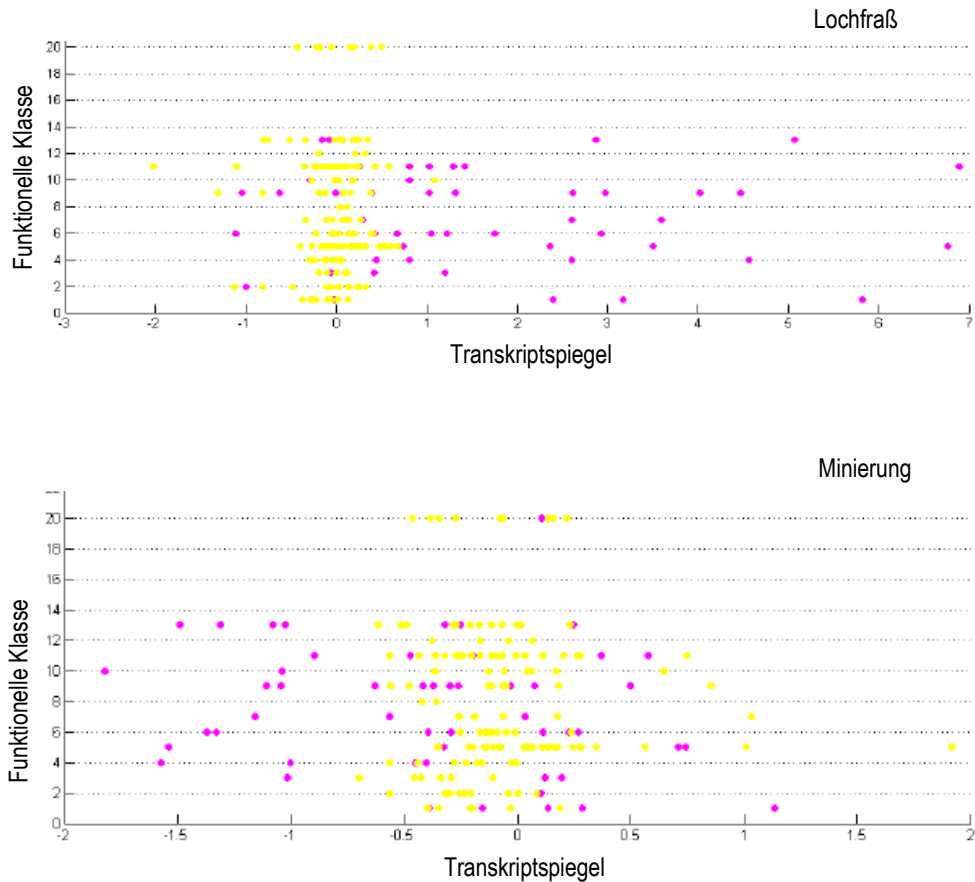


Abbildung 57: Transkriptdaten der Kranzberger Forst Buchen, Schadbild Lochfraß und Minierung an Schattenblättern (pink = 1x Ozon, gelb = 2x Ozon). Die funktionellen Klassen sind an der y-Achse aufgetragen, die Transkriptspiegel (\log_2 Ratio) an der x-Achse.

Auch hier wurden in den Sonnenblättern mehr ESTs, die betragsmäßig größer 1 und durch die jeweiligen Schadbilder verändert waren, im Vergleich zu den Schattenblättern gefunden.

Durch Lochfraß zeigten die Schattenblätter der Buchen unter ambienten Bedingungen im Gegensatz zu den Sonnenblättern eher erhöhte Transkriptspiegel (Abbildung 58). Die \log_2 Ratios der Sonnenblätter lagen eher um Null. Der Vergleich von minierten Schatten- und Sonnenblättern (1x Ozon) ergab wiederum in den Sonnenblättern \log_2 Ratios um Null, wohingegen die Werte der Schattenblätter zwischen -2 und 2 streuten.

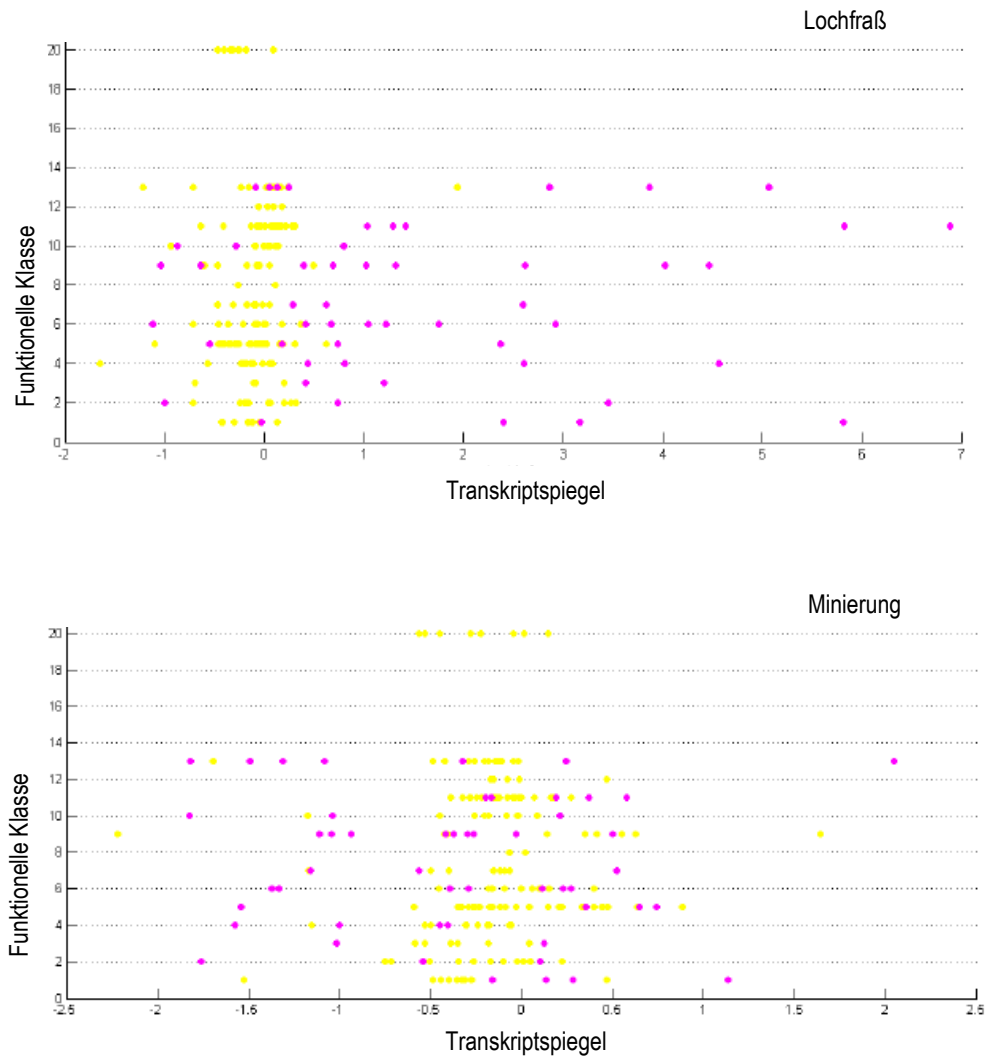


Abbildung 58: Transkriptdaten der Kranzberger Forst Buchen unter ambienten Bedingungen, Schadbilder Minierung und Lochfraß (gelb = Sonnenblätter, pink = Schattenblätter). Die funktionellen Klassen sind an der y-Achse aufgetragen, die Transkriptspiegel (\log_2 Ratio) auf der x-Achse.

Die Lochfraß-geschädigten Sonnenblätter (2x Ozon) zeigten vermehrt reprimierte Transkriptspiegel. Die \log_2 Ratios der Schattenblätter schwankten um Null.

Auch die minierten Sonnenblätter wiesen im Vergleich zu den Schattenblättern verminderte mRNA-Spiegel auf, wobei die Tendenz nicht so deutlich ausfiel wie bei dem Lochfraß geschädigten Blättern (Abbildung 59).

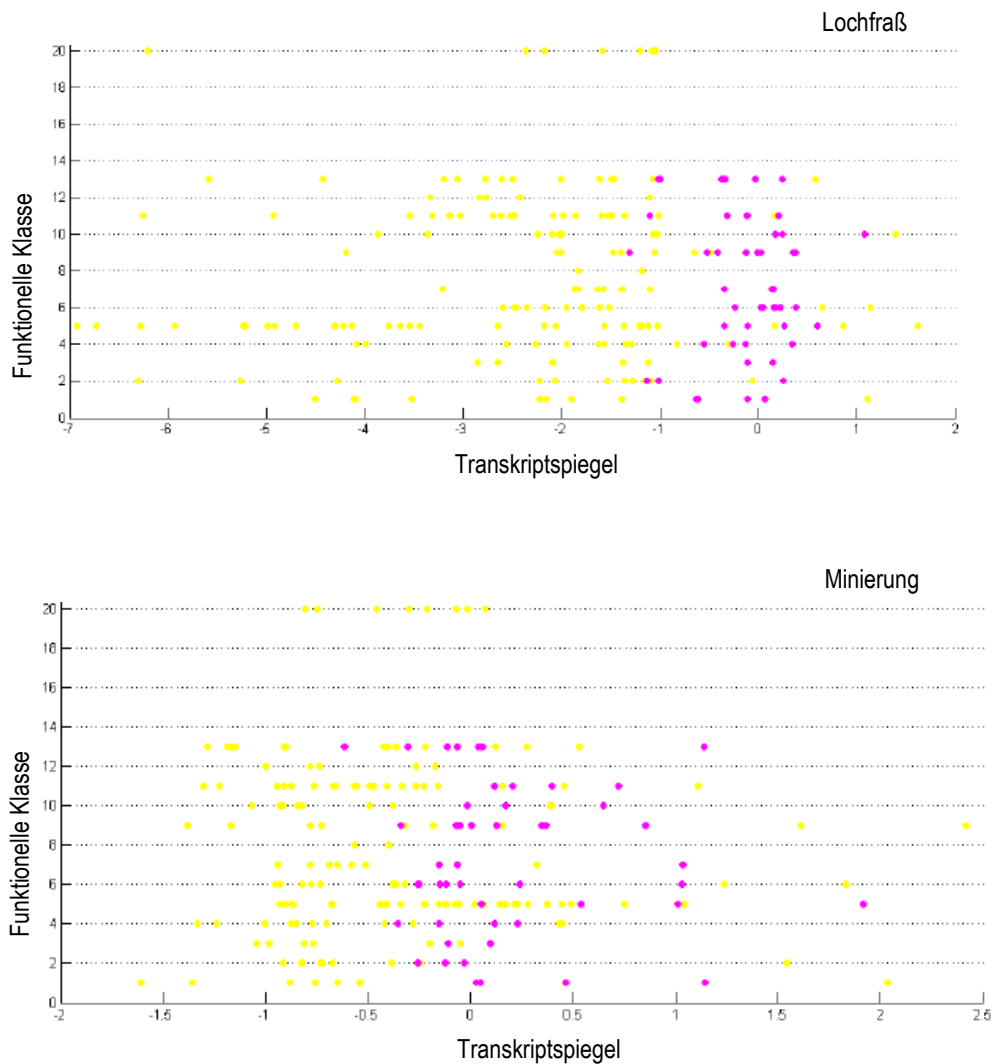


Abbildung 59: Transkriptdaten der Kranzberger Forst Buchen unter 2x ambienten Ozonbedingungen, Schadbild Minierung (gelb = Sonnenblätter, pink = Schattenblätter). Die funktionellen Klassen sind an der y-Achse aufgetragen, die Transkriptspiegel ($\log_2\text{Ratio}$) auf der x-Achse.

Vorhersage der Ozonbehandlung mit SVM

Unter Punkt (3.9.1) wurde schon beobachtet, dass die Transkriptspiegel der durch Lochfraß geschädigten Sonnenblättern unter 2x ambientem Ozon deutlich verschieden von den anderen Behandlungsvarianten waren. Bestätigt wurde dies weiterhin durch die Aufreihung der $\log_2\text{Ratios}$ nach den funktionellen Gruppen. Somit war es nicht verwunderlich, dass die SVM entsprechende Datenpunkte hervorragend trennen konnten (Abbildung 60).

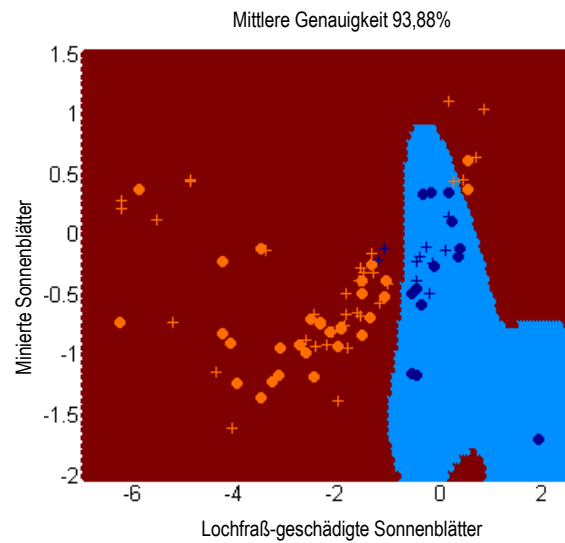


Abbildung 60: Durch SVM generierte Trennbilder bezüglich Ozonexposition (blau = 1x Ozon, orange = 2x Ozon), Schadbilder (Lochfraß, Gallenbildung, Minierung) und Blatttypen (Schatten- und Sonnenblätter). Nur ESTs ohne nur nullnahe Werte.

Um zu erkennen, welche Schadbild/Blatttyp-Kombinationen eine gute Trennung bezüglich Ozon erzielte, wurde das Maschinelle Lernen ohne die Messreihe der Lochfraß-geschädigten Sonnenblätter durchgeführt. Die beste Trefferquote von 83% bei der Vorhersage der Ozonbehandlung wurde durch die drei Komponenten „minierete Sonnenblätter“, „Lochfraß-geschädigte Schattenblätter“ und „minierete Schattenblätter“ erreicht (Abbildung 61). Mit den ersten beiden dieser Komponenten wurde bereits eine Trefferquote von 80% erzielt (Abbildung 62).

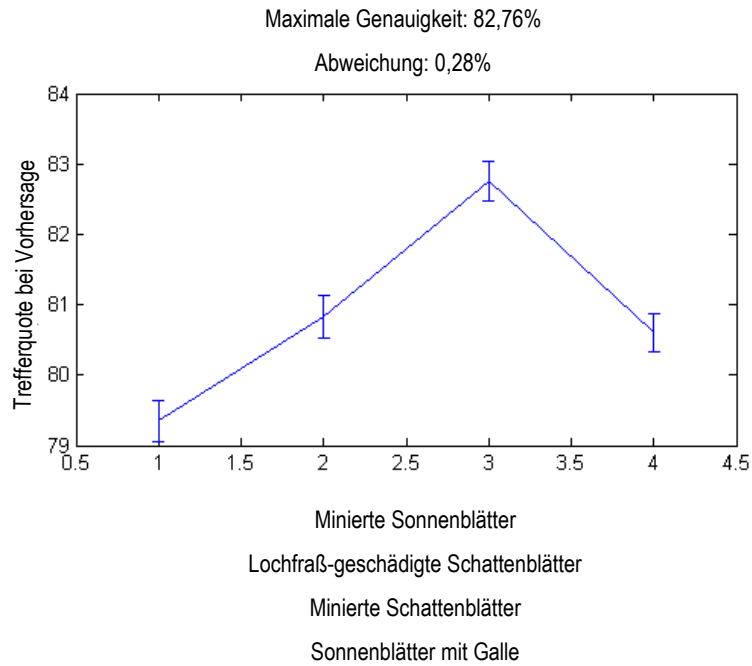


Abbildung 61: Vorhersage der Trefferquote durch die Trennung bezüglich Ozonexposition durch die einzelnen Schadbilder und Blatttypen.

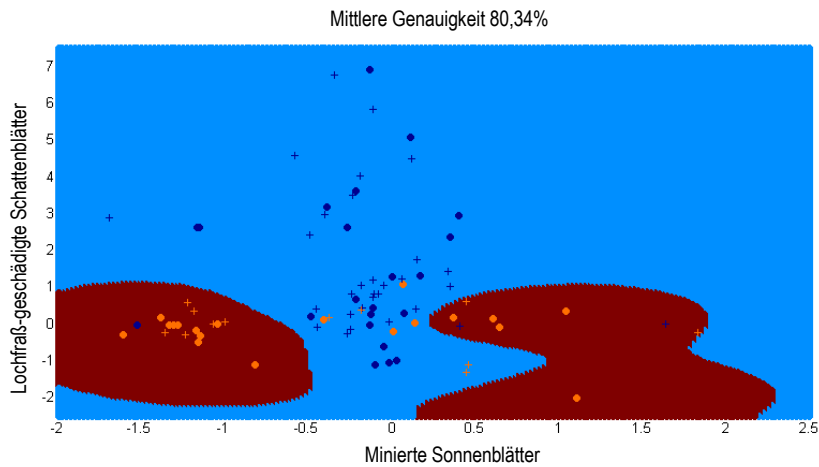


Abbildung 62: Durch SVM generierte Trennbilder bezüglich Ozonexposition (blau = 1x Ozon und orange = 2x Ozon), Schadbilder (Lochfraß, Minierung) und Blatttypen (Schatten- und Sonnenblätter).

4 DISKUSSION

4.1 Buchen cDNA-Microarray - frühe und späte SSH-Bank

Die subtraktive suppressive Hybridisierung (SSH) wurde genutzt, um frühe und späte auf Ozon reagierende ESTs der Europäischen Buche zu isolieren. Nach der Datenbankanalyse war für insgesamt 567 ESTs bislang keine funktionellen Zuordnungen möglich. Allerdings könnte die Identifizierung dieser Gene weitere wichtige Informationen über die Reaktion sommergrüner Bäume auf Ozon liefern.

ESTs der Abwehr/Krankheit waren mit 9% (früh) und 12% (spät) vertreten, dieses spricht für eine schnelle Reaktion der Bäume auf die Ozonbehandlung, wie es auch bei krautigen Pflanzen zu sehen war (SANDERMANN et al., 1998).

In der frühen SSH-Bank reagierten vermehrt Gene der Proteinsynthese (18%), der Zellstruktur (15%) und der Transkription (6%) auf die Ozonexposition. Im Vergleich dazu war jeweils nur noch ein Drittel dieser funktionellen Gruppen in der späten SSH-Bank repräsentiert. Das bedeutet, dass die Buchen durch die Ozonbehandlung zu den frühen Probennahmezeitpunkten die Transkription und somit die Proteinsynthese steigerten. Ferner war ein hoher Anteil an ESTs der Zellstruktur verändert, was auf den Ausbau des mechanischen Schutzes und des Photosyntheseapparates hinweist. Die Folge daraus wäre die vermehrte Ressourcengewinnung für die Bildung von Sekundärmetaboliten. Diese Erkenntnis konnte durch den 20%-igen Anteil von ESTs des Sekundärmetabolismus untermauert werden. Bezüglich des Sekundärmetabolismus wurden die größten Unterschiede zwischen der frühen und späten SSH-Bank beobachtet, da nur 3% der früh reagierenden ESTs zur Klasse des Sekundärstoffwechsels gehörten (OLBRICH et al., 2005).

4.2 Microarray versus qRT-PCR

Die qRT-PCR-Methode ist eine sehr sensible Messmethode und diente hier zur Verifizierung der Microarrayergebnisse. Die durch den Microarray ermittelten Daten konnten mit Hilfe der qRT-PCR in allen Versuchen weitestgehend bestätigt werden.

Zum Teil wichen die Transkriptspiegel der qRT-PCR und des Microarrays allerdings voneinander ab. Da die Versuchsbuchen genetisch unterschiedlich ausgestattet waren, reagierten sie auch unterschiedlich auf Stress. Aus diesem Grund war es möglich, dass die Transkriptmenge von Baum zu Baum erheblich variierte. Dadurch waren nur bedingt Signifikanzen bei den teils geringen Stichprobenumfängen ($n < 6$) mittels qRT-PCR zu ermitteln (Klimakammerversuche und der Ozonversuch des Kranzberger Forstes).

Andererseits war von einzelnen Bäumen das Probenmaterial stark begrenzt, so dass in der qRT-PCR andere Baumpaare verglichen wurden als auf dem Microarray. Dieses führte zu unterschiedlichen \log_2 Ratios, wie im Falle der Gewächshaus- und der Kranzberger Forst Buchen (Ozonversuch). Im Klimakammerversuch mit *Phytophthora*-Einfluss umfasste die Stichprobenanzahl in der qRT-PCR $n=6$ und im Microarray $n=4$, wobei je Microarray vier Proben gepoolt waren. Somit kann es sein, dass sich einige Transkriptspiegel wegen der hohen genetischen Varianz einzelner Bäume zwischen Microarray und qRT-PCR unterschieden.

4.3 Klimakammerversuch - CO₂-Einfluss

Um die Einflussnahme von CO₂ auf die Transkriptebene zu klären, wurden die dreijährigen Buchen des Klimakammerversuches zu den Zeitpunkten 24 Stunden und 16 Tage nach der *P. citricola* -Infektion auf ihre Reaktion hinsichtlich der erhöhten CO₂-Konzentration (680 ppm) untersucht.

4.3.1 Transkriptspiegeländerungen

Erhöhte CO₂-Exposition beeinflusste die Transkriptebene von Pappeln. Dabei spielte das Blattentwicklungsalters eine deutliche Rolle (TAYLOR et al., 2005). So zeigten junge Blätter tendenziell eine Erhöhung und ältere Blätter eine Reduktion der mRNA-Menge (TAYLOR et al., 2005). Dieses bestätigte sich auch für die Buchen in diesem Versuch, 14 ESTs waren in den jungen Blättern induziert und neun reprimiert, in den drei Wochen älteren Blättern waren hingegen nur fünf ESTs induziert und acht reprimiert.

Wie auch in Versuchen mit Pappeln beobachtet wurde (TAYLOR et al., 2005), reagierten insgesamt wenige Transkriptspiegel auf die erhöhte CO₂-Exposition. Vorwiegend waren die veränderten Transkriptspiegel der Pappeln nach Behandlung mit erhöhtem CO₂ innerhalb des Grundstoffwechsels zu finden (DRUART et al., 2006). Diese Erkenntnis wurde ebenso in den dreijährigen Buchen unter 2x ambientem CO₂ gewonnen. So war nach 24 Stunden der mRNA-Spiegel eines Kofaktors des Primärmetabolismus erhöht. Ferner zeigte ein EST des Elektronentransportes nach 24 Stunden, die Glykosidhydrolase der Familie 1 und ein Wachstumsfaktor nach 16 Tagen einen reduzierten Transkriptspiegel.

Zudem scheint durch die Exposition von 2x ambientem CO₂ der "Proteinturnover" gesteigert zu sein, da nach 24 Stunden zwei und nach 16 Tagen eine ribosomale RNA erhöhte Transkriptspiegel aufwies. Zwei Transporter des ABC-Typs waren nach 24 Stunden reprimiert, die Messung mittels qRT-PCR ergab allerdings für den BAT Transporter eine Transkriptakkumulation.

Erhöhtes CO₂ stimuliert die Carboxylierung durch die Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (Rubisco). Daraus resultiert eine höhere Photosyntheserate, mehr Kohlenhydratproduktion und höheres Wachstum (STITT, 1991). Verschiedene Studien berichten über eine gesteigerte Photosyntheseaktivität nach erhöhter CO₂-Exposition (EL KOHEN et al., 1993; POORTER und NAVAS, 2003; BRAGA et al., 2006). Die Proteinebene des Rubisco-aktivierenden Proteins (LI und CAMPBELL, 1996; CAMPBELL, 1997) und der Rubisco (CAMPBELL, 1997; CHENG et al., 1998) war durch erhöhtes CO₂ sowohl beeinflusst, als auch unverändert. Junge Pappelblätter akkumulierten Rubisco-Transkripte nach erhöhter CO₂-Exposition (TAYLOR et al., 2005). Verminderte Transkriptspiegel der Rubisco beziehungsweise ihrer Untereinheiten wurden an *Populus x euramericana* (alte Blätter) (TAYLOR et al., 2005), *Populus tremuloides* (GUPTA et al., 2005) und *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Ökotyp Columbia (CHENG et al., 1998) beobachtet. ESTs der Photosynthese blieben in den dreijährigen Buchen durch 2x ambiente CO₂-Konzentration unverändert, allerdings wiesen drei ESTs der Chloroplastenzellstruktur erhöhte Transkriptspiegel auf. Da die Buchen über drei Vegetationsperioden unter erhöhtem CO₂ standen, ist es möglich, dass sie sich an das Umgebungs-CO₂ akklimatisierten. Kastanien gewöhnten sich beispielsweise innerhalb eines Jahres an erhöhte CO₂-Konzentrationen (EL KOHEN et al., 1993). Weiterhin hat der Kohlenhydratstatus der Pflanze einen hohen Einfluss auf die mRNA-Menge (TAYLOR et al., 2005).

ESTs der Signaltransduktion waren sowohl nach 24 Stunden (ACC Oxidase 1a) als auch nach 16 Tagen (Wand-assoziierte Kinase) reprimiert. Dieser Sachverhalt wurde in *P. tremuloides* bestätigt (GUPTA et al., 2005). Zwei ESTs der Abwehr/Krankheit zeigten nach 16 Tagen einen erhöhten Transkriptspiegel. Das putative durch Trockenheit-induzierte Protein war reprimiert. Interessanterweise waren nach 16 Tagen zwei ESTs des Sekundärmetabolismus durch erhöhtes CO₂ reprimiert, wohingegen in *Populus deltoides* und *P. tremuloides* Gene des Sekundärmetabolismus einen erhöhten Transkriptspiegel aufwiesen (GUPTA et al., 2005; DRUART et al., 2006).

4.3.2 Strukturelle Inhaltsstoffe

Es wäre zu erwarten, dass dem Baum durch erhöhtes CO₂ mehr Ressourcen für die Bildung von Zellwandbestandteilen zu Verfügung stehen. Da die Buchen 24 Stunden nach der *P. citricola* Infektion annähernd gleiche Ausgangsgehalte aufwiesen, war es erstaunlich, dass drei Wochen später die Variante 1x ambient CO₂ den höheren Ligninanteil besaß. Pflanzen reagieren bezüglich des Ligningehaltes unterschiedlich auf erhöhte CO₂-Konzentrationen. STAUDT et al.

(2001) stellten erhöhte, BLASCHKE et al. (2002) und OKSANEN et al. (2005) hingegen reduzierte Ligninkonzentrationen nach erhöhtem CO₂ fest.

Mikroskopische Untersuchungen ergaben keine signifikanten Veränderungen bezüglich der Zellwandgehalte von CO₂-behandelten Espenklonen und Birken (OKSANEN et al., 2001). Für die Ausgangsgehalte wurde dieser Umstand bestätigt, nach 16 Tagen allerdings stieg der prozentuale Zellwandgehalt vom Trockengewicht tendenziell in der 2x ambienten CO₂-Atmosphäre an, wohingegen er unter ambienten Bedingungen gleich blieb.

Der prozentuale Zellulosegehalt nahm über den Versuchsverlauf in beiden CO₂-Behandlungen signifikant ab. Allerdings waren wie auch bei POORTER et al. (1997), keine Zellulosegehaltsunterschiede zwischen den verschiedenen CO₂-Stufen zu sehen. In anderen Studien waren die Gehalte an Zellulose durch CO₂ erhöht (STAUDT et al., 2001) und reduziert (OKSANEN et al., 2005).

4.4 Klimakammerversuch – Einfluss *Phytophthora citricola*

Ziel dieses Versuches war es, anhand der Transkriptebene zum besseren Verständnis von veränderten Wirt-Pathogen Beziehungen unter Einfluss von erhöhtem CO₂ beizutragen.

4.4.1 Änderung der Transkriptspiegel

Abwehrreaktionen werden auf verschiedenen Ebenen induziert. Zum einen in der Zelle im unmittelbaren Kontakt mit dem eindringenden Pathogen, zum zweiten in einer, die Eintrittsstelle des Pilzes umrundenden Region und zum dritten in der gesamten Pflanze (KOMBRINK und SOMSSICH, 1995; SCHMELZER et al., 1995). Da es sich bei *P. citricola* um ein Wurzelpathogen handelt, befindet sich die lokale Eintrittsstelle und folglich auch die lokale Abwehrreaktion in den Wurzeln. Die hier untersuchten Blattproben spiegeln deshalb einen Teil der systemisch induzierten Reaktion auf den Gesamtpflanzenspiegel wieder.

Ein deutlicher Einfluss der *P. citricola* Infektion war innerhalb des Proteinstoffwechsels in den Klimakammerbuchen zu sehen. So akkumulierten die Buchen unter ambienten Bedingungen bis zum zweiten Tag Transkripte des Aminosäurestoffwechsels und der Proteinsynthese. Ab dem dritten Tag hingegen waren reduzierte mRNA-Spiegel von ESTs des Aminosäurestoffwechsels, der Proteinsynthese, des Proteinverbleibs und der Proteinlagerung zu sehen. Darunter auch das Ubiquitin-konjugierende Enzymfamilienprotein der Proteolyse, das nach sechs Tagen reprimiert war. Nach Infektion von Kartoffeln mit *Phytophthora infestans* hingegen war eine Akkumulation von Ubiquitin mRNA zu sehen, welche in Beziehung zur Abwehrreaktionen gesetzt wurde (BASSO

et al., 1996). Zu diesen Ergebnissen passen die erhöhten Transkriptspiegel zwei und drei Tage nach der Infektion von drei BAT1 Transportern, die ab dem vierten Tag wie zu erwarten, einen verminderten mRNA-Spiegel zeigten.

Des Weiteren waren in der erhöhten CO₂-Atmosphäre die Transkripte von ESTs des Aminosäurestoffwechsels, der Proteinsynthese, des Proteinverbleibs und der Proteinlagerung insgesamt reduziert. Ausnahme bildete der zweite Tag nach der Infektion, dort war eine deutliche Induktion von ESTs des Aminosäurestoffwechsel und der Proteinsynthese zu beobachten. Diese Ergebnisse korrelieren mit den ebenfalls nach zwei Tagen erhöhten Transkriptspiegeln des BAT1 Transporters, der auch nach sechs Tagen induziert war. Zu den übrigen Probennahmetermeninen zeigte der BAT1 Transporter ebenfalls reduzierte mRNA-Menge, nach 11 Tagen waren die Transkriptkonzentrationen sowohl induziert als auch reprimiert.

Da das Pathogen die Wurzel infiziert, wo bekanntlich die N-Aufnahme stattfindet und darüberhinaus die Transportbahnen Xylem und Phloem zerstört, könnten die reduzierten Transkriptspiegel des Proteinstoffwechsels auf eine Störung in der N-Aufnahme sowie auf einen reduzierten N-Transport hinweisen. So beobachteten FLEISCHMANN et al. (2004) nach Infektion von Buchen mit *P. citricola* einen geringeren N-Gehalt in den Blättern der infizierten Buchen als in den gesunden Buchen.

Neben der Aminosäuresynthese reagierten die Buchen innerhalb des Primärstoffwechsels unter den verschiedenen CO₂-Expositionen unterschiedlich auf die *P. citricola*-Infektion. Der Kofaktor Thiazol, ein Vorläufer des Thiamin (Vitamin B1), das ebenso eine Rolle im Calvin- und Zitratzyklus spielt, war nach 24 Stunden im 2x ambienten CO₂-Niveau induziert. Eine verminderte mRNA-Menge zeigte im Gegensatz dazu ein Kofaktor im ambienten Milieu nach sechs und 11 Tagen.

Auch bezüglich der Lipide/Sterole zeigte die Acetyl Co-A Acetyltransferase nach drei Tagen einen erhöhten mRNA-Spiegel in den Buchen unter 1x CO₂, wohingegen unter 2x ambientem CO₂ ein verringerter mRNA-Gehalt der Amidase zu beobachten war.

ESTs des Zucker-/Polysaccharidmetabolismus blieben in ambienter CO₂-Konzentration unverändert. Dagegen war die Phosphoglyceromutase, die die Herstellung eines Substrates katalysiert, welches in den Calvin-Zyklus gelangt, nach 41 Stunden reprimiert. Ein Hinweis auf eine Abwehrreaktion könnte die Induktion der Glykosidhydrolase der Familie 1 nach sechs Tagen darstellen. Sie dient zur Abspaltung von Glykosiden, die innerhalb der Pflanze an Abwehrsubstanzen sowie antioxidative Stoffe gebunden sind.

Hinsichtlich des Energiestoffwechsels deuten die erhöhten Transkriptspiegel der Chloroplasten-ribulose-5-Phosphat 3-Epimerase nach 24 Stunden und der Glycerinaldehyd 3-Phosphatdehydrogenase (GAPDH) nach 41 Stunden in den Buchen unter 1x ambient CO₂ auf eine gesteigerte CO₂-Fixierung durch die Infektion mit *P. citricola* hin. Allerdings wurde generell in Pflanzen eine Reduktion der CO₂-Fixierung nach Pilzinfektionen beobachtet (ELSTNER et al., 2002). Das bestätigte sich hier ab dem vierten Tag nach der Infektion auf Transkriptebeine durch die reduzierten mRNA-Spiegel von zwei ESTs des Calvinzyklus. Die Induktion der GAPDH, wie nach 41 Stunden in den Buchen (1x CO₂) beschrieben, wurde ebenso in *P. infestans*-infizierten Kartoffeln festgestellt (LAXALT et al., 1996; BELIGNI et al., 1999). Die Transkriptspiegel in der inkompatiblen Wirt-Pathogen-Beziehung stiegen schon 24 Stunden nach der Infektion, in der kompatiblen Wirt-Pathogen-Beziehung hingegen waren diese erst nach zwei Tagen erhöht (BELIGNI et al., 1999).

Das Thioredoxin beeinflusst je nach Beschaffenheit Enzyme des Calvinzyklus, die ATP-Synthase oder Enzyme des Zitronensäurezyklus. Alle Enzyme des Calvin- und des Zitronensäurezyklus wiesen wie auch das Thioredoxin ab dem vierten Tag verminderte Transkriptspiegel in der ambienten CO₂-Konzentration auf. Ferner war in den Buchen (1x CO₂) das Glutaredoxin der Gluconeogenese, in welcher Glucose aus organischen Molekülen synthetisiert wird, nach vier Tagen in den Pflanzen unter ambienten Bedingungen durch die *P. citricola* Infektion reprimiert. Weitere reduzierte Transkriptspiegel zweier Enzyme des Zitronensäurezyklus sowie zweier ATPasen — eine ATPase der Plasmamembran wies ein erhöhtes Transkriptspiegel auf — und der Oxidoreduktase des Elektronentransportes lassen auf eine verminderte respiratorische Aktivität in den Buchen unter ambienten Bedingungen ab dem vierten Tag schließen.

Zusätzlich könnten die erhöhten Transkriptspiegel einer ATPase und eines Cytochrom P450 ähnlichen Proteins nach 21 Stunden beziehungsweise zwei Tagen eine erhöhte respiratorische Aktivität in den Buchen unter erhöhtem CO₂ bedeuten wie sie nach pilzlichen Infektionen beschrieben wird (ELSTNER et al., 2002). Allerdings zeigte 41 Stunden nach der Infektion die γ -Untereinheit der ATP-Synthase einen verringerten Transkriptspiegel.

Nach Pilzinfektion findet eine Neusynthese von Proteinen, unter anderem der Cytochromoxidase statt (ELSTNER et al., 2002). Dieser Umstand wurde in den Buchen (1x CO₂) bis zwei Tage nach der Infektion mit *P. citricola* bestätigt. Allerdings waren ab dem dritten Tag in diesen Buchen nur noch verminderte Transkriptspiegel von ESTs Zellwachstum/-teilung insbesondere der DNA-

Synthese und Replikation, der Rekombination und Reparatur sowie eines Wachstumsfaktors beziehungsweise eines Enzyms der Abscisinsäuresynthese zu sehen. Die reduzierten Transkriptspiegel von ESTs der Transkription unter denselben Bedingungen untermauern diesen Befund.

In den Buchen unter erhöhten CO₂-Bedingungen reagierten nur zwei ESTs des Zellwachstums und der Zellteilung auf die Infektion mit *P. citricola*, wobei die Cytochromoxidase sowie drei ESTs der mRNA-Synthese und die Histondeacetylase nach 16 Tagen einen erhöhten Transkriptspiegel aufwiesen. Diese Erkenntnis würde eine Neusynthese von Proteinen nach 16 Tagen vermuten lassen. Der Transkriptionsfaktor ZIP, der mit pflanzlicher Stressantwort in Verbindung steht (SINGH et al., 2002), wies im erhöhten CO₂-Level 24 Stunden nach der Infektion eine erhöhte mRNA-Menge auf.

FLEISCHMANN et al. (2004) berichteten über einen geringen Phosphatgehalt in infizierten Buchen. Auf einen reduzierten Phosphattransport lassen die verringerten Transkriptspiegel der Ionen-transporter, insbesondere Phosphattransporter nach vier und sechs Tagen im ambienten Milieu und nach drei und vier Tagen im erhöhten CO₂-Milieu, schließen.

Durch die *P. citricola*-Infektion junger Buchen blieben die Kalzium- und Magnesiumgehalt im Blatt unverändert (FLEISCHMANN et al., 2004). Somit übte nur die durch die Infektion beeinträchtigte Stickstoffverfügung Einfluss auf die Chloroplasten beziehungsweise Chloroplastenproteine aus. In diesem Versuch würde diese Erkenntnis den Rückgang der mRNA-Spiegel von ESTs der Chloroplastenzellstruktur ab dem zweiten Tag (1x CO₂) und ab dem vierten Tag (2x CO₂) erklären. Deutlich induziert waren die ESTs der Chloroplastenzellstruktur in der ambienten CO₂-Konzentration 24 und 41 Stunden nach der Infektion.

Darüber hinaus reagieren Pflanzen auf eine Infektion unter anderem mit der Verstärkung der Zellwand durch Hydroxy-reiche Glykoproteine (JWA und WALLING, 2001). Das Hydroxyprolinreiche Glykoprotein wies allerdings in beiden CO₂-Regimen verminderte Transkriptspiegel auf, in den Buchen (1x CO₂) nach drei und 16 Tagen in den Buchen unter erhöhtem CO₂ nach vier und 16 Tagen.

Aufgrund von Infektionen werden systemische Pflanzenantworten durch Salizylsäure, Systemin, Abscisinsäure, Jasmonsäure und Ethylen übertragen (JWA und WALLING, 2001). In diesem Versuch wurde eine Veränderung des Ethylen-Stoffwechsels durch die Infektion beobachtet. Allerdings wiesen die ESTs des Ethylenstoffwechsels in den Buchensämlingen unter ambienten

Bedingungen eher reduzierte Transkriptgehalte auf. Auch die Kinasen der Signaltransduktion waren dort eher reprimiert.

Dagegen war in den Buchen der erhöhten CO₂-Atmosphäre die ACC-Oxidase 24 Stunden sowie die ACC-Synthase 16 Tage nach der Infektion induziert. Auch Kinasen wiesen allerdings erst nach 16 Tagen erhöhte Transkriptspiegel auf. Einzige Ausnahme bildete die putative Protein-tyrosinkinase mit einem reduzierten mRNA-Gehalt nach vier Tagen.

Im Fall induzierter Pflanzenabwehr wurde unter anderem die Bildung von Peroxidasen und die Akkumulation von PR-Proteinen beobachtet (FLEISCHMANN et al., 2001). So können Phytoalexine und PR-Proteine die Wachstum- und Pathogenentwicklung vermindern (JWA und WALLING, 2001). PR-Proteine, wie Chitinasen, Glucanasen sowie Peptidasen werden bei Befall synthetisiert und können die Zellwand des Pilzes auflösen (JWA und WALLING, 2001). β -1-3-Glucanase (PR-2 Protein) katalysiert die hydrolytische Spaltung von 1,3 β -D-glycosidischen Verbindungen in den β -1,3-Glucanen der Pilzzellwände. Somit lösen sie entweder direkt die Zellwände der Pilze auf oder setzen Substanzen frei, die als Elicitor Abwehrreaktionen hervorrufen (THANSEEM et al., 2005). Die β -1-3-Glucanase (PR-2 Protein) wurde in toleranter *Hevea brasiliensis* durch *Phytophthora meadi* auf einem höheren Niveau und über einen längeren Zeitraum induziert als in sensibler *H. brasiliensis* (THANSEEM et al., 2005). Auch in Tomaten wurde nach Befall mit *P. infestans* eine Akkumulation von β -1-3-Glucanase und PR-1a beobachtet (JWA und WALLING, 2001). In diesem Versuch wurden nur im erhöhten CO₂-Milieu Induktionen von Stress- und Pathogen-verwandten Proteinen nach sechs Tagen festgestellt.

Allerdings war in den Buchen unter ambienten Bedingungen ein Chitinase-ähnliches Protein nach 41 Stunden sowie in den Buchen unter erhöhtem CO₂ nach drei Tagen induziert. Ebenfalls induziert waren eine Chitinase und eine saure Chitinase in Tomaten nach *P. infestans* Infektion (JWA und WALLING, 2001).

In der normalen CO₂-Atmosphäre zeigten die Peroxidase nach drei Tagen und die Glutathionperoxidase nach 16 Tagen einen erhöhten Transkriptspiegel, was auf induzierte Pflanzenabwehr hindeuten könnte.

Während der induzierten Abwehr werden unter anderem Phytoalexine, Ligninkombinationen und Phenylalanin gebildet (FLEISCHMANN et al., 2001). Auf eine Aktivierung des Sekundärstoffwechsels wiesen die Induktion der Zimtsäure 4-Hydroxylase nach 41 Stunden und der Shikimatkinase nach vier Tagen in den Buchen unter ambienten Bedingungen hin. Auf eine

frühere Infektion der Buchen unter erhöhter CO₂-Konzentration deutet die Induktion der Phenylalanin-Ammonium-Lyase bereits 24 Stunden nach der Infektion hin. Unter denselben Bedingungen zeigten die Zimtsäure 4-Hydroxylase und die Flavanon-3-hydroxylase nach drei Tagen einen Anstieg ihres mRNA-Spiegels. Überwiegend wiesen allerdings die ESTs des Sekundärstoffwechsels in beiden CO₂-Niveaus verminderte mRNA-Mengen auf.

Mittels der SVM trug insgesamt der vierte Tag nach der *P. citricola*-Infektion nicht zur Vorhersage bei, unter welcher CO₂-Konzentration die Buchen standen. Wichtig für diese Aussage waren immer die Zeitpunkte nach 41 Stunden und sechs Tagen. Um eine gute Trennung zu erreichen, mussten wenigstens vier Zeitpunkte berücksichtigt werden, was darauf hinweist, dass die molekulare Reaktion bezüglich der CO₂-Konzentrationen und der *P. citricola* Infektion nicht so eindeutig ausfiel.

4.4.2 Zusammenfassende Diskussion - Klimakammerversuch

Durch Exposition mit erhöhtem CO₂ zeigten die jüngeren Blätter erhöhte Transkriptspiegel im Bereich des Grundstoffwechsels, wohingegen nach 16 Tagen vermehrt ESTs der Signaltransduktion, des Sekundärmetabolismus sowie Abwehr/Krankheit verwandte ESTs verändert waren. Da viele Faktoren, welche zum Primär- und Sekundärstoffwechsel gehören, eventuell über dieselben Signaltransduktionswege reguliert werden, können diese ebenso durch abiotischen und biotischen Stress induziert sein (LAXALT et al., 1996).

Im Falle der pilzlichen Infektion werden Proteine synthetisiert, die mit dem Primärmetabolismus in Zusammenhang stehen (ELSTNER et al., 2002). Bis zu zwei Tage nach der Infektion mit *P. citricola* wurde in den Buchen unter ambienten CO₂-Bedingungen erhöhte Transkriptspiegel im Aminosäurestoffwechsel, Energiestoffwechsel, ESTs der Zellteilung, des Zellwachstums, erhöhte Aktivitäten von Aminosäuretransportern, der Proteinsynthese, der Chloroplastenzellstruktur sowie der Signaltransduktion und des Sekundärmetabolismus festgestellt. Das war auch in SOM2 und SOM9 zu sehen. Der gesteigerte Proteinstoffwechsel in den Buchen unter 1x CO₂ weist auf eine Abwehrreaktion der Buchen hin, wohingegen die Buchen unter erhöhtem CO₂ eher einen verminderten Proteinstoffwechsel aufwiesen. Somit könnten diese Buchen eventuell über eine höhere horizontale Resistenz verfügen (HIBBERD et al., 1996).

Andererseits bietet der hohe Kohlenhydratgehalt einen guten Nährboden für Pilze (BRAGA et al., 2006), folglich könnte vermehrt Pilzwachstum am Wurzelsystem statt gefunden haben. Daher war das Wurzelsystem nicht mehr in der Lage, genug Stickstoff aufzunehmen und in die Blätter zu

transportieren. Eventuell kann das erhöhte CO₂ auch die Sporulation, Verteilung und Aggressivität des pilzlichen Pathogens beeinflussen (ARNOLD und RAHE, 1976a; ARNOLD und RAHE, 1976b; CHAKRABORTY und DATTA, 2003; MITCHELL et al., 2003; RUNION, 2003). Auch JWA und WALLING (2001) berichteten, dass durch erhöhtes CO₂ in der Wurzel vermehrt Exudate gebildet werden, die den Pilz anlocken können. Des Weiteren waren die Anzahl der Feinwurzeln und deren Länge erhöht, was eine höhere Infektionsfläche für den Pilz bietet. Allerdings wurde in Tomaten unter erhöhtem CO₂ weniger Pilzmycel gefunden, so dass diese toleranter gegenüber dem Pathogen waren (JWA und WALLING, 2001).

Nach 24 Stunden wiesen die Buchen unter ambienten Bedingungen log₂Ratios um Null auf, wohingegen die Buchen unter erhöhtem CO₂ log₂Ratios von -5 bis 5 zeigten. Dies könnte für eine frühere Infektion der Buchen unter erhöhtem CO₂ sprechen. Zudem nahm die respiratorische Aktivität in den Buchen unter erhöhten CO₂ Bedingungen schon nach 24 Stunden zu. Weiterhin waren ESTs der Ethylenbiosynthese und des Sekundärmetabolismus zu frühen Probennahmezeitpunkten induziert. Allerdings waren dann die Transkriptspiegel bis zum 16. Tag in den Buchen (2x CO₂) reduziert. Erhöhte Transkriptspiegel der Transkription, der Fructose-Biphosphat Aldolase (Photosynthese), des Cytochrom C Protein (Zellwachstum/-teilung), der Phosphattransporter, der Stressantwort, von Entgiftungsenzymen, des Chitinase ähnlichen Proteins, von Kinasen, der ACC-Synthase, fünf unklassifizierten und sieben unbekannte ESTs waren vermehrt nach 16 Tagen in den Buchen unter erhöhten CO₂-Konzentrationen zu sehen. Deshalb wird davon ausgegangen, dass diese Buchen zwar schon früh infiziert wurden, aber sich erst spät gegen den Pilz zur Wehr setzten.

Insgesamt wiesen die Buchen unter erhöhten CO₂-Bedingungen mehr verminderte Transkriptspiegel auf als die Buchen unter ambienten Bedingungen. Dies könnte andeuten, dass die Buchen unter ambienten CO₂, bei denen sich insgesamt früher Abwehr-relevante Stoffe bildeten, resistenter gegenüber dem Pilz sind. Die Bäume unter erhöhtem CO₂ konnten eventuelle Schädigungen durch den Pilz möglicherweise im Anfangsstadium der Infektion besser kompensieren, da sie bezüglich ihres Kohlenhydrathaushaltes besser ausgestattet waren und vermehrt in die horizontale Resistenz investieren konnten.

4.5 Expositionskammerversuch - Ozoneinfluss auf Buchen in Mono- und Mischkultur

Im Mittelpunkt dieses Versuches stand die Untersuchung der biotischen Interaktion — Konkurrenz — unter kontrollierten Bedingungen an dreijährigen Buchensämlingen. Die

Konkurrenz von Nachbarindividuen hat einen erheblichen Einfluss auf die Ressourcenallokation innerhalb der Pflanze (GRAMS et al., 2002; KOZOVITS et al., 2005). Erkenntnisse über die Reaktion der Pflanze auf erhöhte Ozonexposition in einer Konkurrenzsituation wurden bisher nur an krautigen Pflanzen gewonnen (POORTER und NAVAS, 2003). Im folgenden Abschnitt wird die Bedeutung von erhöhtem Ozon auf die inter- und intraspezifische Reaktion junger Buchen auf Transkriptebene beschrieben.

4.5.1 Transkriptspiegeländerungen

Die interspezifische Konkurrenzsituation der Buchen mit Fichten hatte einen deutlichen Einfluss auf den Primärmetabolismus. Es waren mehr Transkriptspiegel durch Ozon verändert, und das schon zu frühen Probenahmezeitpunkten. So reagierten die Buchen in Mischkultur bis 48 Stunden nach dem Ozonpeak von 200 ppb mit acht veränderten ESTs des Aminosäurestoffwechsels, wohingegen die Buchen in Monokultur erst nach drei Tagen drei induzierte ESTs aufwiesen.

Die Induktion von Enzymen der frühen Tryptophanbiosynthese könnte ein Indiz für Stress darstellen, in *Arabidopsis thaliana* wurden sie als Reaktion auf Verwundung und Pathogenbefall (NIYOGI und FINK, 1992) sowie nach Ozonstress gebildet (TAMAOKI et al., 2003; TOSTI et al., 2006). So erreichte die Phosphoribosylanthranilatisomerase, die in der Tryptophanbiosynthese, die Umsetzung von N-(5-Phospho-b-D-Ribosyl)-Anthranilat in 1-(2-Carboxyphenylamino)-1-Deoxy-D-Ribulose 5-Phosphat katalysiert, in den Buchen der Mischkultur bereits 16 Stunden nach dem Ozonpeak einen erhöhten mRNA-Spiegel, in den Buchen der Monokultur allerdings erst nach drei Tagen.

In Betrachtung des Energiehaushaltes war die Kern-kodierte Chloroplastenribulose-5-Phosphat 3-Epimerase (Photosynthese) nach 48 Stunden in den Buchen der Monokultur reprimiert. In verschiedenen *A. thaliana* Kultivaren wurden sowohl verminderte als auch unbeeinflusste Transkriptspiegel einer Stroma-assoziierten putativen D-Ribulose-5-Phosphat-Epimerase gesehen (LI et al., 2006). Erst drei Tage nach dem Ozonpeak reagierten die Buchen in Reinkultur mit erhöhten mRNA-Spiegeln von je einem Gen der Glycolyse, Photosynthese und der Gluconeogenese, nämlich das Glutaredoxin I. Das Glutaredoxin war in *A. thaliana* Cvi-0 nach Ozonexposition induziert (D'HAESE et al., 2006; LI et al., 2006). Allerdings wies es in dem Ozon-sensitiven *A. thaliana* Kultivar Wassilewskija (LI et al., 2006) und im frühen Stadium nach der Ozonexposition (D'HAESE et al., 2006) genauso wie in den Buchen der Mischkultur nach 16

Stunden einen verminderten Transkriptspiegel auf. Unveränderte Glutaredoxintranskriptspiegel wurden an Reis (TSUKAMOTO et al., 2005), *Thellungiella halophila* Ökotyp Shandong und einigen *A. thaliana* Kultivaren (LI et al., 2006) festgestellt. Ein Anstieg der mRNA-Spiegel war für die Oxidoreduktase und die Plastoquinol-Plastocyaninreduktase (Elektronentransport) erst nach 48 Stunden zu registrieren. Ebenso wurde eine Induktion der Oxidoreduktase nach Ozonstress in verschiedenen *A. thaliana* Kultivaren festgestellt (MIYAZAKI et al., 2004).

Die Abscisinsäure spielt eine Rolle im Stomataschluss und steht im Zusammenhang mit Ozonstress und Signalweiterleitung über ROS. Ein Enzym der Abscisinsäuresynthese, die 9-Cis-Epoxy-Carotenoiddioxygenase 4, war nach drei Tagen in der Monokultur induziert. Dieser Sachverhalt wurde ebenso in adulten *Fagus sylvatica* L. im Juli 2003/2004 in der Sonnenkrone und im Juni 2004 in der Schattenkrone wahrgenommen (JEHNES et al., 2007). Ein Ozon-induzierbarer Transkriptionsfaktor WRKY (EULGEM et al., 2000; TOSTI et al., 2006) wies drei Tage nach Erhöhung des Ozons in den Buchen der Monokultur einen erhöhten Transkriptspiegel auf. Dieses Ergebnis wurde durch die Induktion von 14 WRKY Transkripten in *A. thaliana* Ökotyp Col-0 (TOSTI et al., 2006) und drei in der Ozon-sensitiven *A. thaliana* Wassilewskija (LI et al., 2006) bestätigt. WRKY reguliert unter anderem die Transkription von PR-Genen (EULGEM et al., 2000), dieses korreliert mit den erhöhten Expressionswerten eines PR-Gens ebenfalls am dritten Tag nach dem Ozonpeak.

Innerhalb des Proteinstoffwechsels verursachte Ozon in den Buchen in Konkurrenz mit Fichte nach 16 Stunden einen Anstieg von Transkripten eines ribosomalen Proteins. Im Vergleich mit den Buchen in Monokultur wiesen diese erst nach drei Tagen einen erhöhten Transkriptspiegel des ribosomalen Proteins S6 auf. Induziert war durch Ozonexposition von 100 ppb das mRNA-bindende ribosomale Protein S26 in *Pisum sativum* L. (BROSCHÉ und STRID, 1999). Keine Reaktion auf Ozon zeigte das ribosomale Protein L5 — ein Auxintransporterprotein — in *A. thaliana* Cvi-0, *T. halophila* Ökotyp Shandong und *A. thaliana* Wassilewskija (LI et al., 2006). Das ribosomale L1-ähnliche Protein des Chloroplasten wies im Gegensatz dazu in der Ozon-sensitiven *A. thaliana* Wassilewskija eine verminderte mRNA-Menge auf (LI et al., 2006).

Drei Tage nach der Erhöhung des Ozons stiegen die Transkripte der 26S Proteasom β -Untereinheit in der Monokultur an. Bestätigt wird dieser Umstand durch die Transkriptakkumulation der Proteasomkomponente C5 des Wildtyps *A. thaliana* Columbia (HEIDENREICH et al., 2005).

Nach drei Tagen war in der Reinkultur sowohl das SKP1/ ASK1-ähnliche Protein als auch die Arginindecarboxylase induziert, beides ESTs der Proteolyse. SANDERMANN (1996) beobachtete in Ozon-tolerantem *Nicotiana tabaccum* Bel B einen Anstieg an Putrescinkonjugaten im Apoplasten und Enzymen der Putrescimbiosynthese, so auch der Arginincarboxylase, deren Transkripte in Ozon-sensitiven und Ozon-toleranten *A. thaliana* (TAMAOKI et al., 2003) ebenfalls durch Ozon erhöht waren.

Es wurde eine Korrelation zwischen Transkripten des Aminosäurestoffwechsels und des BAT1 Transporters am 02.06.05 in den Buchen der Mischkultur festgestellt.

Das Hydroxyprolin-reiche Glykoproteinfamilienprotein war 24 Stunden nach dem Ozonpeak in den Buchen der Reinkultur induziert. Hydroxy-reiche Glykoproteine werden von Pflanzen in einer inkompatiblen Pathogen-Wirt Beziehung zur Verstärkung der Zellwand gebildet (JWA und WALLING, 2001) und könnten hier mit dem oxidativen Stress durch Ozon in Verbindung gebracht werden. In der Reinkultur stiegen die Transkripte dreier weiterer ESTs der Stressantwort durch den Ozonstress an, desgleichen die der Xyloglucanendotransglucosylase-Hydrolase XTH5. Wohingegen D'HAESE et al. (2006) in *A. thaliana* cv. Columbia verminderte Transkriptspiegel für die Xyloglucanxyloglucosyltransferase und das Xyloglucan feststellten.

Auf eine Verstärkung des Zytoskelettes wies die Akkumulation von Actin- und α -Tubulintranskripten drei Tage nach dem Ozonpeak in den Buchen der Monokultur hin. Actin war durch Ozonstress sowohl reprimiert (*Pinus sylvestris*) (ZINSER et al., 1998) als auch unbeeinflusst (*Petroselinum crispum*) (SANDERMANN, 1996). α -Tubulin hingegen war in *A. thaliana* induziert (TAMAOKI et al., 2003).

Nach drei Tagen wiesen die erhöhten Transkriptgehalte von Kinasen auf eine durch den Ozonpeak ausgelöste Signaltransduktion in den Buchen der Monokultur hin.

Nach 24 Stunden war der mRNA-Spiegel der ACC Synthase in der Mischkultur verringert. Bestätigt wurde dieser Sachverhalt durch den Ozon-sensitiven *A. thaliana* Kultivar, wobei die Ozon-toleranten *A. thaliana* Ökotypen bezüglich der ACC-Synthase keine Veränderung nach Ozonexposition zeigten (LI et al., 2006). In *Solanum tuberosum* (PELL et al., 1997; SCHLAGNHAUFER et al., 1997) und *Lycopersicon esculentum* (TUOMAINEN et al., 1997; TSUKAMOTO et al., 2005) waren die Transkriptspiegel der ACC-Synthase hingegen durch Ozon erhöht.

Durch die Akkumulation von Transkripten der ACC-Oxidase nach drei Tagen in den Buchen beider Kulturen wurde von einer Ethylen-bedingten Signalweiterleitung durch den Ozonstress

ausgegangen. Ebenfalls erhöhte Transkriptspiegel der ACC-Oxidase waren in Tomate (PELL et al., 1997; TUOMAINEN et al., 1997; MOEDER et al., 2002; TSUKAMOTO et al., 2005) und *A. thaliana* Ökotypen (LI et al., 2006) zu beobachten. Ozon-unbeeinflusst waren allerdings ein ACC-Oxidase-ähnliches Protein, eine weitere ACC-Oxidase und eine putative ACC-Oxidase ebenfalls in *A. thaliana* Ökotypen (LI et al., 2006).

Da Ozon wie ein Elicitor auf Pflanzen wirkt, war ein Transkriptanstieg von ESTs der Abwehr/Krankheit zu erwarten, wie in den Buchen der Reinkultur nach drei Tagen. Auch in verschiedenen Pflanzen wurde eine Ozon-bedingte Akkumulation von PR-Protein Transkripten festgestellt, so in Tabak (SCHRAUDNER et al., 1992; YALPANI et al., 1994; SANDERMANN et al., 1998) *A. thaliana* Ökotypen (SHARMA et al., 1996; TAMAOKI et al., 2003; VANDENABEELE et al., 2004; LI et al., 2006), Pappel (KOCH et al., 1998), Buche (JEHNE et al., 2007), Birke (PÄÄKKÖNEN et al., 1998) und Petersilie (ECKEY-KALTENBACH et al., 1994).

Ozon rief in der Ozon-sensitiven *A. thaliana* Ökotyp Wassilewskija-2 (Ws-2) einen Anstieg des Jasmonatgehaltes und eine Anhäufung der Allenoxidsynthase hervor (AONO et al., 2005). In den Buchen der Mischkultur hingegen war die Allenoxidsynthase nach 24 Stunden reprimiert. Es wurde allerdings keine Korrelation zwischen den Transkriptmengen der Allenoxidsynthase und der Lipoxygenase festgestellt, sie wies erst nach 48 Stunden reduzierte Transkriptmengen auf. Die Lipoxygenase ist ein Marker für die Ozon-vermittelte Jasmonsäuresignalübertragung (LI et al., 2006). Sie war eine Woche vor dem Ozonpeak in den Buchen der Reinkultur reprimiert und blieb durch die Erhöhung des Ozons unbeeinflusst. Dieses Ergebnis bestätigte sich ebenso in verschiedenen *A. thaliana* Ökotypen (AONO et al., 2005; LI et al., 2006). Eine Ozon-bedingte Erhöhung des Transkriptspiegels der Lipoxygenase wurde andererseits für verschiedene Pflanzen nachgewiesen: *A. thaliana* Ökotypen (TAMAOKI et al., 2003; AONO et al., 2005; HEIDENREICH et al., 2005; LI et al., 2006; TOSTI et al., 2006), *Glycine max* (MACCARRONE et al., 1992) und *Lens culinaris* (MACCARRONE et al., 1997).

Die β -Glucanase, ein PR-Protein, was pilzliche Zellwände auflösen kann, zeigte nach 24 Stunden einen reduzierten Transkriptspiegel in den Buchen der Mischkultur. Dabei war in Ozon-sensitiven Pflanzen eher mit einem Anstieg an Transkripten der β -Glucanase zu rechnen (SANDERMANN, 1996), wie beispielsweise in Tabak (ERNST et al., 1992; SCHRAUDNER et al., 1992; BAHL et al., 1994; ERNST et al., 1996).

Da Ozon einen „oxidativen burst“ auslöst, wäre eine Veränderung auf der Transkriptebene von ESTs der Stressantwort zu erwarten. In den Buchen der Konkurrenzsituation blieb diese

Erwartung allerdings unbestätigt. Die Buchen der Monokultur hingegen besaßen zwei ESTs der Stressantwort sowohl einen erhöhten als auch einen verminderten Transkriptspegel. Auch die Cysteinprotease zeigte ebenfalls erhöhte Transkriptkonzentrationen nach dem Ozonpeak, dieses findet in *A. thaliana* cv. Columbia durch zwei induzierte Cysteinproteasen und einen reprimierten Cysteinproteaseinhibitor Bestätigung (D'HAESE et al., 2006). Darüber hinaus war ein Hitzeschock Protein genauso wie in Petersilie (SANDERMANN et al., 1998) und *A. thaliana* Ökotypen (MIYAZAKI et al., 2004; D'HAESE et al., 2006) nach dem Ozonpeak induziert, wobei der Transkriptspegel eines Chloroplasten-lokalisiereten kleinen Hitzeschock Proteins in *T. halophila* und *A. thaliana* Ökotyp durch Ozon unverändert blieb (LI et al., 2006).

Der Transkriptspegel der Glutathion S-Transferase blieb durch Ozon unverändert, wohingegen sie in *A. thaliana* durch Ozon induziert war (SHARMA und DAVIS, 1994; CONKLIN und LAST, 1995; RAO und DAVIS, 1999; TAMAOKI et al., 2003; LUDWIKOW et al., 2004; AONO et al., 2005; TOSTI et al., 2006). Drei Tage nach dem Ozonpeak war eine Superoxiddismutase in den Buchen der Monokultur induziert, dieses war ebenso bei VAN CAMP et al. (1994) der Fall. Im Gegensatz dazu stellte D'HAESE et al. (2006) keine Beeinflussung der Superoxiddismutase durch Ozon fest.

Von den Wund-induzierten Proteinen war das Krankheitsresistenzprotein 16 Stunden nach dem Ozonpeak reprimiert, in *A. thaliana* Ökotyp indessen war es induziert (MIYAZAKI et al., 2004). Obendrein war die Zeaxanthinepoxidase (Abciscinsäure-Stoffwechsel) in den Buchen der Monokultur nach drei Tagen induziert, in adulten Buchen blieb sie durch Ozon unbeeinflusst (JEHNES et al., 2007).

Eine Induktion von ESTs des Sekundärmetabolismus ließ sich unter anderem drei Tage nach dem Ozonpeak in den Buchen der Reinkultur feststellen. Durch Ozonstress stiegen die Transkripte der 4-Coumarat: CoLigase in Tabak (BAHL et al., 1994), Petersilie (ECKEY-KALTENBACH et al., 1994) und *A. thaliana* Ökotyp Col-0 (LUDWIKOW et al., 2004) an, wobei sie in den Expositionskammerbuchen durch Ozon unbeeinflusst blieben. Die Ozon-induzierte Anthocyanidinsynthase (D'HAESE et al., 2006), zeigte in den Buchen der Mischkultur nach drei Tagen einen reduzierten Transkriptspegel. In Pappel (KOCH et al., 1998), *A. thaliana* (LUDWIKOW et al., 2004; TOSTI et al., 2006) und adulten Buchen (JEHNES et al., 2007) wurde jeweils ein Transkriptanstieg von OMT's durch Ozon festgestellt, desgleichen in den Buchen der Monokultur nach 24 Stunden und drei Tagen. Nach 48 Stunden traten reduzierte OMT Transkripte auf.

Die Chalkonsynthase zeigte in beiden Kulturen einen Transkriptspegelanstieg nach 16 (Mischkultur) und 24 Stunden (Monokultur) was in Versuchen mit Petersilie (ECKEY-KALTENBACH et al.,

1994) und Tabak (BAHL et al., 1994) bestätigt wurde. Im Gegensatz dazu wies sie in *A. thaliana* (LUDWIKOW et al., 2004) genauso wie die Flavanon-3-Hydroxylase (TOSTI et al., 2006) eine reduzierte mRNA-Menge auf. Ozon erhöhte im Gegenteil dazu die mRNA-Konzentration der Flavanon-3-Hydroxylase in den Buchen der Mischkultur nach 16 Stunden und in denen der Monokultur nach 24 Stunden.

Die Buchen in der Konkurrenzsituation reagierten bereits nach 16 Stunden mit einem Transkriptanstieg der Zimtsäure-4-Hydroxylase. Diese war in *A. thaliana* ebenfalls induziert (LUDWIKOW et al., 2004). Ferner nahm der Transkriptspiegel der Chorismatsynthase in den Buchen der Reinkultur erst nach 24 Stunden zu. Eine Isochorismatsynthase zeigte in *A. thaliana* Ökotyp Col-0 einen erhöhten Transkriptspiegel (TOSTI et al., 2006).

42 unbekannte, unklassifizierte ESTs, beziehungsweise ESTs unklarer Einteilung waren in den Buchen der Monokultur nach drei Tagen induziert. Induktionen unbekannter ESTs ließen sich auch in *A. thaliana* feststellen (MIYAZAKI et al., 2004; HEIDENREICH et al., 2005).

4.5.2 Zusammenfassende Diskussion - Expositionskammerversuch

Die Wirkung der Exposition mit einer hohen Ozondosis variierte stark je nach Kulturtyp (LIU et al., 2005). So reagierten die Buchen in Mono- und Mischkultur auf Transkriptebeine sehr unterschiedlich auf den Ozonpeak von 200 ppb, was gut in dem hierarchischen Cluster, in den SOMs, aber auch in den Transkriptspiegeländerungen erfasst wurde.

Eine deutliche Reaktion auf Ozon wurde nach drei Tagen in den Buchen der Monokultur beobachtet. Viele ESTs wiesen einen erhöhten Transkriptspiegel auf, verdeutlicht wurde dieser Aspekt durch SVM und MapMan. Induziert waren sowohl ein großer Anteil an mit Abwehr und Krankheit verwandter Gene als auch ESTs des Sekundärstoffwechsels, Kinasen der Signaltransduktion und ESTs der Stressantwort. Weiterhin waren ESTs induziert, die explizit mit Ozonstress in Verbindung stehen: WRKY (EULGEM et al., 2000), 9-Cis-Epoxy-Carotenoiddioxygenase, ESTs der Tryptophanbiosynthese, Arginincarboxylase (Putrescinebiosynthese) und Hydroxyprolin-reiche Glykoproteinfamilienprotein. Nach drei Tagen wurde in der SOM5 bezüglich der Monokultur die Induktion von Genen des Elektronentransportes und der Photosynthese festgestellt. In der SOM3 waren vor allem ESTs der Zellstruktur reprimiert.

Die Buchen in Konkurrenz mit Fichte reagierten kaum auf die Exposition von 200 ppb Ozon. Nur nach 16 Stunden waren ESTs des Aminosäurestoffwechsels und zwei ESTs des Sekundär-

metabolismus induziert. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Buchen durch die interspezifische Konkurrenz gegen Ozon entweder gestärkt oder so gestresst waren, dass sie nicht mehr auf das Ozon reagieren konnten.

ESTs des Aminosäurestoffwechsels waren in den Buchen der Mischkultur nach 16 Stunden induziert. Allerdings blieben die Transporter des ABC-Typs in den Buchen der Mischkultur durch die Ozonexposition unbeeinflusst. In der Reinkultur waren ESTs des Aminosäurestoffwechsels nach drei Tagen induziert, wohingegen der BAT1 Transporter nach 48 Stunden und 3 Tagen reprimiert war. Die Induktion des Enzyms der Tryptophanbiosynthese könnte ein Indiz für Stress sein. Auch das Ergebnis von LIU et al. (2005), nach dem der Proteinmetabolismus durch Ozon in den Buchen beider Kultivationsarten unbeeinflusst blieb, fand auf Transkriptebene keine Bestätigung.

Ozon setzt die interzellularen CO₂-Konzentration herab (HERBINGER et al., 2005) mit der Folge einer verminderten Photosyntheserate und eines reduzierten Kohlenhydratgewinns, welcher zu weniger Wachstum führt. GRAMS et al. (2002) fanden ein höheres Wachstum der Pflanzen in Monokultur im Vergleich zur Mischkultur. Buchen in Konkurrenz mit Fichte wurde auch in Hinblick auf das Wachstum eine höhere Empfindlichkeit gegenüber Ozon nachgesagt (KOZOVITS et al., 2005). Weil die Buchen in Monokultur keiner interspezifischen Konkurrenz ausgesetzt waren, standen ihnen vermehrt Ressourcen zur Verfügung, Schutzstoffe gegen Ozon zu bilden, was die Induktion von ESTs des Sekundärstoffwechsels und der Abwehr/Krankheit erklären würde.

4.6 Gewächshausversuch - Einfluss von CO₂ und Ozon

Die fünfjährigen Gewächshausbuchen standen drei aufeinanderfolgende Jahre während der Vegetationsperiode unter 2x ambienten Ozon- und CO₂- sowie unter ambienten Bedingungen.

Durch die CO₂-Exposition der Buchen könnte eine gesteigerte Photosynthese, ein insgesamt gesteigerter Grundstoffwechsel sowie vermehrtes Wachstum erwartet werden. TAYLOR et al. (2005) wiesen eine molekulare Reaktion von Pflanzen auf erhöhtes CO₂ nach, allerdings waren dadurch, wie auch in diesem Versuch, wenige Transkriptspiegel beeinflusst. Am 29.05.07 waren in der erhöhten CO₂-Atmosphäre sowohl acht ESTs reprimiert als auch induziert. Die durch CO₂-beeinflussten ESTs waren wie zu erwarten, innerhalb des Grundstoffwechsels zu finden, so war ein EST des Elektronentransportes reprimiert. Die Kern-kodierte Chloroplastenribulose-5-Phosphat 3-Epimerase (Photosynthese) zeigte einen erhöhten mRNA-Spiegel, wobei sie in *Populus*

tremuloides einen verminderten Transkriptspiegel nach CO₂-Behandlung aufwies (GUPTA et al., 2005).

Bezüglich des Proteinstoffwechsels waren zwei ribosomale ESTs induziert sowie eine reprimiert. Dieses korreliert mit dem erhöhten Transkriptspiegel des BAT1 Transporters. Eventuell beschleunigt die CO₂-Exposition der Pflanzen den Proteinturnover (AINSWORTH et al., 2006). Untermauert wurde dies durch die reduzierten Transkriptspiegel eines Enzyms der Proteolyse sowie eines Nitratchlorattransporter. Ein putativer Nitrattransporter war ebenfalls in *Glycine max* nach CO₂-Exposition reprimiert (AINSWORTH et al., 2006). Allerdings waren insgesamt wenige Reaktionen auf Transkriptebezuglich erhöhtem CO₂ zu verzeichnen. Vielleicht traten in den Gewächshausbuchen, gleichermaßen wie in den Klimakammerbuchen (4.3.1) eine über zwei Jahre erworbene Anpassung an die erhöhte CO₂-Atmosphäre auf.

Die Buchen in der Ozonatmosphäre zeigten vorwiegend erhöhte Transkriptspiegel, sieben ESTs gehörten zur Signaltransduktion beziehungsweise zum Sekundärmetabolismus. Das Resultat unterstützt die These, dass Ozon als abiotischer Elicitor auf Pflanzen wirkt (SANDERMANN et al., 1998; LANGEBARTELS et al., 2002).

Durch die Ozonbehandlung zeigte nur die Aldolase innerhalb des Primärstoffwechsels ein verändertes Transkriptniveau. Sie spielt eine Rolle bei der Regeneration der Rubisco. Ihr mRNA-Spiegel war durch Ozon vermindert, was auf eine verminderte Photosynthese hindeuten könnte. Denn die Rubisco kann zum einen durch Ozon gehemmt sein (PELL et al., 1997). Zum anderen setzt Ozon die interzellulären CO₂-Konzentration herab (HERBINGER et al., 2005). Aus diesem Grund steht der Rubisco weniger CO₂ als Substrat zur Verfügung, außerdem findet unter CO₂-limitierten Umständen keine Nachbildung der Rubisco mehr statt. Allerdings wies die kernkodierte Chloroplastenribulose-5-Phosphat 3-Epimerase, ebenfalls ein EST der Photosynthese, erhöhte Transkriptspiegel auf. Dieser Sachverhalt wurde ebenso in *P. tremuloides* bestätigt (GUPTA et al., 2005). Im Gegensatz dazu wies die Stroma-assoziierte putative D-Ribulose-5-Phosphat-Epimerase verminderte Transkriptspiegel auf und blieb durch Ozon sogar unbeeinflusst (LI et al., 2006).

Wie in den Buchen unter 2x ambientem CO₂ war auch in den Ozon-behandelten Buchen der Proteinstoffwechsel erhöht, so zeigten drei ESTs der Proteinsynthese sowie zwei Aminosäuretransporter erhöhte mRNA-Spiegel. Auch in *A. thaliana* wurde durch Ozon die Induktion eines putativen ABC Transporters nachgewiesen (HEIDENREICH et al., 2005).

Vier ESTs der Signaltransduktion waren durch Ozon induziert, wie auch die Wund-induzierte Proteinkinase. Bestätigt wurde dieser Sachverhalt in Pappeln (KOCH et al., 1998; GUPTA et al., 2005). Weiterhin zeigten drei ESTs des Ethylenstoffwechsels erhöhte mRNA-Gehalte, was für eine Ethylen-vermittelte Signaltransduktion spricht. In weiteren Studien wiesen ESTs des Ethylen-Stoffwechsels teils erhöhte (PELL et al., 1997; TUOMAINEN et al., 1997; MOEDER et al., 2002; GUPTA et al., 2005; TSUKAMOTO et al., 2005), unveränderte (LI et al., 2006) oder reduzierte (LI et al., 2006) mRNA-Spiegel auf.

Erhöhte Transkriptspiegel waren ebenfalls für die Chalkonsynthase, die Zimtsäure-4-Hydroxylase und die Isoflavonreduktase des Sekundärmetabolismus festzustellen, was zu einer Akkumulation an phenolischen Inhaltsstoffen führen kann. Dadurch kommt es zur Abwehr reaktiver Sauerstoffspezies, wie sie beispielsweise durch Ozonexposition entstehen. Die Zimtsäure-4-Hydroxylase wies in *A. thaliana* Ökotyp Col-0 (LUDWIKOW et al., 2004) nach Ozonstress einen erhöhten Transkriptspiegel auf, ebenso die Naringeninchalkonsynthase des Shikimatweges in *P. tremuloides* (GUPTA et al., 2005).

4.7 Gewächshausversuch - Einfluss von *Apiognomonía errabunda*

Die Auswirkung der *A. errabunda*-Behandlung auf die Gewächshausbuchen wird im Folgenden für die Transkript- und Metabolitebene sowie die Chlorophyllfluoreszenz diskutiert. Ferner wird der Infektionserfolg mittels genomischer *A. errabunda*-DNA betrachtet.

4.7.1 Gehalt an genomischer *Apiognomonía errabunda*-DNA

Die Buchen wurden am 29.05.06 mit *A. errabunda* infiziert. Die genomische *A. errabunda*-DNA wurde am letzten Probennahmetermin (19.06.06) bestimmt und ergab dort sehr geringe Werte von 0,07 bis 0,08 pg DNA/mg Frischgewicht. In Feldstudien wurden hingegen genomische DNA-Werte von 1 bis 1000 pg/mg Frischgewicht erreicht (BAHNWEG et al., 2005). Somit wird davon ausgegangen, dass der Endophyt zwar das Blatt penetrierte, sich aber nicht weiter ausbreiten konnte.

Verschiedene Faktoren beeinflussen die endophytische Infektion, zum Beispiel Inokkulumgröße, Sonneneinstrahlung, Temperatur und Niederschlag (WILSON und CARROLL, 1994). Da die Klimafaktoren sowie die Inokkulumgröße optimale Infektionsbedingungen für den Pilz geboten haben, unterdrückten vermutlich andere Begebenheiten sein Wachstum. Gute Manifestationsraten wurden in den Schattenblättern der Buchen des Kranzberger Forstes festgestellt, wohingegen sich der Pilz in den Sonnenblättern nicht so gut etablierte (BAHNWEG, unveröffentlicht; BAHNWEG et al., 2005). Eventuell ähneln sich das Abwehrspektrum der Blätter fünfjähriger Gewächshaus-

buchen und das der Sonnenblätter. Andererseits haben Sämlinge weniger Chlorophyll, aber mehr α -Tocopherol und mehr protektive Carotenoide als adulte Bäume (HERBINGER et al., 2005), was für einen höheren Schutz gegen pilzliche Infektionen sprechen würde.

4.7.2 Transkriptspiegeländerungen

Insgesamt waren sehr wenige Transkriptspiegel 21 Tage nach der Infektion verändert, was daran lag, dass der Infektionserfolg von *A. errabunda* in den Blättern der Buchen ausblieb. Die Infektionen eines Endophyten löst in der Wirtspflanze andere Abwehrmechanismen aus als die Infektion mit einem pilzlichen Pathogen, gegen den sie Abwehrfaktoren bildet (PETRINI, 1986). Es ist zu erwarten, dass veränderte Transkriptspiegel zum frühen Infektionsgeschehen Aufschluss über die Endophyt–Wirt Interaktion geben.

Einen Hinweis auf eine Abwehrreaktion könnte in der 2x ambienten Ozonatmosphäre der erhöhte Transkriptspiegel der β -Glucanase bieten. Untermuert wurde dieses durch den Transkriptrückgang einer EST des Zellwachstums. Allerdings wies die Glutathion S-Transferase ebenfalls einen verminderten mRNA-Spiegel auf, wohingegen sie nach oxidativem Stress — wie zum Beispiel nach einem Infektionsereignis — eher induziert war (RAO und DAVIS, 1999; TAMAOKI et al., 2003; LUDWIKOW et al., 2004; AONO et al., 2005; TOSTI et al., 2006).

4.7.3 Inhaltsstoffe

Endophyten besitzen eine allgemeine Toleranz gegenüber Gallussäure (CARROLL und PETRINI, 1983). So könnte das Wachstum von Endophyten durch phenolische Blattkomponenten unbeflusst bleiben (PETRINI, 1986).

Bezüglich der Exposition mit erhöhtem CO₂ sowie Ozon zeigten die Hydroxyzimtsäure-, Kämpferol- und Quercetinderivate, die Flavan-/Flavanoglycoside sowie die Gesamtflavonole und die Gesamtflavonoide signifikante Änderungen ihrer Konzentrationen. Unverändert blieben die phenolischen Inhaltsstoffe durch erhöhtes CO₂ in verschiedenen Sojabohnenkultivaren (BRAGA et al., 2006).

Die Hydroxyzimtsäuren machten insgesamt den größten Anteil an den löslichen phenolischen Inhaltsstoffen aus. Bestätigt wird dieser Sachverhalt durch Studien mit Bohnen (BIOLLEY et al., 1998; KANOUN et al., 2001). Die Hydroxyzimtsäuren zeigten eine Korrelation zwischen Behandlung und Infektion, wobei die Gehalte in den uninfizierten CO₂- und Ozon-behandelten Buchen über den Zeitverlauf signifikant ab, in den Buchen unter ambienten Bedingungen sie hingegen signifikant zunahm. Berichte über abnehmende Hydroxyzimtsäuregehalte durch Ozonstress sind für *Phaseolus vulgaris* L. Kultivare (BIOLLEY et al., 1998; KANOUN et al., 2001)

und Buche (PRITSCH et al., 2007) zu finden. Wobei SCHLOTER et al. (2005) im Jahr 2003 höhere Hydroxymethylsäuregehalte in Ozon-behandelten Bäumen feststellten.

Die Akkumulation von Kämpferolderivaten ging innerhalb des dreiwöchigen Versuchszeitraumes in allen Behandlungen signifikant zurück, beobachtet wurde dies ebenfalls in *P. vulgaris* cv. Bergamo (KANOUN et al., 2003). Eventuell wurde Kämpferol über die Vegetationsperiode in die Zellwand eingebaut (BAHNWEG et al., 2005). BIOLLEY et al. (2002) und KANOUN et al. (2003) sahen eine signifikante Ozon-bedingte Erhöhung der Kämpferolderivate. Erhöhte Kämpferolgehalte wurden auch für die Ozon- und CO₂-behandelten Gewächshausbäume festgestellt.

Die Exposition mit CO₂ und Ozon zeigte einen signifikanten Einfluss auf die Quercetinderivatgehalte. Diese wiesen den höchsten prozentualen Gehalt vom Frischgewicht in den Ozon-behandelten Buchen auf, gefolgt von den CO₂-behandelten Bäumen. Nach Ozonstress wurde ebenso eine Erhöhung der Quercetinderivate in Birke gesehen (SALEEM et al., 2001).

Im Jahr 2003 waren die acylierte Flavonolglycoside in den Ozon-behandelten Bäumen der Lysimeter am höchsten (SCHLOTER et al., 2005), dieses Ergebnis war tendenziell für die Gewächshausbuchen zum ersten Probennahmezeitpunkt zu sehen.

Bezüglich der Gesamtflavonoide wurde eine Korrelation zwischen Behandlung und Infektion erkannt. Dabei reduzierte die Infektion mit *A. errabunda* die Gehalte in den Ozon- und CO₂-behandelten Buchen, doch in den Buchen unter ambienten Bedingungen blieben sie unverändert. Verschiedene Studien berichten ebenfalls über eine signifikante Abnahme der phenolischen löslichen Inhaltsstoffe über den Zeitverlauf (BAHNWEG et al., 2005; PRITSCH et al., 2007). Dieses mag zum einen am normalen Abfall von löslichen phenolischen Substanzen über die Vegetationsperiode liegen (PRITSCH et al., 2007). Zum anderen könnte die Reduktion der phenolischen Substanzen, die antioxidatives Potential besitzen, in den Ozon-behandelten Buchen darauf hinweisen, dass die Substanzen entweder in die Zellwand eingelagert, oxidativ verbraucht oder durch den Ozonstress degradiert werden.

Ferner waren die Gesamtflavonoide signifikant durch die Behandlungen mit CO₂ und Ozon erhöht. Bestätigt wurde diese Sachlage — Akkumulation von Gesamtphenolen nach Ozon-einfluss — für *Pinus halepensis* Mill. (ROBLES et al., 2003), *Betula pendula* (SALEEM et al., 2001) und *Fagus sylvatica* (SCHLOTER et al., 2005). Aber auch eine Reduktion an Gesamtflavonoiden wurde nach Ozonstress festgestellt (BIOLLEY et al., 1998; BAHNWEG et al., 2005; PRITSCH et al., 2007). In Sojabohne blieben die totalen Phenolgehalte in einem Gewächshausexperiment durch Ozon unbeeinflusst, im Freiland wurde hingegen ein signifikanter Ozoneinfluss gesehen (BOOKER

und MILLER, 1998). Daneben wurden durch den Ozonstress „neue“ Isoflavonoide gebildet (KANOUN et al., 2001; BIOLLEY et al., 2002).

Da allerdings Klimafaktoren einen hohen Einfluss auf die Inhaltsstoffsynthese haben — so waren im sehr trockenen und heißen Jahr 2003 sehr geringe Gehalte an Hydroxyzimtsäurederivaten in den Buchenblättern des Lysimeters zu messen (PRITSCH et al., 2007) — könnten die signifikant unterschiedlichen Gehalte von den unterschiedlichen Temperaturen in den einzelnen Kammern am Anfang der Vegetationsperiode herrühren (Anhang, Abbildung 63). So standen die Buchen unter 2x ambienten CO₂ in einer um 5°C kälteren Kammer im Vergleich zu den beiden anderen Varianten.

Leichte Unterschiede waren für die Zellwand-gebundenen Inhaltsstoffe in den unterschiedlichen Behandlungen zu sehen. Zum Zeitpunkt t=0 war der Gehalt an Zellwand-gebundenen Inhaltsstoffen in den Ozon-gestressten Buchen höher als in den beiden anderen Varianten, bestätigt wurde dieser Befund durch die Erhöhung von unlöslichen phenolischen Inhaltsstoffen in *Glycine max* L. nach Ozonbehandlung (BOOKER und MILLER, 1998). Wohingegen in den Buchen des Kranzberger Forstes kein Ozoneinfluss hinsichtlich der Zellwand-gebundenen Kämpferolderivate festgestellt wurde (BAHNWEG et al., 2005).

Die insgesamt 14 gefundenen Stoffe der Zellwandhydrolysen zeigten generell eine Zunahme über die Zeit. Nur die Substanz, welche nach 33,5 min einen Peak zeigte, reagierte signifikant auf die Exposition mit Ozon beziehungsweise CO₂. Interessant wäre eine Strukturaufklärung dieser Substanz.

4.7.4 Chlorophyllfluoreszenz

Mit der Pulsamplitudenmodulation-Fluoreszenzmethode wurde die maximale Quantenausbeute im Photosystem II bestimmt. Laut BJÖRKMANN und DEMMING, 1987 soll die maximale Quantenausbeute eines ungestressten Baumes über 0,80 liegen, in den Gewächshausbuchen lag die durchschnittliche maximale Quantenausbeute allerdings schon vor der Infektion am 23.05.06 nur um 0,78 bis 0,79.

Die maximale Quantenausbeute blieb durch die kontinuierlich erhöhte Exposition mit Ozon beziehungsweise CO₂ unverändert. Diese Erkenntnis in Hinblick auf die CO₂-Exposition wurde an Sojabohnen (BRAGA et al., 2006) sowie *Fagus sylvatica* L. (GRAMS et al., 1999; LEVERENZ et al., 1999; LÜTZ et al., 2000) bestätigt. Im Gegensatz dazu war die maximale Quantenausbeute durch akute Exposition mit Ozon um 0,11 in *Caesalpinia echinata* Lam. reduziert (MORAES et al., 2006).

Buchen, die über die Vegetationsperiode mit Ozon behandelt wurden, zeigten jedoch keinen signifikanten Ozoneinfluss (GRAMS et al., 1999), wohingegen in Buchen, Eichen und Pappeln die maximale Quantenausbeute signifikant durch Ozon verändert war (BUSSOTTI et al., 2007). In mehreren Versuchen wurde der Ozoneinfluss auf die maximale Quantenausbeute überwiegend erst am Ende der Vegetationsperiode festgestellt (LIPPERT et al., 1996b; BORTIER et al., 2000; LÜTZ et al., 2000; BUSSOTTI et al., 2007), die Messungen an den Gewächshausbuchen fanden jedoch im Mai/Juni statt.

Auffällig war der Rückgang der maximalen Quantenausbeute in allen Buchen, zwei Tage nach der *A. errabunda*-Infektion am 31.05.06, wobei interessanterweise der stärkste Rückgang an den Blättern der infizierten Buchen unter ambienten Bedingungen gemessen wurde. Allerdings waren die einzelnen Behandlungen nicht signifikant voneinander verschieden. Der Rückgang der maximalen Quantenausbeute könnte auf unterschiedliche Lichtverhältnisse an beiden Messtagen zurück zu führen sein oder aber die Buchen reagierten auf die Behandlung mit Abschlämlösung beziehungsweise sporenhaltiger Abschlämlösung.

Die mit *A. errabunda* infizierten Buchen in der ambienten Atmosphäre wiesen am 02.06.06 und 16.06.06 eine signifikant niedrigere maximale Quantenausbeute auf. Dieses Ergebnis wurde durch die Darstellung des PAM Chlorophyll Fluorometer untermauert, wobei keine Quantifizierung der fluoreszierenden Bereiche vorgenommen wurde. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Kontrollbuchen bezüglich der maximalen Quantenausbeute den größten Stress beziehungsweise die größte Beeinflussung des Photosyntheseapparates nach der *A. errabunda*-Infektion zeigten.

4.7.5 Zusammenfassende Diskussion - Gewächshausversuch

Gegenüber den Buchen unter ambienten Bedingungen wurde hinsichtlich der Transkriptspiegel in den CO₂-behandelten Buchen eine erhöhte Aktivität des Grund- vor allem aber des Proteinstoffwechsels zum Zeitpunkt t=0 festgestellt. In den Ozon-behandelten Buchen hingegen zeigte der Protein-, Ethylen-, Abwehr- und Sekundärstoffwechsel vermehrte mRNA-Spiegeländerungen.

Auch bezüglich der Inhaltsstoffe waren signifikante Expositionseinflüsse zu erkennen, wobei die Buchen unter ambienten Bedingungen in fast allen gemessenen löslichen Inhaltsstoffen geringere Werte gegenüber den CO₂- beziehungsweise Ozon-behandelten Buchen aufwiesen.

Durch die Infektion mit *A. errabunda*, nahmen in den Buchen unter ambienten Bedingungen die Gehalte an Hydroxyzimtsäuren sowie an Flavan/Flavanon zu, in den anderen beiden Varianten hingegen ab.

Die ganzen Faktoren lassen den Schluss zu, dass die Buchen unter ambienten Bedingungen im Vergleich zu den anderen Buchen über unzureichenden Schutz gegen Stress verfügten, was die verminderte maximale Quantenausbeute in den infizierten Kontrollbuchen gegenüber den nicht infizierten Buchen erklären könnte.

Ferner entwickelten die Buchen unter den verschiedenen CO₂- und Ozon-Regimen unterschiedliche Mechanismen sich gegen Endophyten zu schützen. Dabei spielt die Morphologie und die inhaltsstoffliche Ausstattung eine entscheidende Rolle. So hatten junge Buchen, die in der Schattenkrone adulter Bäume kultiviert wurden, höhere Chlorophyllkonzentrationen aber weniger Carotenoid- und α -Tocopherolgehalte und verfügten somit über einen geringeren Schutz gegenüber Stresseinwirkungen (HERBINGER et al., 2005). Zudem sind im gestressten Gewebe mehr Flavonole enthalten (FEUCHT et al., 1994).

4.8 Lysimeter - Ozoneinfluss

Der Einfluss erhöhter Ozonexposition unter kontrollierten Freilandbedingungen auf den Transkriptspiegel sechsjähriger Buchen wurde im Lysimeterversuch für das Jahr 2005 beschrieben. Er schlägt somit eine Brücke zwischen den kontrollierten Versuchen der Expositionskammern sowie des Gewächshauses und dem Freilandversuch des Kranzberger Forstes.

4.8.1 Transkriptspiegeländerungen

Die Akkumulation von Transkripten der Ethylen-Biosynthese sowie ESTs, welche in die Reaktion auf oxidativen Stress eingebunden sind, wurde im Juli 2005 gesehen. So waren durch die Ozonbehandlung am 27.07.05 drei ACC-Oxidasen und ein Ethylen-resistentes Gen induziert. Bestätigt wurde dieses Ergebnis durch die Induktion der ACC-Oxidase nach Ozonstress in drei verschiedenen Tomaten-Kultivaren (MOEDER et al., 2002) und in *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Col-0 und Wassilewskija (LI et al., 2006). In *A. thaliana* cv. Columbia waren vier ACC-Oxidasen durch Ozon unbeeinflusst (D'HAESE et al., 2006). Nach Stressereignissen wird in der Pflanze eine Signalkaskade aktiviert, in die auch Kinasen involviert sind. Im Juli war eine putative Proteintyrosinkinase durch Ozon induziert. Im September zeigte die Nukleosiddiphosphatkinase II einen verminderten Transkriptspiegel.

Die Induktion von PR-Genen ist eine Ozon-bedingte Stressantwort, die in verschiedenen Studien nachgewiesen (ERNST et al., 1992; ECKEY-KALTENBACH et al., 1994; YALPANI et al., 1994; SHARMA und DAVIS, 1995; SHARMA et al., 1996; KOCH et al., 1998; PÄÄKKÖNEN et al., 1998; MATSUYAMA et al., 2002; TAMAOKI et al., 2003; LI et al., 2006; JEHNES et al., 2007) und im Juli 2005 in den

Lysimeterbuchen durch erhöhte Transkripte von drei Stress und Pathogen verwandten Proteinen unterstützt wurde. Im Gegensatz dazu besaß ein EST der Stressantwort einen verminderten Transkriptspiegel und LI et al. (2006) berichteten über keinen Einfluss durch Ozon auf ein PR-ähnliches Protein und einen putativen PR-Protein 5 Vorläufer.

Die Pflanzen haben im Laufe ihrer Evolution geeignete Mechanismen gegenüber endogenen Radikalen, die Pflanzen schädigen, entwickelt. So trägt die Superoxiddismutase zu Reparatur- und Entgiftungsmechanismen bei. Die Mangansuperoxiddismutase war am 27.07.05 induziert, ebenso in verschiedenen Ozonversuchen mit *A. thaliana* Ökotypen (SHARMA und DAVIS, 1994; CONKLIN und LAST, 1995; KLIEBENSTEIN et al., 1998). Unverändert blieb die Mangansuperoxiddismutase in adulten *Fagus sylvatica* L. (JEHNES et al., 2007), *A. thaliana* Col-0, *A. thaliana* Cvi-0 und *Thellungiella halophila* Ökotyp Shandong. In *A. thaliana* Wassilewskija (Ozon-sensitiv) war sie durch Ozonstress sogar reprimiert (LI et al., 2006).

Im Juli 2005 war eine Transkriptakkumulation einer EST des Aminosäurestoffwechsels (auch im September und Oktober) und von drei ribosomalen RNAs der Proteinsynthese zu beobachten, wobei diese zu jedem Probennahmetermin erhöhte Transkriptspiegel aufwiesen. Die erhöhte Aktivität auf der Transkriptebene bezüglich des Proteinstoffwechsels korrelierte im Juli mit der Induktion des Aminosäuretransporters BAT1, der sowohl induziert als auch reprimiert war. In *A. thaliana* Ökotypen war ebenfalls ein putativer ABC-Transporter drei Stunden nach Ozonbehandlung induziert (HEIDENREICH et al., 2005).

Die Kern-kodierte Chloroplastenribulose-5-Phosphat 3-Epimerase zeigte einen erhöhten Transkriptspiegel durch die Ozonbehandlung. In anderen Studien blieb die Stroma-assoziierte putative D-Ribulose-5-Phosphat-Epimerase in zwei verschiedenen *A. thaliana* Ökotypen und *T. halophila* Ökotyp Shandong durch Ozon unbeeinflusst, der Ozon-sensitive *A. thaliana* Ökotyp Wassilewskija wies allerdings einen reduzierten mRNA-Gehalt auf (LI et al., 2006). Weiterhin war die Stroma-assoziierte putative D-Ribulose-5-Phosphat-Epimerase in *A. thaliana* Ökotyp Col-0 ebenfalls reprimiert und in der Ozon-sensitiven *A. thaliana* Ökotyp Wassilewskija und *A. thaliana* Ökotyp Cvi-0 unverändert (LI et al., 2006).

In Bezug auf den Sekundärmetabolismus war eine Induktion von Genen, die zur Bildung von antioxidativen Stoffen führen, zu erwarten. So war die (-)-Isopiperitenonreduktase im Juli 2005 induziert, die Chalkonsynthese allerdings reprimiert. Dieser Umstand wurde in Versuchen an *A. thaliana* Ökotyp Col-0 bestätigt (LUDWIKOW et al., 2004). Petersilie (ECKEY-KALTENBACH et al., 1994) und Tabak (BAHL et al., 1994) reagierten hingegen mit einem Anstieg des Transkriptspiegels der Chalkonsynthese nach Ozonstress.

Vier Transkriptionsfaktoren zeigten im September 2005 einen verminderten Transkriptspiegel, das UV-B-repressive Protein darüber hinaus im Juli 2005 und Oktober 2005. D'HAESE et al. (2006) fanden ebenfalls nach Ozonstress vier reprimierte Transkriptionsfaktoren in *A. thaliana* cv. Columbia.

Abwehrsubstanzen sowie antioxidative Stoffe werden in Pflanzen an ein Glykosid gehängt, da das Aglykon eventuell selbst schädigend für die Pflanze sein kann. Zur Abspaltung des Glykosids dient eine Glykosidhydrolase. Diese zeigte im Juli, aber auch im September und Oktober 2005 einen erhöhten mRNA-Spiegel, was für eine Freisetzung von antioxidativen Stoffen sprechen und folglich ein Anzeichen für oxidativen Stress sein könnte.

Im September und Oktober 2005 waren reduzierte Transkriptspiegel hauptsächlich von ESTs der Photosynthese, der Chloroplastenbiosynthese und der mRNA-Synthese zu sehen. Dieses deutet auf eine beschleunigte Seneszenz der Buchen unter erhöhtem Ozon hin. Unterstützt wird diese These auf Blattebene im selben Jahr und im Jahr 2003 (PRITSCH et al., 2007). Ein über Ozon ausgelöster beschleunigter Laubfall im Herbst wurde für die Buchen des Kranzberger Forstes in den Jahren 1999-2001 (NUNN et al., 2002), 2000-2003 (NUNN et al., 2005) und 2005 (GIELEN et al., 2007), aber ebenso in *Betula pendula* ROTH (SALEEM et al., 2001) ermittelt. Dieses erklärt auch den Abfall von Transkripten des Grundmetabolismus. So waren insbesondere sechs ESTs des Primärmetabolismus zum Ende der Vegetationsperiode reprimiert.

Auch ESTs des Energiestoffwechsels, wie die glyoxysomale Malatdehydrogenase des Zitronensäurezykluses, wiesen im September und Oktober 2005 verminderte Transkriptspiegel auf. Außerdem waren 10 ESTs der Photosynthese im September und vier ESTs im Oktober 2005 reprimiert, darunter die Fructose-Biphosphataldolase. In *A. thaliana* Ökotypen und *T. halophila* Ökotyp Shandong blieb die Stroma-assoziierte Fructose 1,6-Bisphosphatase durch Ozon unbeeinflusst (LI et al., 2006). Ferner hatten zwei Rubisco Aktivierungsvorläufer einen verminderten Transkriptspiegel, genauso wie verschiedene Untereinheiten der Rubisco nach Ozonstress (GLICK et al., 1995; MILLER et al., 1999; TOSTI et al., 2006). Vor allem Biomembranen reagieren mit Ozon. Dabei entstehen Proteindisulfide, die durch Thioredoxin reduziert werden können. Thioredoxin fungiert somit als „back-up“ Reduktionssystem zu Zeiten, in denen Glutathion oder Glutaredoxin oxidiert sind. Im September und Oktober 2005 fielen die Transkripte des Thioredoxins ab, in *A. thaliana* Ökotypen war es durch Ozon sowohl induziert, als auch reprimiert und unbeeinflusst, unabhängig von der Ozonsensitivität (D'HAESE et al., 2006; LI et al., 2006).

Der Wachstumsfaktor 9-cis Epoxycarotenoiddioxygenase ist bei der Abscisinsäuresynthese beteiligt, die für den Stomataschluss zuständig und eng mit Ozonstress und ROS-Signalweiter-

leitung verbunden ist. Eine Induktion dieses Gens wurde im Juli 2003/2004 und Juni 2004 nachgewiesen (JEHNES et al., 2007), im Oktober und September 2005 zeigte es in den Buchen des Lysimeters allerdings reduzierte mRNA-Spiegel.

In verschiedenen Pflanzen waren Gene des Chloroplasten (SANDERMANN, 1996; PELL et al., 1997; D'HAESE et al., 2006; LI et al., 2006) nach Ozonstress reprimiert, was mit den acht verminderten mRNA-Spiegel von ESTs der Chloroplastenstruktur in den Lysimeterbuchen übereinstimmt. Keine Änderung des Transkriptspiegels indessen war von Genen des Thylakoidlumens, der Chloroplastenmembran, des Chloroplast RNA-bindenden Proteins, eines Proteins des Chloroplastlumen, des PS I, aber auch PSII Typ I Chlorophyll a/b-bindendes Protein in *A. thaliana* Ökotypen zu sehen (LI et al., 2006). Erhöhte mRNA-Spiegel des Chlorophyll a/b-bindenden Proteins war in *A. thaliana* Cvi-0 (LI et al., 2006) nach Ozonstress beobachtbar, in *Pinus sylvestris* Sämlingen (CHIRON et al., 2000a), *A. thaliana* Ökotyp *Lansberg erecta* (MILLER et al., 1999) und *Oryza sativa* (TSUKAMOTO et al., 2005) hingegen waren die Transkriptspiegel ebenfalls reduziert.

In Verbindung mit Stress wird ferner das Aquaporin genannt, das zum Ende der Vegetationsperiode im September und Oktober 2005 einen verringerten Transkriptspiegel zeigte. Dagegen wurde in *A. thaliana* (MILLER et al., 1999) und *P. abies* (BUSCHMANN et al., 1998) eine Ozonbedingte Induktion eines Porins nachgewiesen.

Die Zeaxanthinepoxidase war im September 2005 durch Ozon reprimiert, wohingegen sie in adulten *F. sylvatica* L. unbeeinflusst blieb (JEHNES et al., 2007). Die Allenoxidsynthese war zum Ende der Vegetationsperiode durch Ozon induziert. Beobachtet wurde dies auch in Ozonsensitiven *A. thaliana* (AONO et al., 2005). Somit wurde vermehrt Jasmonsäure gebildet, die wiederum Seneszenzvorgänge wie Chlorophyllabbau und damit verbundene Proteolyse und erhöhte Atmung hervorruft. Die Glutathion S-Transferase ist eine enzymatische Komponente, die für die Entgiftung problematischer Sauerstoffspezies sorgt. Sie war im Oktober 2005 induziert. Erhöhte Transkriptspiegel wurden in verschiedenen Versuchen nachgewiesen (SHARMA und DAVIS, 1994; CONKLIN und LAST, 1995; SHARMA et al., 1996; RAO und DAVIS, 1999; MATSUYAMA et al., 2002; TAMAOKI et al., 2003; AONO et al., 2005; TOSTI et al., 2006), allerdings wurden auch verminderte Transkriptspiegel der Glutathion S-Transferase nach Ozonbehandlung (TOSTI et al., 2006) festgestellt.

Ein großes Potential zur weiterführenden Aufklärung von Mechanismen, die innerhalb der Europäischen Buche durch Ozonstress in Gang gesetzt werden, steckt in den unbekanntesten ESTs, die vorwiegend am 27.07.05 induziert waren.

4.8.2 Lösliche sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe

In *Phaseolus vulgaris* L. (BIOLLEY et al., 1998) und *P. vulgaris* L. cv Nerina (KANOUN et al., 2001) machten die Hydroxyzimtsäurederivate den größten Anteil an löslichen phenolischen Inhaltsstoffen aus, was mit den Ergebnissen der Lysimeterbuchen übereinstimmt. Über den Jahresverlauf nahmen die Hydroxyzimtsäurederivate in den Lysimeterbuchen von Juli bis Oktober 2005 ab, insbesondere im Juli und Oktober 2005 war ein Ozoneinfluss über den Zeitverlauf im nicht linearen Modell signifikant. Signifikante Bestätigung fand dies in dem Jahr 2004 (PRITSCH et al., 2007) und wurde in Versuchen mit Bohnen ebenfalls nachgewiesen (BIOLLEY et al., 1998; KANOUN et al., 2001). In dem sehr trockenen und heißen Jahr 2003 waren allerdings die Hydroxyzimtsäuren in den Buchen unter 2x ambientem Ozon höher (SCHLOTTER et al., 2005). Insgesamt waren sie in der Kontrollvariante höher als in den Ozon-behandelten Buchen.

Im Jahr 2005 nahmen die Kämpferolderivatkonzentrationen beider Behandlungen von Juli bis September ab. Die Abnahme war im zeitlichen Verlauf in beiden Modellen signifikant. Eine während des Wachstums abnehmende Kämpferolkonzentration wurde ebenso an Bohnen beobachtet (KANOUN et al., 2003). Die Ozon-behandelten Lysimeterbuchen besaßen insgesamt einen deutlich höheren Gehalt an Kämpferolderivaten. Ozon-bedingte Kämpferolerhöhung wurde in Versuchen mit *P. vulgaris* cv Bergam bestätigt (BIOLLEY et al., 2002; KANOUN et al., 2003).

Signifikant sanken die Quercetinkonzentrationen in den Lysimeterbuchen im Jahr 2005 während der Vegetationsperiode. Höhere Werte an Quercetinderivaten wiesen die Ozon-behandelten Lysimeterbuchen im Juli und August 2005 auf. Eine Akkumulation von Quercetinderivaten nach Ozonstress wurde ebenfalls an *Betula pendula* ROTH gesehen (SALEEM et al., 2001).

Insgesamt wiesen die Kontrollbuchen höhere prozentuale Gehalte an acylierten Flavonolglycosiden bezogen auf das Frischgewicht im Vergleich zu den Ozon-behandelten Lysimeterbuchen auf. Eine signifikante Abnahme von Juli bis Oktober wurde im Jahr 2005 anhand des linearen Modells festgestellt. Dabei war auch der Ozoneinfluss signifikant, die Gehalte nahmen in den Ozon-behandelten Buchen im nicht linearen Modell stärker ab als in den Kontrollbuchen. Im Jahr 2003 hingegen hatten die acylierten Flavonolglycoside in Ozon-behandelten Bäumen höhere Gehalte als in den Bäumen unter ambienten Bedingungen (SCHLOTTER et al., 2005).

Die Gesamtflavonolderivatgehalte sanken signifikant über die Vegetationsperiode 2005. Dass Ozon den Gesamtflavonolgehalt beeinflusst (ROBLES et al., 2003), unterstützen die Resultate des Lysimeterversuches. Allerdings war der Gesamtgehalt an Flavonolderivaten teilweise in den Ozon-behandelten Buchen höher (August 2005), unbeeinflusst (September 2005, Oktober 2005) oder in den unbehandelten Lysimeterbuchen höher. Dieses Ergebnis fiel in den Jahren 2003 und

2004 eindeutiger aus, so waren die Gesamtflavonolderivatgehalte unter Kontrollbedingungen signifikant höher (SCHLOTTER et al., 2005; PRITSCH et al., 2007).

Die Fraktion der Flavane/Flavanone stellte den geringsten Anteil an den Gesamtflavonoiden dar. In den Jahren 2003 und 2004 wurde kein Ozoneinfluss auf die Flavane/Flavanone festgestellt (PRITSCH et al., 2007). Allerdings war in dem Jahr 2005 die Konzentration an Flavan/Flavanon in den Ozon-behandelten Lysimeterbäumen höher als in den unbehandelten. Des Weiteren wurde für das Jahr 2005 ein signifikanter Zeiteinfluss, insbesondere eine Abnahme der Gehalte im linearen Modell von Juli bis Oktober, festgestellt.

Der Gesamtgehalt an löslichen phenolischen Inhaltsstoffen nahm über den Versuchszeitraum in den Buchen des Lysimeters genauso wie in Buchen des Gewächshauses (4.7.3) ab. Dieses wurde von PRITSCH et al. (2007) bestätigt und ebenfalls in den Buchen des Kranzberger Forstes beobachtet (BAHNWEG et al., 2005). Die löslichen phenolischen Inhaltsstoffe haben ein hohes antioxidatives Potential. Über die Vegetationsperiode könnten diese Substanzen in die Zellwand eingebaut, zur Abpufferung von abiotischem sowie biotischem Stress verbraucht oder durch Ozon degradiert werden. Auch eine verminderte Biosynthese oder Synthese anderer löslicher phenolischer Stoffe würde für abnehmende Konzentrationen sprechen. So haben KANOUN et al. (2001) durch Ozonstress die Bildung von „neuen“ Isoflavonoiden in Bohnenblättern festgestellt.

Des Weiteren besaßen die Buchen unter Kontrollbedingungen im Juli 2005 höhere Gesamtflavonoidgehalte, im August niedrigere und zu den übrigen Zeitpunkten ähnliche. Im zeitlichen Verlauf des nicht linearen Modell (Behandlung* $Tage^2$) war ein signifikanter Einfluss im Juli und Oktober 2005 bezüglich der Ozonbehandlung zu sehen. In den Buchen des Kranzberger Forstes waren die Gesamtflavonoidgehalte jeweils in der Kontrollvariante (2001 Schattenkrone, 2003 Sonnenkrone und 2004 Sonnenkrone) erhöht (BAHNWEG et al., 2005), ähnliche Ergebnisse erhielt BIOLLEY et al. (1998) in *P. vulgaris* L., wohingegen Birken in Gebieten hoher Luftverschmutzung (LOPONEN et al., 1997; LOPONEN et al., 1998) und nach Ozonstress (SALEEM et al., 2001) phenolische Inhaltsstoffe akkumulierten.

4.8.3 Zusammenfassende Diskussion - Lysimeterversuch

Löw et al. (2007) fanden an adulten *Fagus sylvatica* L. heraus, dass stomatär aufgenommene Ozonmengen in dem trockenen und heißem Jahr 2003 viel geringer im Vergleich zu anderen Jahren ausfielen. Dieses lag daran, dass die Bäume während lang anhaltenden Trockenperioden und hoher Temperaturen die Stomata eher geschlossen hielten. Da das Jahr 2005 ebenfalls trocken und heiß war, könnte ein geringer Ozoneinfluss auf die Lysimeterbuchen erwartet

werden. Allerdings haben die Lysimeterbuchen ein anderes Mikroklima im Vergleich zu den adulten Buchen des Kranzberger Forstes, da sie enger zusammen stehen und durch ihr Alter beziehungsweise ihre Größe die Blätter mehr Bodennähe aufwiesen. Dadurch war eventuell die relative Feuchte höher und die Temperatur in Bodennähe geringer. Somit öffneten die Buchen ihre Stomata trotz der Trockenheit und der hohen Umgebungstemperatur und nahmen Ozon auf. Für den hohen Einfluss von Ozon auf die Lysimeterbuchen sprachen auch die induzierten ESTs im Juli 2005, die in die Ethylen-Biosynthese und in die Reaktion auf oxidativen Stress eingebunden sind. Ein signifikanter Ozoneinfluss war darüber hinaus auf die Hydroxyzimtsäure-, acylierte Flavonoglycosid- und die Gesamtflavonoidgehalte zu beobachten.

Mehrere Studien berichten über die Induktion Seneszenz-assoziiierter Gene nach Ozonstress (MILLER et al., 1999; D'HAESE et al., 2006; TOSTI et al., 2006). Im Jahr 2005 wurden deutliche Ozon-induzierte Seneszenzphänomene beobachtet, dieser Sachverhalt wurde von vielen Studien (NUNN et al., 2002; NUNN et al., 2005; GIELEN et al., 2007) bestätigt. Untermauert wird diese Erkenntnis durch Versuche an *Betula pendula* ROTH, wo die Zunahme an Gesamtphenolen und Quercetin (wie auch hier im Lysimeterversuch) mit einer durch Ozon-bedingten beschleunigten Seneszenz sowie weniger Wachstum, weniger Magnesium- und Chlorophyllgehalt erklärt wurde (SALEEM et al., 2001).

4.9 Versuch Kranzberger Forst – Einfluss von Ozon

Der Versuch gibt Einblick in die Änderung der Transkripte von Blättern der Sonnen- und Schattenkrone der adulten Buchen des Kranzberger Forstes unter erhöhten Ozonkonzentrationen. Durch die Freilandbedingungen wurde eine möglichst natürliche Umgebung simuliert.

4.9.1 Transkriptspiegeländerungen

In den etwa 60 Jahre alten Buchen (*Fagus sylvatica* L.) des Kranzberger Forstes waren nur 13 (2005) beziehungsweise sechs Transkriptspiegel (2006) durch die kontinuierliche Ozonexposition beeinflusst. Auch in anderen Freilandexperimenten waren nur wenige mRNA-Spiegel verändert (TAYLOR et al., 2005).

Über die Einflussnahme von chronischer Ozonbehandlung auf den Grundstoffwechsel der Kranzberger Forst Buchen konnte keine Aussage getroffen werden. In der Sonnenkrone der Kranzberger Forst Buchen wurden erstens keine Transkriptspiegeländerungen von ESTs des Grundstoffwechsels gesehen. Zweitens zeigte in den Schattenblättern der Kranzberger Forst

Buchen nur das Polyglutamin-bindende Protein (Aminosäurestoffwechsel) am Ende der Vegetationsperiode 2005 durch die Ozonexposition einen reduzierten Transkriptspiegel. Allerdings war die Fructose-Biphosphataldolase, die im Calvin-Zyklus die Entstehung von Fructose 1,6-Biphosphat katalysiert, am 19.09.05 durch die chronische Begasung mit Ozon induziert, wohingegen sie in *Arabidopsis thaliana* Ökotypen durch die Ozonbehandlung unbeeinflusst blieb (LI et al., 2006). Das UV-B-repressive Protein der mRNA-Synthese war am 12.09.06 in den Schattenblättern induziert. Dieses Ergebnis korreliert mit der Induktion der 18S ribosomale RNA im September 2006. Im September des Jahres 2005 war die 26S ribosomale RNA allerdings durch Ozon reprimiert.

Bezüglich des Aminosäuretransportes war in beiden Untersuchungs Jahren der BAT1 Transporter, allerdings nur in den Sonnenblättern (Mai 2005/Juni 2006), durch Ozon induziert. Die Aminosäuretransporter des ABC-Typs spielen eine wichtige Rolle in der Antwort auf Pflanzenstress. Sie haben ihre Funktion bei Entgiftungsprozessen, in der Chlorophyllbiosynthese, der Stomatabewegung und dem Ionenfluss (MARTINOIA et al., 2002).

Eine Ozon-bedingte Akkumulation von Kinasen der Signaltransduktion wurde sowohl in den Schattenblättern als auch in den Sonnenblättern im September 2005 gesehen. Auch JEHNES et al. (2007) wiesen im Juli 2003/2004 einen erhöhten Transkriptspiegel eines Gens der Signaltransduktion nach. Auf eine Ethylen-vermittelte frühere Seneszenz der Ozon-behandelten Schattenblätter könnte der erhöhte Transkriptspiegel der ACC-Oxidase 1a (Ethylen-Biosynthese) im September 2006 hinweisen. Tomaten reagierten ebenfalls mit einem erhöhten Transkriptspiegel der ACC-Oxidase auf erhöhtes Ozon (MOEDER et al., 2002). Des Weiteren zeigten *A. thaliana* Ökotypen einen Anstieg sowie einen Abfall oder keine Reaktion des Transkriptspiegels der ACC-Oxidase nach Ozonbehandlung (LI et al., 2006). Da durch Ozon die Seneszenz beschleunigt wird, war der reduzierte mRNA-Spiegel des putativen mit Seneszenz-assoziierten Protein am 19.09.05 in den Schattenblättern und im Mai 2005 in den Sonnenblättern unerwartet. Indes waren in *A. thaliana* Ökotypen Seneszenz-assoziierte Gene durch Ozon induziert (MILLER et al., 1999; TOSTI et al., 2006).

Erstaunlicherweise blieben die Transkripte von ESTs der Abwehr/Krankheit in den Buchen des Kranzberger Forstes unverändert, wohingegen in den Jahren 2003/2004 die Induktion eines PR1 Proteins und einer Kupfersuperoxiddismutase in den Blättern der Schattenkrone nachgewiesen wurden (JEHNES et al., 2007).

Die Chalkonsynthase hat ihre zentrale Aufgabe in der Flavonoidbiosynthese und war am 19.05.05 in den Schatten- und Sonnenblättern der Buchen reprimiert. Ebenso reduzierte mRNA-

Menge der Chalkonsynthase wurde in *A. thaliana* Ökotypen gefunden (LUDWIKOW et al., 2004). Erhöhte Transkriptspiegel indes wurden in Petersilie nach Ozonstress beobachtet (BAHL et al., 1994; ECKEY-KALTENBACH et al., 1994) und ebenso für das Isoflavonreduktase-verwandte Gen im September 2006 erhalten.

4.9.2 Inhaltsstoffe

Die Inhaltsstoffe Zellulose, Zellwände und ACC sowie das Trockengewicht wurden im Jahr 2005, jeweils getrennt nach Sonnen- und Schattenblättern bestimmt.

4.9.2.1 Strukturelle Inhaltsstoffe

Buchen investieren mehr in die Laubmasse der Sonnenblätter als in die der Schattenblätter. Auch der Kohlenstoffgewinn pro Einheit ist in den Sonnenblättern größer als in den Schattenblättern (REITER et al., 2005). Des Weiteren ist in den Blättern der Sonnenkrone die Photosyntheserate, die stomatäre Leitfähigkeit und die interzellulare CO₂-Konzentration höher (HERBINGER et al., 2005). So ist es nicht verwunderlich, dass die Sonnenblätter gegenüber den Schattenblättern ein höheres spezifisches Gewicht aufweisen (SITTE et al., 1998). In den Buchen des Kranzberger Forstes wurde ein signifikant höheres Trockengewicht der Sonnenblätter im Vergleich zu den Schattenblättern festgestellt. Dieses Ergebnis wurde durch (NEITZKE und THERBURG, 2000) bestätigt. Über den Jahreslauf nahm wie zu erwarten das Trockengewicht der Schattenblätter signifikant zu.

Im Großen und Ganzen erreichten die Schattenblätter der Bäume (1x Ozon) im Gegensatz zu den Blättern unter 2x ambienten Ozonbedingungen ein höheres Trockengewicht. Dieses lässt die Vermutung zu, dass es in den Schattenblättern der Bäume unter erhöhten Ozonbedingungen zu einem „Trade-off“ kommt und somit der Baum mehr in den Abwehr- und Sekundärstoffwechsel als ins Wachstum investiert. Dieses erklärt ferner die höheren ACC-Gehalte in den Blättern der Schattenkrone unter erhöhten Ozonbedingungen. Weiterhin wäre zu berücksichtigen, dass durch erhöhtes Ozon die Photosyntheserate, die stomatäre Leitfähigkeit, die Rubisco Aktivität (WARREN et al., 2007), die interzellulare CO₂-Konzentration (HERBINGER et al., 2005) und somit auch der gesamte Kohlenstoffgewinn sinkt. Dieses führt zu einem geringeren Wachstum und reduzierter Biomasse. Gesehen wurde eine Ozon-bedingte Reduzierung des Trockengewichtes ebenso für *Phaseolus vulgaris* cv Bergamo (BIOLLEY et al., 2002). Da die Sonnenblätter über eine höhere photoprotektive Ausstattung verfügen, blieb ihr Wachstum hinsichtlich des Faktors Ozon unbeeinflusst. So wiesen die Sonnenblätter (1x Ozon), außer im Oktober 2005, sogar geringfügig niedrigere Trockengewichte als die Bäume unter erhöhtem Ozon auf.

Durch Ozon war in den Schattenblättern ein höherer prozentualer Zellulosegehalte bezogen auf das Trockengewicht zu verzeichnen. Insgesamt nahm der Zellulosegehalt übers Jahr signifikant zu (nicht lineares Modell bezogen auf die Zeit). Im Gegensatz dazu nahmen die Zellulosegehalte der Klimakammerbuchen signifikant über drei Wochen ab.

Im Vergleich Sonnen- und Schattenblätter wiesen die Schattenblätter im Juni und Oktober 2005 höhere prozentuale Zellulosegehalte auf.

Der prozentuale Zellwandgehalt wies signifikante Veränderungen im nicht linearen Modell über den Jahresverlauf auf. Ferner war ein signifikanter Einfluss der Blattart und der Exposition mit Ozon zu sehen. Der zeitliche Verlauf ergab wiederum signifikante Unterschiede, zum einen in Relation zum Blatttyp, zum anderen in Relation zur Exposition.

Am Jahresbeginn (Schattenblätter, Mai/Juni 2005; Sonnenblätter Mai 2005) hatten jeweils die Blätter unter erhöhten Ozonbedingungen den höheren Zellwandanteil, was für einen strukturellen Schutz gegen Ozon sprechen könnte. Über den Jahresverlauf glichen sich die prozentualen Zellwandgehalte pro Trockengewicht aller Varianten an, wobei im Oktober 2005 die Schattenblätter jeweils noch einen Zuwachs ihrer Zellwandgehalte aufwiesen, die Sonnenblätter aber auf Septemberebene blieben.

4.9.2.2 ACC

Die Konzentrationen an freiem, konjugiertem und Gesamt-ACC waren insgesamt in den Schattenblättern der Kranzberger Forst Buchen im Vergleich zu den Sonnenblättern am höchsten. In Bezug zum konjugierten ACC wurde dieser Umstand ebenfalls in *F. sylvatica* bestätigt (NUNN et al., 2002; JEHNES et al., 2007).

Interessanterweise wiesen die Schattenblätter im Juni unter 2x ambienten Ozonbedingungen etwa doppelt so hohe freie ACC-Gehalte auf wie die Schattenblätter der ambienten Bedingungen. Dies ist ein weiteres Indiz der Ozon-induzierten Ethylen-vermittelten Signaltransduktion.

Die Blätter der Sonnenkrone erreichten unter ambienten Ozonbedingungen höhere Werte als die Sonnenblätter der Buchen unter 2x ambientem Ozon. In den Jahren 1999 bis 2001 konnte hingegen kein freies ACC detektiert werden (NUNN et al., 2002).

Durch Ozon waren die Gehalte an konjugiertem ACC in beiden Blatttypen höher. Dieser Sachverhalt wurde ebenfalls für die Schattenblätter im August 2000 (NUNN et al., 2002) und Juli 2004 (JEHNES et al., 2007) und für die Sonnenblätter im Mai, Juni, September 2003 und Juli 2004 (JEHNES et al., 2007) bestätigt. Bei NUNN et al. (2002) blieben die Konzentrationen am konjugierten ACC-Gehalt nach Ozonstress in den Sonnenblättern unverändert.

Im September 2005 wurden im Bereich der Schattenkrone die höchsten Werte an konjugiertem ACC gemessen, ebenso im Jahr 2004 (JEHNES et al., 2007). Im Gegensatz dazu zeigten die Sonnenblätter beider Ozonregime im September 2005 und Oktober 2004 die niedrigsten Gehalte an konjugiertem ACC (JEHNES et al., 2007). Weiterhin fielen die Gehalte an konjugiertem ACC im September 2005 in den Blättern der 2x ambienten Ozonatmosphäre unter den Gehalt der Blätter unter normalen Ozonbedingungen.

Für die Zellwand-gebundenen ACC-Gehalte wurde ein signifikanter zeitlicher Verlauf im linearen sowie im nicht linearen Modell (Tage²) festgestellt. Es scheint innerhalb des Blattes zu Umlagerungsprozessen von ACC gekommen zu sein. So korreliert der Verlauf des freien ACC's mit dem Zellwand-gebundenen ACC. Im August wurden hohe Werte an Zellwand-gebundenem ACC erhalten, wobei die freien ACC-Gehalte auf einem sehr niedrigen Niveau waren. Im September wurde freies ACC aus der Zellwand mobilisiert, was zu einem geringeren Gehalt an Zellwand-gebundenem ACC führte und die freien ACC-Gehalte ansteigen lies.

Der maximale Gesamt-ACC-Gehalt der Schattenblätter wurde im September erreicht, was die Induktion einer ACC-Oxidase im September 2006 erklären könnte. Dabei war der Gesamt ACC-Gehalt, außer im Mai, in den Schattenblättern der Buchen unter erhöhten Ozonbedingungen über den Jahresverlauf am höchsten. Höhere Gehalte an ACC bedeuteten eventuell höhere Sensibilität gegenüber oxidativem Stress der Schattenblätter im Vergleich zu den Sonnenblättern (TAUSZ et al., 2004; HABERER et al., 2007). Des Weiteren ist ein hoher ACC-Gehalt mit einer hohen Ethylen-Produktion verbunden und könnte somit auch zu erhöhter Blattverwundung und beschleunigter Laubseneszenz führen (NUNN et al., 2005).

4.9.3 Zusammenfassende Diskussion – Kranzberger Forst, Ozoneinfluss unter Berücksichtigung des Blatttyps

Außenfaktoren haben entscheidende Auswirkungen auf die Reaktion der Bäume auf zusätzlichen Ozonstress. Wenige Transkriptspiegel waren unter Freilandbedingungen im Vergleich zu den

Versuchen in den Expositionskammern, im Gewächshaus, aber auch unter Lysimeterbedingungen durch Ozon verändert. Ebenso wiesen junge Buchen im Phytothron schon bei geringen Ozonkonzentrationen Blattschäden auf, im Gegensatz zu Buchen unter Freilandbedingungen, die erst nach höheren Ozondosen Blattschäden erkennen ließen (BAUMGARTEN et al., 2000).

Das Ozonexpositionsexperiment startete schon vor acht Jahren im Jahr 1999. Da es in den Bäumen zu einem Ozon-induzierten „Memory-Effekt“ kommt (SANDERMANN, 1996; LANGEBARTELS et al., 1998), kann es sein, dass die kontinuierliche Ozonbelastungen über die gesamten Vegetationsperioden zu einer Anpassung der Bäume bezüglich Ozon geführt hat. Außerdem wurde es vermieden, den Bäumen Ozonkonzentrationen über 150 ppb zu geben. Weiterhin scheint der saisonale Ozoneinfluss von hohen Ozonpeaks kein großes akutes Risiko für alte Bäume darzustellen (BAUMGARTEN et al., 2000). Allerdings waren einige Inhaltsstoffe, wie beispielsweise freies und konjugiertes ACC, durch Ozon beeinflusst.

Ein weiterer Einflussfaktor auf die Stressantwort ist das Baumalter. Möglicherweise verfügen alte Bäume über eine höhere strukturelle Resistenz und sind dadurch Stress-resistenter als junge Bäume. Ein Grund dafür ist eine höhere photoprotektive Kapazität der älteren Bäume, die gegen oxidativen Stress schützt, der auf die Blattoberfläche wirkt (WIESER et al., 2003). Der höhere Flavonoid-, Ascorbat- (WIESER et al., 2003) und Glutathiongehalt der erwachsenen Bäume im Vergleich zu den Sämlingen (HERBINGER et al., 2005) könnte ausreichen, um Ozonstress abzapfen, so dass es wie in diesem Versuch erst gar nicht zur Induktion von ROS-Genen kommt.

Bedeutend für die Reaktion auf den Ozonstress ist weiterhin der Blatttyp. Insgesamt reagierten Sonnen- und Schattenblätter der Kranzberger Forst Buchen ganz unterschiedlich hinsichtlich ihres Transkriptspiegelmusters auf die erhöhte Ozonexposition. Nur die Chalkonsynthese war am 19.09.05 in beiden Blatttypen reprimiert. Zu dieser Erkenntnis kamen auch JEHNES et al. (2007), sie wiesen zum Teil signifikante Unterschiede zwischen Sonnen- und Schattenblättern hinsichtlich einiger Transkriptspiegel nach. Dieses mag zum einen an der unterschiedlichen Morphologie von Sonnen- und Schattenblättern liegen. Zum anderen hat die Kronenposition großen Einfluss auf den De-Epoxidationsstatus des Xanthophyllzykluses und Gehalt an Chlorophyll und Carotenoiden (HERBINGER et al., 2005). So verfügen die Schattenblätter eine höhere Chlorophyllkonzentration, aber weniger Carotenoide, α -Tocopherol, lösliche und Zellwand-gebundene phenolische Substanzen (BAHNWEG et al., 2005). Somit sind sie auch weniger gegen Photooxidative Prozesse geschützt (HERBINGER et al., 2005). Außerdem sind die Stomata im Gegensatz zu denen der Sonnenblätter nicht eingesenkt und können deswegen Ozon besser

aufnehmen. Aus diesen Gründen ist der Ozoneinfluss auf die Blätter der Schattenkrone ein nicht zu vernachlässigender Faktor (BAUMGARTEN et al., 2000).

4.10 Kranzberger Forst – Einfluss von Ozon und Insekten

Im Folgenden werden Veränderungen des Transkriptspegel in den unterschiedlichen funktionellen Klassen durch Minierung und Lochfraß von *Rhynchaenus fagi* L. und Gallenbildung durch *Mikiola fagi* in Sonnen- und Schattenblättern von Buchen unter ambienten und 2x ambienten Ozonbedingungen mittels Microarrayanalysen erfasst. Es ist wenig darüber bekannt, wie holzige Pflanzen auf einen Insektenbefall reagieren (RALPH et al., 2006a). Anhand von Microarrayanalysen wurde die Insekten-induzierte Abwehr von holzigen Pflanzen bisher nur an Pappeln untersucht (RALPH et al., 2006a).

Die Kranzberger Forst Buchen zeigten durch die Ozonbehandlung nur wenig veränderte Transkriptspegel (Punkt 4.9). So war es erstaunlich, dass in diesem Versuch doch eine Vielzahl an Veränderungen auf Transkriptniveau durch die Schadbilder Minierung und Lochfraß festgestellt wurden.

4.10.1 Minierung und Lochfraß durch *Rhynchaenus fagi*

In Pappeln wurde bezüglich des Aminosäurestoffwechsels eine Transkriptakkumulation nach mechanischer Verwundung festgestellt (CHRISTOPHER et al., 2004). Bestätigt wurde dieser Sachverhalt in den Lochfraß-geschädigten Schattenblättern (1x Ozon) und in den minierten Schattenblättern (2x Ozon). Die Lochfraß-geschädigten Sonnenblätter (2x Ozon) wiesen hingegen reduzierte mRNA-Gehalte auf.

Herbivorenfraß reduzierte die Transkripte verschiedener Photosynthesegene (HERMSMEIER et al., 2001; IZAGUIRRE et al., 2003; CHRISTOPHER et al., 2004; RALPH et al., 2006b). Dasselbe Ergebnis fand sich in den Lochfraß-geschädigten Sonnenblättern (2x Ozon). Die verminderte mRNA-Bildung von Genen der Photosynthese erlaubt den befallenen Pflanzen möglicherweise eine Reinvestition von Ressourcen in andere Prozesse, wie beispielsweise in den Aminosäurestoffwechsel (HUI et al., 2003)

Verschiedene mRNA-Spiegel von Transkriptionsfaktoren waren durch Insektenschaden in Pappeln verändert (RALPH et al., 2006a). Durch Lochfraß an Ozon-behandelten Schattenblättern war ein Transkriptionsfaktor reprimiert. Der bZIP Transkriptionsfaktor war durch Lochfraß in den Sonnenblättern der Buchen (2x Ozon) sowie in den minierten Sonnenblättern (1x Ozon) reprimiert und in den Lochfraß-geschädigten Schattenblättern (1x Ozon) induziert. In Pappeln

waren die Transkriptionsfaktoren Zink Finger, bZIP und Homoleucin Zipper sowohl induziert als auch reprimiert (RALPH et al., 2006a). Die Transkriptionsfaktoren WRKY und bZIP-Familie werden mit pflanzlicher Stressantwort in Verbindung gesetzt (EULGEM et al., 2000; SINGH et al., 2002). Erhöhte WRKY-Transkriptspiegel wurden nach Insektenschädigung in Tabak und Pappel festgestellt (IZAGUIRRE et al., 2003; RALPH et al., 2006a). Da WRKY eine regulatorische Funktion in der Transkription von Genen der Gibberellin-Biosynthese, der Lipoxygenase und von PR-Proteinen besitzt, korrelierten die verminderten WRKY-Transkriptspiegel der Lochfraß-geschädigten Sonnenblättern (2x Ozon) mit den ebenfalls reduzierten mRNA-Spiegeln der Lipoxygenase, von zwei PR-Proteinen und der Gibberellin 20-Oxidase. Diese war in den minierten Schattenblättern unter ambientem Ozon ebenso reprimiert.

In Verbindung mit Stress ist Ubiquitin verantwortlich für die Erkennung und Bindung entsprechender Zielsubstanzen der Proteindegradation (HUI et al., 2003). In Pappel war durch mechanische Verwundung das Ubiquitin induziert (CHRISTOPHER et al., 2004; RALPH et al., 2006b), genauso wie in Tabak durch Verwundung und Behandlung mit Essensbrei von *M. sexta* ein Ubiquitinträgerprotein (HUI et al., 2003). In diesem Versuch waren allerdings die meisten Transkriptspiegel des Proteinverbleibs und der Proteinspeicherung durch die Insektenschädigung vermindert. So wies das Ubiquitin-konjugierte Enzymfamilienprotein in den Ozon-behandelten durch Lochfraß geschädigten Sonnenblättern einen verminderten mRNA-Spiegel auf, wie auch in den minierten Schattenblätter (1x Ozon).

Die Aminosäuretransporter des ABC-Typs spielen eine entscheidende Rolle in der Antwort auf Pflanzenstress. Sie haben ihre Funktion bei Entgiftungsprozessen, in der Chlorophyllbiosynthese, der Stomatabewegung und dem Ionenfluss (MARTINOIA et al., 2002). Möglicherweise sind sie in die direkte Pflanzenabwehr über Signalmoleküle involviert (THEODOULOU et al., 2005). Sie transportieren auch Terpene (JASINSKI et al., 2001), Alkaloide (SHITAN et al., 2003), Abwehrkomponenten und verstärken den kutikularen Wachs (PIGHIN et al., 2004). In diesem Versuch stimmten die induzierten beziehungsweise reprimierten Transkriptspiegel der Aminosäuretransporter des ABC-Typs hinsichtlich ihrer Transkriptspiegel mit denen der Proteinsynthese überein. Darüber hinaus war das ABC Transporter Familienprotein durch Käferfraß an Pappel induziert (RALPH et al., 2006a), im Gegensatz dazu wiesen die Lochfraß-geschädigten Sonnenblätter (2x Ozon) verminderte mRNA-Spiegel auf, dieses wurde ebenfalls in Tabak durch imitierten Insektenschaden bestätigt (HUI et al., 2003).

Vier ESTs der Chloroplastenstruktur waren in den Schattenblättern (1x Ozon) durch Lochfraß induziert. In den minierten Sonnenblättern der Buchen unter erhöhtem Ozon waren je zwei ESTs

der Chloroplastenstruktur sowohl induziert als auch reprimiert. Ein Chlorophyll a/b-bindendes Protein zeigte einen erhöhten Transkriptspiegel. Dieses wurde auch in Pappeln durch mechanische Verwundung über den gesamten Untersuchungszeitraum beobachtet (CHRISTOPHER et al., 2004). In den minierten Schattenblättern unter 1x ambienten Ozon sowie in den Lochfraß-geschädigten Sonnenblättern der Buchen unter 2x ambienten Ozonbedingungen waren verschiedene Gene der Chloroplastenstruktur reprimiert. Das Resultat fand sich in Tabak nach Fraß des Tabakswärmers (HERMSMEIER et al., 2001), nach Raupenfraß von *C. occidentalis* an Fichte (RALPH et al., 2006b) und Käferfraß an Pappeln (RALPH et al., 2006a).

Pflanzen reagieren auf Insekten mit einer Abwehrreaktion, der eine Signaltransduktion vorausgeht (RALPH et al., 2006b). Bezüglich der Signaltransduktion waren in den minierten Sonnenblättern (1x Ozon) sowie in den Schattenblättern zwei Kinasen reprimiert. Durch Lochfraß (2x Ozon) waren eine Kinase reprimiert und das Ethylen-resistente Protein induziert. Reduzierte Transkriptspiegel von sieben Kinasen waren in den Sonnenblättern mit Fraßschäden der Buchen (2x Ozon) zu sehen. Im Gegensatz dazu wiesen zwei Kinasen erhöhte Transkriptspiegel auf.

Gegen eine Ethylen-vermittelte Signalübertragung sprechen die reduzierten mRNA-Mengen der ACC-Oxidase in den minierten und Lochfraß-geschädigten Sonnenblättern (2x Ozon). Durch Fraßschäden an Koniferen (RALPH et al., 2006b) und Pappeln (RALPH et al., 2006a) war diese allerdings induziert (RALPH et al., 2006b), sowie auch weitere Enzyme der Ethylenbiosynthese (CHRISTOPHER et al., 2004; RALPH et al., 2006b).

Insektenfraß löst oxidativen Stress aus, der Gene der Stress-, Verwundung- und Pathogenantwort induziert (HERMSMEIER et al., 2001; HUI et al., 2003; CHRISTOPHER et al., 2004; RALPH et al., 2006b; TON et al., 2007). Allerdings wiesen nur die Lochfraß-geschädigten Schattenblätter (1x Ozon) drei erhöhte Transkriptspiegel der Abwehr/Krankheit auf. Ein EST der Abwehr/Krankheit war in den minierten Sonnenblättern (2x Ozon) induziert. Allerdings waren in den Lochfraß-geschädigten Sonnenblättern unter 2x ambienten Ozon 19 ESTs der Abwehr/Krankheit reprimiert. Verminderte mRNA-Spiegel von Transkripten der Abwehr/Krankheit wurden auch in anderen Pflanzen nach Insektenschaden beobachtet (IZAGUIRRE et al., 2003; RALPH et al., 2006b).

Sekundärmetabolite spielen eine wichtige Rolle in der Abwehr von Pflanzen gegenüber Insekten. Erstens sind Sekundärmetabolite wichtige präformierte Abwehrstoffe innerhalb des Zytoplasmas der Zelle oder zweitens eingelagert in pflanzlichen strukturellen Barrieren. Drittens werden sie durch Herbivorenbefall induziert. Von daher war es erstaunlich, dass nur die Lochfraß-geschädigten Sonnenblätter unter erhöhtem Ozon und diese nur mit reduzierten Transkript-

spiegeln von ESTs des Sekundärmetabolismus reagierten. In Pappel und Koniferen waren hingegen ESTs des Sekundärmetabolismus durch Verwundung induziert (CHRISTOPHER et al., 2004; RALPH et al., 2006a; RALPH et al., 2006b).

Mittels des hierarchischen Clusters wurde ein Einfluss des Blatttyps auf die Reaktion der Insektenbeschädigung festgestellt, dieser Sachverhalt wurde von (FERNANDES et al., 2003) bestätigt. Weiterhin wurde ein deutlicher Ozoneinfluss im hierarchischen Cluster gesehen. Fütterungsversuche mit Buchenspringrüßlern ergaben eine Fraßpräferenz des Rüsslers für Blätter, die unter ambienten Bedingungen wuchsen, relativ zu Ozon-behandelten Blättern. Somit könnte die Ausstattung der jeweiligen Blätter hinsichtlich ihres Zucker-, Abwehrstoff- und Sekundärstoffniveaus unterschiedlich sein. In folgenden Studien sollte deshalb die Inhaltsstoffausstattung der Blätter untersucht werden.

Des Weiteren fiel in den SOMs vor allem die verminderten Transkriptspiegel der Lochfraßgeschädigten Sonnenblätter unter erhöhter Ozonkonzentration auf.

4.10.2 Gallenbildung durch *Mikiola fagi*

Die Buchen der beiden Ozonregime reagierten unterschiedlich auf die Gallenbildung. Dieses Erkenntnis untermauerte das hierarchische Cluster, worin keine enge Verwandtschaft zwischen den Sonnenblättern mit Galle im 1x ambienten zum 2x ambienten Ozonmilieu zu sehen war. Die SOM ließ darüber allerdings keine Aussage zu.

Durch *M. fagi* verursachte Gallen sind „sinks“ für Assimilate. Die Nachbarblätter versorgen dann die infizierten Blätter mit Assimilaten (KIRST und RAPP, 1974). Der Vergleich von *M. fagi*-befallenen Buchenblättern gegenüber unbefallenen Blättern ergaben höhere Protein- und Zuckergehalte (RAPP und KIRST, 1974). In diesem Versuch konnten keine eindeutigen Aussagen über eine Veränderung des Primärstoffwechsels und der Proteinsynthese auf Transkriptebene getroffen werden. Der Transkriptspiegel einer intramolekularen Transferase (1x Ozon), die im Zucker- und Polysaccharidstoffwechsel beteiligt ist, und der eines Aminosäuretransporters des ABC-Typ (2x Ozon) waren durch *M. fagi* reduziert.

Für eine erhöhte Photosynthese im infizierten Blatt könnte der erhöhte mRNA-Gehalt der zytosolischen Aldolase in den befallenen Sonnenblättern der Buchen (2x Ozon) sprechen.

Die Hypersensitive Reaktion (HR) ist der gewöhnliche Pflanzenresistenzmechanismus, der insbesondere gegen Pathogene wirkt, die eine intime Verbindung mit dem Wirtsorganismus haben, etwa wie Gallenbildner (FERNANDES, 1998; SANDERMANN, 1999; FERNANDES et al., 2000;

CORNELISSEN et al., 2002). HR ist eine lokale Wirt-induzierte Antwort, die durch morphologische und biochemische Veränderungen zum Tod des befallenen Gewebes und eventuell zum Tod des Erregers führt (FERNANDES et al., 2000; CORNELISSEN et al., 2002). Sie führt zur Unterbrechung der Nahrungsaufnahme und initiiert die Produktion von toxischen Metaboliten, welche zum Stillstand mikrobiellen Wachstums führen (FERNANDES et al., 2000). Außerdem kann die Wasser- und Sauerstoffversorgung des Gewebes unterbunden werden, und es kann zur Bildung von Phytoalexinen kommen. In dem 2x ambienten Ozonmilieu waren die Phenylalanin-Ammonium-Lyase und 4-Coumarat:CoLigase induziert, was eventuell auf eine Induktion des Sekundärstoffwechsels und somit auf die Bildung von Phytoalexinen, Lignin oder phenolischen Inhaltsstoffen hinweist. Jedoch zeigte die Phenylalanin-Ammonium-Lyase im ambienten Ozonmilieu reduzierte mRNA-Spiegel. Da das α -Tubulin des Zytoskeletts in beiden Behandlungen durch die Gallenbildung induziert war, könnte dies auf eine HR und damit bedingtes nekrotisches Gewebe, eine Verstärkung des Zytoskeletts des Blattes aufgrund der schweren Galle oder den Gebrauch des α -Tubulin im Gallenzytoskelett deuten.

Stressanzeichen, wie die Verminderung der Transkriptspiegel des putativen Membranproteins, des Krankheitsresistenzproteins, der Superoxiddismutase im 2x ambienten Ozonmilieu und der L-Ascorbatoxidase, waren im ambienten Milieu zu erkennen. Weiterhin war der Transkriptspiegel eines Chitinase-ähnlichen Proteins durch die Gallenbildung in beiden Milieus induziert. Diese Reaktion lässt die Vermutung zu, dass sich der Baum entweder gegen die Galle oder gegen einen sekundärinfizierenden Pilz wehrt.

Durch Gallenbildung waren insgesamt wenige Transkriptspiegel verändert. Einerseits war das akute Infektionsereignis schon abgeschlossen, andererseits wird die Buche durch regelmäßigen Befall des Gallenbildners von Jahr zu Jahr resistenter (CORNELISSEN et al., 2002).

Da die induzierte Abwehr erheblich im Wirtgenotyp (FERNANDES et al., 2003) und auch im Habitat-typ (Sonnen- und Schattenblätter) (FERNANDES et al., 2003) variiert, wäre es interessant, weitere Versuche durchzuführen, um eventuelle Unterschiede im Reaktionsspektrum aufzudecken. Durch die HR des Baumes entsteht ein brauner Hof um die Gallenbildungsstelle auf dem Blatt (FERNANDES, 1998; FERNANDES et al., 2000). Da die Gallen oft schon durch die HR abgetötet werden, bevor sie eine Größe von wenigen Millimetern erreichen (FERNANDES et al., 2000), wäre es aufschlussreich, die Unterschiede der Bäume in ihrer Genreaktion, aber auch hinsichtlich ihres Inhaltsstoffspektrums zu untersuchen.

Des Weiteren sollten die Stoffwechselforgänge des befallenen Blattes und der Galle getrennt untersucht werden. Hier wurde das infizierte Blatt zusammen mit der Galle analysiert, so dass eventuell Transkriptänderungen auf die Galle zurückgeführt werden könnten.

4.10.3 Zusammenfassende Diskussion – Kranzberger Forst, Ozon- und Insekteneinfluss

Eindeutige Unterschiede im Transkriptniveau zwischen Grund- und Abwehr- beziehungsweise Sekundärmetabolismus wurden kaum gesehen. In den minierten Schattenblättern (2x Ozon) waren ESTs des Grundmetabolismus erhöht, wobei ESTs der Abwehr/Krankheit und des Sekundärmetabolismus unverändert blieben. Die Sachlage stellte sich in anderen Studien gegensätzlich mit einer höheren Aktivität im Abwehrstoffwechsel und einer niedrigeren im Grundmetabolismus dar (HERMSMEIER et al., 2001; RALPH et al., 2006b).

Die Aussage, dass die Ozon-Behandlung die Resistenz des Wirtes durch Stimulierung des Sekundärstoffwechsels erhöht (Hypothese VI), kann nicht bewertet werden. Es wären steigende Transkripte innerhalb des Abwehr/Krankheit und des Sekundärmetabolismus im ambienten Ozonmilieu zu erwarten gewesen, allerdings wiesen die Schadbilder in den unterschiedlichen Blatttypen und Ozonbedingungen durchgängig durch alle Stoffwechselwege entweder erhöhte oder reduzierte Transkriptspiegel auf. Somit kann auch zur Hypothese I keine Aussage getroffen werden, nach der eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Parasitenbefall in unterschiedlicher Reaktionsfähigkeit des Sekundär- relativ zum Primärstoffwechsel und anhand ihrer genetischen Steuerung erkennbar ist.

In den Lochfraß-geschädigten Blättern war eine Vielzahl von ESTs beeinflusst. Allerdings zeigten die Sonnenblätter (2x Ozon) durchgehend durch alle funktionellen Klassen überwiegend reduzierte Transkriptspiegel, unter ambienten Bedingungen reagierten sie hingegen kaum. Das spricht für einen deutlichen Ozoneinfluss, wie er in allen Schadbildern deutlich zu erkennen war. Bestätigt wurde dieser Sachverhalt von (EPRON et al., 1996) und ist besonders gut durch die Aufreihung der Transkriptspiegel nach funktionellen Klassen zu sehen. Diese Aussage wurde durch die Transkriptspiegel und das hierarchische Cluster zusätzlich verifiziert. Unter den gegebenen Ozonbedingungen spielte auch der Blatttyp eine erhebliche Rolle in der Reaktion auf den Insektenbefall, was ebenso deutlich in der Aufreihung der Transkriptspiegel zu erkennen war.

4.11 Zusammenfassende Diskussion unter Berücksichtigung von SFB-Hypothesen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden der Einfluss von erhöhten CO₂- und Ozon-Expositionen und der Einfluss eines Pathogens sowie eines Endophyten auf die Europäische Buche untersucht. Ferner wurde der Bogen von kontrollierten Bedingungen, wie in den Expositionskammern, bis hin zu kaum kontrollierten Bedingungen im Freilandversuch des Kranzberger Forstes gespannt. Außerdem wurden verschiedene Bereiche der ontogenetischen Skala anhand von drei- bis siebenjährigen und adulten Buchen abgedeckt.

Im Folgenden werden die drei in der Einleitung erwähnten SFB-Hypothesen anhand der erhaltenden Ergebnisse bewertet.

SFB-Hypothese I: Erhöhte Anfälligkeit gegenüber Parasitenbefall ist in unterschiedlicher Reaktionsfähigkeit des Sekundär- relativ zum Primärstoffwechsel und anhand deren genetischen Steuerung erkennbar.

Die Buchen des Klimakammerversuches unter 1x ambienten CO₂-Bedingungen mit nachfolgender *P. citricola*-Infektion wiesen induzierte Transkripte innerhalb der Abwehr/Krankheit sowie des Sekundärmetabolismus auf. Dieses deutet auf eine genetische Umsteuerung hin. Allerdings müssten die Transkriptdaten mit den weiteren erhobenen Daten des Versuches verglichen werden, um eine Aussage über die Anfälligkeit der Buchen unter den verschiedenen CO₂-Bedingungen treffen zu können.

Da sich der Endophyt *Apiogomonia errabunda* nicht in den Gewächshausbuchen etablieren konnte, wurde keine Bewertung der Hypothese I vorgenommen. Auch die Ergebnisse der Insekten-geschädigten Buchen ließen keine Bewertung der Hypothese I zu.

SFB-Hypothese VI: Die Anfälligkeit der Pflanze steigt mit zunehmender Kohlendioxid-(CO₂)-Konzentration der Luft durch Stimulierung des Primärstoffwechsels, Ozon-Behandlung hingegen erhöht die Resistenz des Wirtes durch Stimulierung des Sekundärstoffwechsels.

Die Ergebnisse der SSH-Banken unterstützten die Hypothese VI. Für eine Stimulierung des Sekundärstoffwechsels durch Ozon sprechen die in den SSH-Banken vertretenden ESTs der Abwehr/Krankheit. Weiterhin steigerten die Buchen zu den frühen Probennahmezeitpunkten

durch die Ozonbehandlung die Transkription und somit die Proteinsynthese. Ferner war ein hoher Anteil an ESTs der Zellstruktur verändert, dieses deutet auf den Ausbau des mechanischen Schutzes und des Photosyntheseapparates hin. Die Folge daraus wäre die vermehrte Ressourcengewinnung für die Bildung von Sekundärmetaboliten. Dieses konnte durch den hohen Anteil von ESTs des Sekundärmetabolismus in der späten SSH-Bank untermauert werden.

Durch erhöhtes CO₂ zeigten die jüngeren Blätter des Klimakammerversuches erhöhte Transkriptspiegel im Bereich des Grundstoffwechsels. Die CO₂-behandelten Buchen des Gewächshausversuches bestätigen das. Im Gegensatz dazu waren in den Klimakammerbuchen nach 16 Tagen vermehrt ESTs der Signaltransduktion, der Abwehr/Krankheit und des Sekundärmetabolismus verändert. Ersteres würde die Hypothese VI unterstützen. Allerdings besaßen die CO₂-behandelten Buchen des Gewächshauses gegenüber den Buchen unter ambienten Bedingungen höhere Gehalte an Abwehr-relevanten löslichen Inhaltsstoffen.

Die Ergebnisse des Klimakammerversuches bei Buchen unter 1x und 2x ambienten CO₂-Bedingungen mit nachfolgender *P. citricola*-Infektion stützen ebenfalls die Hypothese VI. So zeigten die Buchen unter ambienten Bedingungen zu den ersten Probennahmeterminen einen gesteigerten Proteinstoffwechsel. Dieser Sachverhalt deutet auf eine Abwehrreaktion der Buchen hin, wohingegen die Buchen unter erhöhtem CO₂ eher eine Reduktion des Proteinstoffwechsels aufwiesen. Einerseits könnten die Buchen (2x CO₂) über eine insgesamt höhere strukturelle Resistenz durch erhöhte Einlagerung von Kohlenhydraten verfügen (HIBBERD et al., 1996; RUNION, 2003), andererseits bietet der hohe Kohlenhydratgehalt der Pflanze eine hohe Attraktivität für den bodenbürtigen Pilz *P. citricola* (BRAGA et al., 2006). Somit könnte die Infektion im höheren CO₂-Milieu früher stattgefunden haben. Diese Vermutung wurde durch die veränderten Transkriptspiegel mittels Aufreihung unterstützt. Trotzdem reagierten diese Buchen erst nach 16 Tagen mit der Induktion Abwehr-relevanter Transkripte. Im Gegensatz dazu zeigten die Buchen unter ambienten Bedingungen bereits zu den frühen Probennahmezeitpunkten erhöhte Transkriptspiegel Abwehr-relevanter ESTs.

Insgesamt verfügten die Buchen unter ambienten Bedingungen im Gewächshausversuch über unzureichenden Schutz gegen Stress. Sie waren im Vergleich zu den Buchen unter 2x ambientem CO₂, mit weniger löslichen Inhaltsstoffen ausgestattet und reduzierten signifikant ihre

maximale Quantenausbeute durch die *A. errabunda*-Infektion. Diese Erkenntnis widerspricht der Hypothese VI.

Durch die Ozon-behandelten Gewächshausbuchen wurde die Hypothese VI allerdings bestätigt. Denn durch die Ozonbehandlung stiegen die mRNA-Konzentrationen von ESTs der Ethylen-Synthese, der Abwehr/Krankheit, des Protein- und Sekundärstoffwechsels. Weiterhin waren die löslichen Inhaltsstoffe in den Ozon-gestressten Buchen signifikant höher als in den Buchen unter ambienten Bedingungen. Durch die Infektion mit *A. errabunda* nahmen in den Buchen unter ambienten Bedingungen die Gehalte an Hydroxyzimtsäuren sowie der Flavan/Flavanone zu, in der Ozon-behandelten Variante hingegen ab. Insgesamt verfügten wie oben beschrieben die Buchen unter ambienten Bedingungen über einen unzureichenden Schutz gegen Stress.

Ein wichtiger Einflussfaktor bezüglich der Reaktion der Buchen auf erhöhte Ozonexpositionen war der Kulturtyp. So unterstützen die Ergebnisse der Buchen in Reinkultur die Aussage der Hypothese VI, durch erhöhte mRNA-Gehalte von Transkripten der Abwehr/Krankheit und des Sekundärmetabolismus. Die Ozon-antwortenden ESTs waren wie beispielsweise der WRKY in den Buchen der Monokultur erhöht. Allerdings reagierten sie erst nach drei Tagen auf den zusätzlichen Ozonpeak von 200 ppb.

Die Buchen in Konkurrenz mit Fichte reagierten kaum auf den Ozonpeak. Dafür bieten sich zwei Erklärungsansätze an. Entweder waren die Buchen durch die interspezifische Konkurrenz schon ausreichend gegen Ozon gestärkt oder sie waren durch die Konkurrenzsituation so gestresst, dass eine Reaktion auf Ozon nicht mehr möglich war.

Eventuell standen den Buchen in Reinkultur vermehrt Ressourcen zur Verfügung, Schutzstoffe gegen Ozon zu bilden, was die Induktion von ESTs des Sekundärstoffwechsels und der Abwehr und Krankheit erklären würde.

Innerhalb des Lysimeterversuches bestätigten die durch Ozon erhöhten Transkripte der Ethylen-Biosynthese, der Abwehr/Krankheit sowie des BAT1 Transporters die Hypothese VI.

Innerhalb der Insekten-geschädigten Buchen konnte keine Bewertung der Hypothese VI vorgenommen werden. So wären steigende Transkripte innerhalb der Abwehr/Krankheit und Sekundärmetabolismus unter 1x ambientem Ozon zu erwarten gewesen. Allerdings wiesen die Schad-

bilder in den unterschiedlichen Blatttypen und Ozonbedingungen durchgängig über alle Stoffwechselwege entweder erhöhte oder reduzierte Transkriptspiegel auf.

SFB-Hypothese VIII: Unabhängig von der pflanzlichen Lebensform (krautig oder verholzend) bestimmen gleiche oder analoge Metabolite und genetische sowie physiologische Regelmechanismen das Ausmaß der Fitness.

Die Hypothese VIII kann bestätigt werden. Viele hier veränderte Transkriptspiegel wurden auch in krautigen Pflanzen (*A. thaliana* Ökotypen, Kartoffel, Tomate, Sojabohne) nach Ozon-, Pathogenstress sowie nach CO₂-Behandlung gefunden.

Über die Hypothesenbewertung hinaus wurden weitere wichtige Erkenntnisse gewonnen. So wurden im Jahr 2005 Ozon-veränderte Transkriptspiegel in den Lysimeterbüschen beobachtet, die auf eine beschleunigte Seneszenz durch Ozon hinweisen. Viele Studien bestätigen diesen Sachverhalt (NUNN et al., 2002; NUNN et al., 2005; GIELEN et al., 2007). Untermauert wird diese Erkenntnis auch durch Versuche an *Betula pendula* ROTH, wo die Zunahme an Gesamtphenolen und Quercetin (wie auch hier im Lysimeterversuch) mit einer durch Ozon-bedingten beschleunigten Seneszenz erklärt wurde (SALEEM et al., 2001).

Weitere wichtige Einflussfaktoren für die Reaktion der Pflanze auf erhöhtes Ozon waren Außenfaktoren, Baumalter und Blatttyp. Die Buchen des Kranzberger Forstes im Vergleich zu den Versuchen im Gewächshaus und in den Expositionskammern reagierten auf Transkriptebene kaum auf die kontinuierliche Ozonexposition und ließen somit keine Bewertung der Hypothesen zu. Buchen unter kontrollierten Bedingungen waren anfälliger für Ozon als Buchen unter Freilandbedingungen (BAUMGARTEN et al., 2000).

Adulte Buchen verfügen durch ihre Inhaltsstoffausstattung (NEITZKE und THERBURG, 2000; WIESER et al., 2003; HERBINGER et al., 2005) über eine höhere strukturelle Resistenz und können Ozonstress besser abpuffern als junge Buchen. Deswegen scheint der saisonale Ozoneinfluss von hohen Ozonpeaks kein großes akutes Risiko für alte Bäume darzustellen (BAUMGARTEN et al., 2000). Ein zusätzlicher Faktor ist der Gewöhnungseffekt (BUSSOTTI et al., 2005), da die adulten Buchen schon acht Jahre lang erhöhten Ozonkonzentrationen ausgesetzt waren.

Bedeutend für die Reaktion auf den Ozonstress ist weiterhin der Blatttyp. Die Ergebnisse der Insekten-geschädigten Kranzberger Forst Buchen unterstützen diese Aussage. Insgesamt

reagierten Sonnen- und Schattenblätter der Kranzberger Forst Buchen (Ozon- und Insektenversuch) ganz unterschiedlich hinsichtlich ihres Transkriptspiegelmusters auf die erhöhte Ozonexposition. Dieses mag zum einen an der unterschiedlichen Morphologie von Sonnen- und Schattenblättern liegen, zum anderen an der Kronenposition (HERBINGER et al., 2005).

Da bei diesen Versuchen, soweit es die Versuchsbedingungen zuließen, die Realsituation im Vordergrund stand, verfügten die Buchen über unterschiedliche Genotypen, wovon die Reaktion der Buchen auf die jeweilige Behandlung abhing (EL KOHEN et al., 1993; THOMAS und JASIENSKI, 1996; KOHUT, 2003; BUSSOTTI et al., 2005). Darüber hinaus kann die Luftqualität zur Selektion dienen, um den Resistenzspiegel der Pflanzenpopulation zu erhöhen (TAYLOR et al., 1991), dieses wurde bei Schwermetallen (MACNAIR, 1981; BAKER, 1987) festgestellt.

5 LITERATURVERZEICHNIS

AINSWORTH, E. A., ROGERS, A., VODKIN, L. O., WALTER, A. und SCHURR, U. (2006): The effects of elevated CO₂ concentration on Soybean gene expression. An analysis of growing and mature leaves. *Plant Physiology* 142, 135-147.

ANEJA, M. K., SHARMA, S., FLEISCHMANN, F., STICH, S., HELLER, W., BAHNWEG, G., MUNCH, J. C. und SCHLOTTER, M. (2006): Microbial colonization of beech and spruce litter - Influence of decomposition site and plant litter species on the diversity of microbial community. *Microbial Ecology* 52, 127-135.

AONO, M., KANNA, M., OGAWA, D., MURATA, Y., RAKWAL, R., AGRAWAL, G. K., TAMOGAMI, S., IWAHASHI, H., KUBO, A., TAMAOKI, M., NAKAJIMA, N. und SAJI, H. (2005): Regulation of ascorbate contents by jasmonate-mediated signaling pathway in *Arabidopsis* during ozone exposure. *Phyton - Annales Rei Botanicae* 45, 201-207.

ARNOLD, R. M. und RAHE, J. E. (1976a): Effects of 15% CO₂ on the susceptibility of *Phaseolus vulgaris* to *Colletotrichum lindemuthianum*. *Canadian Journal of Bot* 54, 1035-1043.

ARNOLD, R. M. und RAHE, J. E. (1976b): Effects of 15% CO₂ on germination, germ tube elongation, and sporulation in cultures of *Colletotrichum lindemuthianum*. *Canadian Journal of Bot* 54, 1044-1048.

BAHL, A., LOITSCH, S. M. und KAHL, G. (1994): Transcriptional activation of plant defence genes by short-term air pollutant stress. *Environmental Pollution* 3, 221-227.

BAHWEG, G., HELLER, W., STICH, S., KNAPPE, C., BETZ, G., HEERDT, C., KEHR, R. D., ERNST, D., LANGEBARTELS, C., NUNN, A. J., ROTHENBURGER, J., SCHUBERT, R., WALLIS, P., MÜLLER-STARCK, G., WERNER, H., MATYSSEK, R. und SANDERMANN, H. (2005): Beech leaf colonization by the endophyte *Apiognomonium errabunda* dramatically depends on light exposure and climatic conditions. *Plant Biology* 7, 659-669.

BAKER, A. J. M. (1987): Metal tolerance. *New Phytologist* 106, 93-111.

BALDWIN, I. T. und PRESTON, C. A. (1999): The eco-physiological complexity of plant responses to insect herbivores. *Planta* 208, 137-145.

BASSO, M., LAXALT, A. M., MADRID, E. A. und LAMATTINA, L. (1996): Ubiquitin messenger RNA accumulation in potato leaves as a response to the pathogenic fungus *Phytophthora infestans*. *Biologia Plantarum* 38, 119-122.

BAUMGARTEN, M., WERNER, H., HÄBERLE, K.-H., EMBERSON, L. D., FABIAN, P. und MATYSSEK, R. (2000): Seasonal ozone response of mature beech trees (*Fagus sylvatica* L.) at high altitude in the Bavarian forest (Germany) in comparison with young beech grown in the field and phytotrons. *Environmental Pollution* 109, 431-442.

BELIGNI, M. V., LAXALT, A. M. und LAMATTINA, L. (1999): Temporal and spatial patterns of GAPDHc mRNA accumulation during an incompatible potato - *Phytophthora infestans* interaction. Comparison with a compatible interaction. *Physiologia Plantarum* 105, 280-287.

BETZ, G. A. (2005): Regulation des Shikimatstoffwechsels der Europäischen Buche (*Fagus sylvatica* L.) unter dem Einfluß von Ozon. Promotion, GSF, TUM.

BIOLLEY, J. P., KANOUN, M. und GOULAS, P. (2002): The response of vacuolar phenolic content of common bean (*Phaseolus vulgaris* cv. Bergamo) to a chronic ozone exposure: questions and hypotheses. *Functional Plant Biology* 29, 1-11.

BIOLLEY, J. P., LAUGA, B., CAGNON, C., DURAN, R., SALVADO, J. C. und GOULAS, P. (1998): Phenolic pattern of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as an indicator of chronic ozone stress. *Water Air and Soil Pollution* 106, 355-368.

BJÖRKMANN, O. und DEMMING, B. (1987): Photon yield of CO₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77K among vascular plants of diverse origins. *Planta* 170, 489-504.

BLASCHKE, L., FORSTREUTER, M., SHEPPARD, L. J., LEITH, I. K., MURRAY, M. B. und POLLE, A. (2002): Lignification in beech (*Fagus sylvatica* L.) grown at elevated CO₂ concentration: interaction with nutrient availability and leaf maturation. *Tree Physiology* 22, 469-477.

BÖHM, J., HAHN, A., SCHUBERT, R., BAHNWEG, G., ADLER, N., NECHWATAL, J., OEHLMANN, R. und OSSWALD, W. (1999): Real-time quantitative PCR: DNA determination in isolated spores of the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and monitoring of *Phytophthora infestans* and *Phytophthora citricola* in their respective host plants. *Journal of Phytopathology - Phytopathologische Zeitschrift* 147, 409-416.

BOOKER, F. L. und MILLER, J. E. (1998): Phenylpropanoid metabolism and phenolic composition of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] leaves following exposure to ozone. *Journal of Experimental Botany* 49, 1191-1202.

BORGHETTI, M., LEONARDI, S., RASCHI, A., SNYDERMAN, D. und TOGNETTI, R. (1993): Ecotypic variation of xylem embolism, phenological traits, growth parameters and allozyme characteristics in *Fagus sylvatica* L. *Functional Ecology* 7, 713-720.

BORTIER, K., CEULEMANS, R. und DE TEMMERMAN, L. (2000): Effects of ozone exposure on growth and photosynthesis of beech seedlings (*Fagus sylvatica*). *New Phytologist* 146, 271-280.

BRAGA, M. R., AIDAR, M. P. M., MARABESI, M. A. und DE GODOY, J. R. L. (2006): Effects of elevated CO₂ on the phytoalexin production of two soybean cultivars differing in the resistance to stem canker disease. *Environmental and Experimental Botany* 58, 85-92.

BROSCHÉ, M. und STRID, A. (1999): The mRNA-binding ribosomal protein S26 as a molecular marker in plants: molecular cloning, sequencing and differential gene expression during environmental stress. *Biochimica et Biophysica Acta* 1445, 342-344.

BUSCHMANN, K., ETSCHIED, M., RIESNER, D. und SCHOLZ, F. (1998): Accumulation of a porin-like mRNA and a metallothionein-like mRNA in various clones of Norway spruce upon long-term treatment with ozone. *European Journal of Forest Pathology* 28, 307-322.

BUSSOTTI, F., DESOTGIU, R., CASCIO, C., STRASSER, R. J., GEROSA, G. und MARZUOLI, R. (2007): Photosynthesis responses to ozone in young trees of three species with different sensitivities, in a 2-year open-top chamber experiment (Curno, Italy). *Physiologia Plantarum* 130, 122-135.

BUSSOTTI, F., PANCRAZI, M., MATTEUCCI, G. und GEROSA, G. (2005): Leaf morphology and chemistry in *Fagus sylvatica* (beech) trees as affected by site factors and ozone: results from CONECOFOR permanent monitoring plots in Italy. *Tree Physiology* 25, 211-219.

BUTIN, H. (1989): *Krankheiten der Wald- und Parkbäume*. Thieme Verlag, Stuttgart, New York.

CAMPBELL, W. J. (1997): Intraspecific variation of rubisco and rubisco activase protein levels in tomato leaves grown at elevated CO₂ concentration. *Plant Physiology* 114, Supplement 1056.

CARROLL, G. und PETRINI, O. (1983): Patterns of substrate utilization by some fungal endophytes from coniferous foliage. *Mycologia* 75, 53-63.

CHAKRABORTY, S. und DATTA, S. (2003): How will plant pathogens adapt to host plant resistance at elevated CO₂ under a changing climate? *New Phytologist* 159, 733-742.

CHENG, S. H., MOORE, B. und SEEMANN, J. R. (1998): Effects of short- and long-term elevated CO₂ on the expression of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase genes and carbohydrate accumulation in leaves of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiology* 116, 715-23.

CHIRON, H., DROUET, A., CLAUDOT, A.-C., ECKERSKORN, C., TROST, M., HELLER, W., ERNST, D. und SANDERMANN JR., H. (2000a): Molecular cloning and functional expression of a stress-induced multifunctional O-methyltransferase with pinosylvic methyltransferase activity from Scot pine (*Pinus sylvestris* L.).

CHIRON, H., DROUET, A., LIEUTIER, F., PAYER, H.-D., ERNST, D. und SANDERMANN JR., H. (2000b): Gene induction of stilbene biosynthesis in Scots Pine in response to ozone treatment, wounding, and fungal infection. *Plant Physiology* 124, 865-872.

CHRISTOPHER, M. E., MIRANDA, M., MAJOR, I. T. und CONSTABEL, C. P. (2004): Gene expression profiling of systemically wound-induced defenses in hybrid poplar. *Planta* 219, 936-47.

CLARKE, H. R. G., LAWRENCE, S. D., FLASKERUD, J., KORHNAK, T. E., GORDON, M. P. und DAVIS, J. M. (1998): Chitinase accumulates systemically in wounded poplar trees. *Physiologia Plantarum* 103, 154-161.

COHEN, S. D. (2004): Endophytic-host selectivity of *Discula umbrinella* on *Quercus alba* and *Quercus rubra* characterized by infection, pathogenicity and mycelial compatibility. *European Journal of Plant Pathology* 110, 713-721.

COMPS, B., THIÉBAUT, B. und MERZEAU, D. (1991): Genetic variation in European Beech stands (*Fagus sylvatica* L.). In: Genetic Variation in European Populations of Forest Trees (MÜLLER-STARCK, G. und ZIEHE, M., eds.), Frankfurt am Main: Sauerländer.

CONKLIN, P. L. und LAST, L. L. (1995): Differential accumulation of antioxidant mRNAs in *Arabidopsis thaliana* exposed to ozone. *Plant Physiology* 109, 203-212.

CORNELISSEN, T., NEGREIROS, D. und FERNANDES, G. W. (2002): Plant Resistance against gall-forming insects: the role of hypersensitivity. In: Mechanisms and Deployment of Resistance in Trees to Insects (WAGNER, M. R. E. A., eds.), Printed in the Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 137-152.

D'HAESE, D., HOREMANS, N., DE COEN, W. und GUISEZ, Y. (2006): Identification of late O₃-responsive genes in *Arabidopsis thaliana* by cDNA microarray analysis. *Physiologia Plantarum* 128, 70-79.

DENK, T. (1999a): The taxonomy of *Fagus* in western Eurasia, 1: *Fagus sylvatica* subsp. *orientalis* (= *F. orientalis*). *Feddes Repertorium* 110, 177-200.

DENK, T. (1999b): The taxonomy of *Fagus* in western Eurasia, 2: *Fagus sylvatica* subsp. *sylvatica* (= *F. orientalis*). *Feddes Repertorium* 110, 381-412.

DICKE, M. (1999): Are herbivore-induced plant volatiles reliable indicators of herbivore identity to foraging carnivorous arthropods? *Entomologia Experimentalis Et Applicata* 91, 131-142.

DÖRFLER, F. und ROSELT, G. (1965): *Unsere Heilpflanzen*. Stuttgart, Franckh'sche Verlagsbuchhandlung.

DRUART, N., RODRIGUEZ-BUEY, M., BARRON-GAFFORD, G., SJODIN, A., BHALERAO, R. und HURRY, V. (2006): Molecular targets of elevated [CO₂] in leaves and stems of *Populus deltoides*: implications for future tree growth and carbon sequestration. *Functional Plant Biology* 33, 121-131.

ECKEY-KALTENBACH, H., ERNST, D., HELLER, W. und SANDERMANN JR, H. (1994): Biochemical plant responses to ozone. *Plant Physiology* 104, 67-74.

EL KOHEN, A., VENET, L. und MOUSSEAU, M. (1993): Growth and photosynthesis of two deciduous forest species at elevated carbon dioxide. *Functional Ecology* 7, 480 - 486.

ELSTNER, E. F., OSSWALD, W. und SCHNEIDER, I. (2002): *Phytopathologie*. Spektrum Akademischer Verlag.

EPRON, D., LIOZON, R. und MOUSSEAU, M. (1996): Effects of elevated CO₂ concentration on leaf characteristics and photosynthetic capacity of beech (*Fagus sylvatica*) during the growing season. *Tree Physiology* 16, 425-432.

ERNST, D., BODEMANN, A., SCHMELZER, E., LANGEBARTELS, C. und SANDERMANN JR, H. (1996): Beta-1,3-glucanase mRNA is locally, but not systemically induced in *Nicotiana Tabacum* L. cv. BEL W3 after ozone fumigation. *Journal of Plant Physiology* 148, 215-221.

ERNST, D., LIEGL, I., KIEFER, E., SEIDLITZ, H., HELLER, W. und SANDERMANN JR, H. (2001): Early changes in mRNA populations in leaves of ultraviolet-B-treated European beech (*Fagus sylvatica* L.) seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum* 23, 343-349.

ERNST, D., SCHRAUDNER, M., LANGEBARTELS, C. und SANDERMANN JR, H. (1992): Ozone-induced changes of mRNA levels of beta-1,3-glucanase, chitinase and "pathogenesis-related" protein 1b in tobacco plants. *Plant Molecular Biology* 20, 673-682.

ERWIN, D. C. und RIBEIRO, O. K. (1996): *Phytophthora Diseases Worldwide*. St. Paul, Minnesota, APS Press, American Phytopathological Society.

ESCHERICH, K. (1923): *Forstinsekten Mitteleuropas*. Berlin, Verlagsbuchhandlung Paul Parey.

EULGEM, T., RUSHTON, P. J., ROBATZEK, S. und SOMSSICH, I. E. (2000): The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends in Plant Science* 5, 199-206.

FERNANDES, G. W. (1998): Hypersensitivity as a phenotypic basis of plant induced resistance against a galling insect (*Diptera: Cecidomyiidae*). *Population Ecology* 27, 260-267.

FERNANDES, G. W., CORNELISSEN, T., ISAIAS, R. M. S. und LARA, T. A. F. (2000): Plants fight gall formation: Hypersensitivity. *Clência e Cultura Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science* 52, 49-54.

FERNANDES, G. W., DUARTE, H. und LUTTGE, U. (2003): Hypersensitivity of *Fagus sylvatica* L. against leaf galling insects. *Trees-Structure and Function* 17, 407-411.

FEUCHT, W., TREUTTER, D. und CHRIST, E. (1994): Accumulation of flavanols in yellowing beech leaves from forest decline sites. *Tree Physiology* 14, 403-412.

FLEISCHMANN, F., GÖTTLEIN, A., RODENKIRCHEN, H., LÜTZ, C. und ORWALD, W. (2004): Biomass, nutrient and pigment content of beech (*Fagus sylvatica*) saplings infected with *Phytophthora citricola*, *P. cambivora*, *P. pseudosyringae* and *P. undulata*. *Forest Pathology* 34, 79-92.

FLEISCHMANN, F., SCHNEIDER, D., MATYSSEK, R. und ORWALD, W. F. (2001): Investigation on net CO₂ assimilation, transpiration and root growth of *Fagus sylvatica* infected with four different *Phytophthora* species. *Plant Biology* 4, 144-152.

GALLIANO, H., CABANÉ, M., ECKERSKORN, C., LOTTSPEICH, F., SANDERMANN JR, H. und ERNST, D. (1993): Molecular cloning, sequence analysis and elicitor/ozone-induced accumulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase from Norway spruce (*Picea abies* L.). *Plant Molecular Biology* 23, 145-156.

GIELEN, B., LÖW, M., DECKMYN, G., METZGER, U., FRANCK, F., HEERDT, C., MATYSSEK, R., VALCKE, R. und CEULEMANS, R. (2007): Chronic ozone exposure effects leaf senescence of adult beech trees: a chlorophyll fluorescence approach. *Journal of Experimental Botany* 58, 785-795.

GLICK, R. E., SCHLAGNHAUFER, C. D., ARTECA, R. N. und PELL, E. J. (1995): Ozone-induced ethylene emission accelerates the loss of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and nuclear-encoded mRNAs in senescing potato leaves. *Plant Physiology* 109, 891-898.

GRAMMEL, R. (1989): Forstbenutzung. Hamburg und Berlin, Parey.

GRAMS, T. E. E. (2005): Pflanzenphysiologisches Praktikum 2005/2006.

GRAMS, T. E. E., ANEGG, S., HÄBERLE, K. H., LANGEBARTELS, C. und MATYSSEK, R. (1999): Interactions of chronic exposure to elevated CO₂ and O₃ levels in the photosynthetic light and dark reactions of European beech (*Fagus sylvatica*). *New Phytologist* 144, 95-107.

GRAMS, T. E. E., KOZOVITS, A. R., REITER, I. M., WINKLER, J. B., SOMMERKORN, M., BLASCHKE, H., HÄBERLE, K. H. und MATYSSEK, R. (2002): Quantifying competitiveness in woody plants. *Plant Biology* 4, 153-158.

GUPTA, P., DUPLESSIS, S., WHITE, H., KARNOSKY, D. F., MARTIN, F. und PODILA, G. K. (2005): Gene expression patterns of trembling aspen trees following long-term exposure to interacting elevated CO₂ and tropospheric O₃. *New Phytologist* 167, 129-41.

HABERER, K., HERBINGER, K., ALEXOU, M., TAUSZ, M. und RENNENBERG, H. (2007): Antioxidative defence of old growth beech (*Fagus sylvatica*) under double ambient O₃ concentrations in a free-air exposure system. *Plant Biology* 9, 215-226.

HEIDENREICH, B., HABERER, G., MAYER, K., SANDERMANN, H. und ERNST, D. (2005): cDNA array-analysis of mercury- and ozone-induced genes in *Arabidopsis thaliana*. *Acta Physiologiae Plantarum* 27, 45-51.

HERBINGER, K., THEN, C., LÖW, M., HABERER, K., ALEXOUS, M., KOCH, N., REMELE, K., HEERDT, C., GRILL, D., RENNENBERG, H., HÄBERLE, K. H., MATYSSEK, R., TAUSZ, M. und WIESER, G. (2005): Tree age dependence and within-canopy variation of leaf gas exchange and antioxidative defence in *Fagus sylvatica* under experimental free-air ozone exposure. *Environmental Pollution* 137, 476-482.

HERMSMEIER, D., SCHITTKO, U. und BALDWIN, I. T. (2001): Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (*Lepidoptera*, *Sphingidae*) and its natural host *Nicotiana attenuata*. I. Large-scale changes in the accumulation of growth- and defense-related plant mRNAs. *Plant Physiology* 125, 683-700.

HIBBERD, J. M., WHITBREAD, R. und FARRAR, J. F. (1996): Effect of elevated concentrations of CO₂ on infection of barley by *Erysiphe graminis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 48, 37-53.

HOTOVY, R. (1948): *Fagus sylvatica* L., Rotbuche. *Pharmazie* 3, 513-523.

HUI, D. Q., IQBAL, J., LEHMANN, K., GASE, K., SALUZ, H. P. und BALDWIN, I. T. (2003): Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (*Lepidoptera*, *Sphingidae*) and its natural host *Nicotiana attenuata*: V. Microarray analysis and further characterization of large-scale changes in herbivore-induced mRNAs. *Plant Physiology* 131, 1877-1893.

IZAGUIRRE, M. M., SCOPEL, A. L., BALDWIN, I. T. und BALLARE, C. L. (2003): Convergent responses to stress. Solar ultraviolet-B radiation and *Manduca sexta* herbivory elicit overlapping

transcriptional responses in field-grown plants of *Nicotiana longiflora*. *Plant Physiology* 132, 1755-1767.

JASINSKI, M., STUKKENS, Y., DEGAND, H., PURNELLE, B., MARCHAND-BRYNAERT, J. und BOUTRY, M. (2001): A plant plasma membrane ATP binding cassette-type transporter is involved in antifungal terpenoid secretion. *Plant Cell* 13, 1095-1107.

JEHNES, S., BETZ, G., BAHNWEIG, G., HABERER, G., SANDERMANN, H. und RENNENBERG, H. (2007): Tree internal signalling and defence reactions under ozone exposure in sun and shade leaves of European Beech (*Fagus sylvatica* L.) trees. *Plant Biology* 9, 253-264.

JENSEN, P. B. (1948): Formation of galls by *Mikiola fagi*. *Physiologia Plantarum* 1, 95-108.

JUNG, T. (2004): *Phytophthora* schädigt Buchenbestände in ganz Bayern.

JUNG, T. und BLASCHKE, H. (1996): *Phytophthora* root rot in declining forest trees. *Phyton* 36, 95-102.

JWA, N. S. und WALLING, L. L. (2001): Influence of elevated CO₂ concentration on disease development in tomato. *New Phytologist* 149, 509-518.

KANGASJÄRVI, J., TALVINEN, J., UTRIAINEN, M. und KARJALAINEN, R. (1994): Plant defence systems induced by ozone. *Plant, Cell and Environment* 17, 783-794.

KANOUN, M., GOULAS, M. J. P. und BIOLLEY, J. P. (2001): Effect of a chronic and moderate ozone pollution on the phenolic pattern of bean leaves (*Phaseolus vulgaris* L. cv Nerina), relations with visible injury and biomass production. *Biochemical Systematics and Ecology* 29, 443-457.

KANOUN, M., GOULAS, P. und BIOLLEY, J. P. (2003): Describing and modelling ozone-dependent variation in flavonoid content of bean (*Phaseolus vulgaris* cv. Bergamo) leaves: a particular dose-response relationship analysis. *Functional Plant Biology* 30, 561-570.

KIEFER, E., HELLER, W. und ERNST, D. (2000): A simple and efficient protocol for isolation of functional RNA from plant tissues rich in secondary metabolites. *Plant Molecular Biology Reporter* 18, 33-39.

KIRST, G. O. und RAPP, H. (1974): Zur Physiologie der Galle von *Mikiola fagi* H_{TR}G. auf Blättern von *Fagus sylvatica* L. 2. Transport ¹⁴C-markierter Assimilate aus dem befallenen Blatt und aus Nachbarblättern in die Galle. *Biochemische Physiologie Pflanzen (BPP)* 165, 445-455.

KLIEBENSTEIN, D. J., MONDE, R. A. und LAST, R. L. (1998): Superoxide dismutase in Arabidopsis: An eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization. *Plant Physiology* 118, 637-650.

KLIMETZEK, D. (1992): Schädlingsbelastung der Waldbäume in Mitteleuropa und Nordamerika. *Forstwissenschaftliches Centralblatt* 111, 61-69.

KNIGGE, W. und SCHULZ, H. (1966): Grundriss der Forstbenutzung. Hamburg, Berlin, Parey.

KOCH, J. R., SCHERZER, A. J., ESHITA, S. M. und DAVIS, K. R. (1998): Ozone sensitivity in hybrid poplar is correlated with a lack of defense-gene activation. *Plant Physiology* 118, 1243-1252.

KOHONEN, T. (1990): The Self-Organizing Map. *Proceedings of the IEEE* 78, 1464 -1475.

KOHUT, R. (2003): The long-term effects of carbon dioxide on natural systems: issues and research needs. *Environment International* 29, 171-180.

KOMBRINK, E. und SOMSSICH, I. E. (1995): Defense responses of plants to pathogens. *Advances in Botanical Research* 21, 1-34.

KOZOVITS, A. R., MATYSSEK, R., BLASCHKE, H., GÖTTLEIN, A. und GRAMS, T. E. E. (2005): Competition increasingly dominates the responsiveness of juvenile beech and spruce to elevated CO₂ and/or O₃ concentrations throughout two subsequent growing seasons. *Global Change Biology* 11, 1387-1401.

KRAMER, H. (1988): *Waldwachstumslehre*. Hamburg, Berlin, Parey.

KUBISKE, M. E., QUINN, V. S., MARQUARDT, P. E. und KARNOSKY, D. F. (2007): Effects of elevated atmospheric CO₂ and/or O₃ on intra- and interspecific competitive ability of aspen. *Plant Biology* 9, 342-355.

LANGEBARTELS, C., HELLER, W., FÜHRER, G., LIPPERT, M., SIMONS, S. und SANDERMANN, H. (1998): Memory effects in the action of ozone on conifers. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 41, 62-72.

LANGEBARTELS, C., SCHRAUDNER, M., HELLER, W., ERNST, D. und SANDERMANN JR., H. (2002): Oxidative stress and defense reactions in plants exposed to air pollutants and UV-B radiation. *Oxidative stress in Plants*. London, Taylor and Francis, 105-135.

LAXALT, A. M., CASSIA, R. O., SANLLORENTI, P. M., MADRID, E. A., ANDREU, A. B., DALEO, G. R., CONDE, R. D. und LAMATTINA, L. (1996): Accumulation of cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase RNA under biological stress conditions and elicitor treatments in potato. *Plant Molecular Biology* 30, 961-72.

LEONARDI, S. und MENOZZI, P. (1995): Genetic variability of Beech (*Fagus sylvatica* L.) in Italy. In: *Population Genetics and Genetic Conservation of Forest Trees* (BARADAT, P., ADAMS, W. T. und MÜLLER-STARCK, G., eds.), Amsterdam: Academic Publishing, 199.

LEVERENZ, J. W., BRUHN, D. und SAXE, H. (1999): Responses of two provenances of *Fagus sylvatica* seedlings to a combination of four temperature and two CO₂ treatments during their first growing season: gas exchange of leaves and roots. *New Phytologist* 144, 437-454.

LI, P., MANE, S. P., SIOSON, A. A., ROBINET, C. V., HEATH, L. S., BOHNERT, H. J. und GRENE, R. (2006): Effects of chronic ozone exposure on gene expression in *Arabidopsis thaliana* Ecotypes and in *Thellungiella halophila*. *Plant, Cell and Environment* 29, 854-68.

LI, W. und CAMPBELL, W., J. (1996): Response of rubisco activase protein levels in two species following grown at elevated CO₂. *Plant Physiology* 111, Supplement 347.

LIPPERT, M., HABERLE, K. H., STEINER, K., PAYER, H. D. und REHFUESS, K. E. (1996a): Interactive effects of elevated CO₂ and O₃ on photosynthesis and biomass production of clonal 5-year-old Norway spruce [*Picea abies* (L) Karst] under different nitrogen nutrition and irrigation treatments. *Trees - Structure and Function* 10, 382-392.

LIPPERT, M., STEINER, K., PAYER, H.-D., SIMONS, S., LANGEBAEELS, C. und SANDERMANN, J. H. (1996b): Assessing the impact of ozone on photosynthesis of European beech (*Fagus sylvatica* L.) in environmental chambers. *Trees* 10, 268-275.

LIU, X. P., GRAMS, T. E. E., MATYSSEK, R. und RENNENBERG, H. (2005): Effects of elevated pCO₂ and/or pO₃ on C-, N-, and S-metabolites in the leaves of juvenile beech and spruce differ between trees grown in monoculture and mixed culture. *Plant Physiology and Biochemistry* 43, 147-154.

LOPONEN, J., OSSIPOV, V., KORICHEVA, J., HAUKIOJA, E. und PIHLAJA, K. (1997): Low molecular mass phenolics in foliage of *Betula pubescens* Ehrh in relation to aerial pollution. *Chemosphere* 34, 687-697.

LOPONEN, J., OSSIPOV, V., LEMPA, K., HAUKIOJA, E. und PIHLAJA, K. (1998): Concentrations and among-compound correlations of individual phenolics in white birch leaves under air pollution stress. *Chemosphere* 37, 1445-1456.

LÖW, M., HÄBERLE, K. H., WARREN, C. R. und MATYSSEK, R. (2007): O₃ flux-related responsiveness of photosynthesis, respiration, and stomatal conductance of adult *Fagus sylvatica* to experimentally enhanced free-air O₃ exposure. *Plant Biology* 9, 197-206.

LUDWIKOW, A., GALLOIS, P. und SADOWSKI, J. (2004): Ozone-induced oxidative stress response in *Arabidopsis*: transcription profiling by microarray approach. *Cellular & Molecular Biology Letters* 9, 829-842.

LÜTZ, C., ANEGG, S., GERANT, D., ALAOU-SOSSE, B., GERARD, J. und DIZENGREMEL, P. (2000): Beech trees exposed to high CO₂ and to simulated summer ozone levels: Effects on photosynthesis, chloroplast components and leaf enzyme activity. *Physiologia Plantarum* 109, 252-259.

MACCARRONE, M., VELDINK, G. A. und VLIEGENHART, J. F. G. (1992): Thermal injury and ozone stress affect soybean lipoxygenase expression. *Federation of European Biochemical Societies* 3, 225-230.

MACCARRONE, M., VELDINK, G. A., VLIEGENHART, J. F. G. und AGRÒ, A. F. (1997): Ozone stress modulates amine oxidase and lipoxygenase expression in lentil (*Lens culinaris*) seedlings. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 408, 241-244.

MACNAIR, M. R. (1981): Tolerance of higher plants to toxic materials. In: *Genetic Consequences of Man Made Change* (BISHOP, J. A. und COOK, L. M., eds.), London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco: Academic Press, 177-208.

MANNING, W. J. und TIEDEMANN VON, A. (1995): Climate change: potential effects of increased atmospheric carbon dioxide (CO₂), Ozone (O₃), and Ultraviolet-B (UV-B) Radiation on Plant disease. *Environmental Pollution* 88, 219-245.

MARTINOIA, E., KLEIN, M., GEISLER, M., BOVET, L., FORESTIER, C., KOLUKISA OGLU, U., MULLER-ROBER, B. und SCHULZ, B. (2002): Multifunctionality of plant ABC transporters - more than just detoxifiers. *Planta* 214, 345-355.

MATSUYAMA, T., TAMAOKI, M., NAKAJIMA, N., AONO, M., KUBO, A., MORIYA, S., ICHIHARA, T., SUZUKI, O. und SAJI, H. (2002): cDNA microarray assessment for ozone-stressed *Arabidopsis thaliana*. *Environmental Pollution* 117, 191-194.

MAXWELL, K. und JOHNSON, G. N. (2000): Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51, 659-68.

MIHAL, I. und CÍČAK, A. (2001): Biotic vectors of beech necrotic disease of tracheomycotic type. *Ekologia-Bratislava* 20, 404-413.

MILLER, J. D., ARTECA, R. N. und PELL, E. J. (1999): Senescence-associated gene expression during ozone-induced leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 120, 1015-1023.

MITCHELL, C. E., REICH, P. B., TILMAN, D. und GROTH, J. V. (2003): Effects of elevated CO₂, nitrogen deposition, and decreased species diversity on foliar fungal plant disease. *Global Change Biology* 9, 438-451.

MIYAZAKI, S., FREDRICKSEN, M., HOLLIS, K. C., POROYKO, V., SHEPLEY, D., GALBRAITH, D. W., LONG, S. P. und BOHNERT, H. J. (2004): Transcript expression profiles of *Arabidopsis thaliana* grown under controlled conditions and open-air elevated concentrations of CO₂ and of O₃. *Field Crops Research* 90, 47-59.

MOEDER, W., BARRY, C. S., TAURIAINEN, A. A., BETZ, C., TUOMAINEN, J., UTRIANIEN, M., GRIERSON, D., SANDERMANN, H., LANGEBARTELS, C. und KANGASJÄRVI, J. (2002): Ethylene synthesis regulated by biphasic induction of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase genes is required for hydrogen peroxide accumulation and cell death in ozone-exposed Tomato. *Plant Physiology* 130, 1918-1926.

MORAES, R. M., BULBOVAS, P., FURLAN, C. M., DORNINGOS, M., MEIRELLES, S. T., DELITTI, W. B. C. und SANZ, M. J. (2006): Physiological responses of saplings of *Caesalpinia echinata* Lam., a Brazilian tree species, under ozone fumigation. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 63, 306-312.

MÜLHARDT, C. (2003): *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. Heidelberg, Berlin, Spektrum Akademischer Verlag.

NECHWATAL, J., SCHLENZIG, A., JUNG, T., COOKE, D. E. L., DUNCAN, J. M. und OSWALD, W. (2001): A combination of baiting and PCR techniques for the detection of *Phytophthora quercina* and *P. citricola* in soil samples from oak stands. *Forest Pathology* 31, 85-97.

NEITZKE, M. und THERBURG, A. (2000): Changes in the concentration of ultraviolet-B radiation absorbing compounds in leaves of beech (*Fagus sylvatica* L.) along an elevational gradient. *Flora* 195, 236-244.

NIYOGI, K. K. und FINK, G. R. (1992): Two anthranilate synthase genes in *Arabidopsis*: Defense-related regulation of tryptophan pathway. *The Plant Cell* 4, 721-733.

NUNN, A. J., REITER, I. M., HÄBERLE, K.-H., LANGEBARTELS, C., BAHNWEG, G., PRETZSCH, H., SANDERMANN, H. und MATYSSEK, R. (2005): Response patterns in adult forest trees to chronic ozone stress: identification of variations and consistencies. *Environmental Pollution* 136, 365-369.

NUNN, A. J., REITER, I. M., HÄBERLE, K. H., WERNER, H., LANGEBARTELS, C., SANDERMANN, H., HEERDT, C., FABIAN, P. und MATYSSEK, R. (2002): "Free-air" ozone canopy fumigation in an old-growth mixed forest: Concept and observations in beech. *Phyton - Annales Rei Botanicae* 42, 105-119.

OKSANEN, E., RIIKONEN, J., KAAKINEN, S., HOLOPAINEN, T. und VAPAAVUORI, E. (2005): Structural characteristics and chemical composition of birch (*Betula pendula*) leaves are modified by increasing CO₂ and ozone. *Global Change Biology* 11, 732-748.

OKSANEN, E., SOBER, J. und KARNOSKY, D. F. (2001): Impacts of elevated CO₂ and/or O₃ on leaf ultrastructure of aspen (*Populus tremuloides*) and birch (*Betula papyrifera*) in the Aspen FACE experiment. *Environmental Pollution* 115, 437-446.

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 Biology* 5.

OLBRICH, M., GERSTNER, E., WELZL, G., FLEISCHMANN, F., OSWALD, W., BAHNWEG, G. und ERNST, D. (2007submitted): Accurate quantification of mRNAs and housekeeping gene selection for quantitative real-time RT-PCR normalization in European beech (*Fagus sylvatica* L.) during abiotic and biotic stress.

OVERMYER, K., TUOMINEN, H., KETTUNEN, R., BETZ, C., LANGEBARTELS, C. und SANDERMANN, H. J. (2000): Ozone-sensitive *Arabidopsis rcd1* mutant reveals opposite roles for ethylene and jasmonate signaling pathways in regulating superoxide-dependent cell death. *The Plant Cell* 12, 1849-1862.

PÄÄKKÖNEN, E., SEPPÄNEN, S., HOLOPAINEN, T., KOKKO, H., KÄRENLAMPI, S., KÄRENLAMPI, L. und KANGASJÄRVI, J. (1998): Induction of genes for the stress proteins PR-10 and PAL in relation to growth, visible injuries and stomatal conductance in birch (*Betula pendula*) clones exposed to ozone and/or drought. *New Phytologist* 138, 295-305.

PARE, P. W. und TUMLINSON, J. H. (1999): Plant volatiles as a defense against insect herbivores. *Plant Physiology* 121, 325-331.

PELL, E. J., SCHLAGNHAUFER, C. D. und ARTECA, R. N. (1997): Ozone-induced oxidative stress: Mechanisms of action and reaction. *Physiologia Plantarum* 100, 264-273.

PETIT, J. R., JOUZEL, J., RAYNAUD, D., BARKOV, N. I., BARNOLA, J. M., BASILE, I., BENDER, M., CHAPPELLAZ, J., DAVIS, M., DELAYGUE, G., DELMOTTE, M., KOTLYAKOV, V. M., LEGRAND, M., LIPENKOV, V. Y., LORUIS, C., PEPIN, L., RITZ, C., SALTZMAN, E. und STIEVENARD, M. (1999): Climate and atmospheric history of the past 420,000 years from the Vostok ice core, Antarctica. *Nature* 399, 429-436.

PETRINI, O. (1986): Fungal endophytes of tree leaves. In: *Microbial Ecology of Leaves* (FOKKEMA, N. J. und VAN DEN HEUVEL, J., eds.), New York: Springer-Verlag, 179-187.

PIGHIN, J. A., ZHENG, H. Q., BALAKSHIN, L. J., GOODMAN, I. P., WESTERN, T. L., JETTER, R., KUNST, L. und SAMUELS, A. L. (2004): Plant cuticular lipid export requires an ABC transporter. *Science* 306, 702-704.

PINHEIRO, J., BATES, D., DEBROY, S. und SARKAR, D. (2005): nlme: Linear and nonlinear mixed effects models. R package version 3.1-66.

POORTER, H. und NAVAS, M.-L. (2003): Plant growth and competition at elevated CO₂: on winners, losers and functional groups. *New Phytologist* 157, 175-198.

POORTER, H., VANBERKEL, Y., BAXTER, R., DENHERTOG, J., DIJKSTRA, P., GIFFORD, R. M., GRIFFIN, K. L., ROUMET, C., ROY, J. und WONG, S. C. (1997): The effect of elevated CO₂ on the chemical composition and construction costs of leaves of 27 C-3 species. *Plant Cell and Environment* 20, 472-482.

PRENTICE, C. und HELMISAARI, H. (1991): Silvics of north European trees: Compilation, comparison and implications for forest succession modelling. *Forest Ecology and Management* 42, 79-93.

PRETZSCH, H., KAHN, M. und GROTE, R. (1998): The mixed spruce-beech forest stands of the "Sonderforschungsbereich" "Growth or Parasite Defence?" in the forest district Kranzberger Forst. *Forstwissenschaftliches Centralblatt* 117, 241-257.

PRITSCH, K., ERNST, D., FLEISCHMANN, F., GAYLER, S., GRAMS, T. E., GÖTTLEIN, A., HELLER, W., KOCH, N., LANG, H., MATYSSEK, R., MUNCH, J. C., OLBRICH, M., SCHERB, H., STICH, S., WINKLER, J. B. und SCHLOTTER, M. (2007): Plant and soil system responses to ozone after three years in a lysimeter study with juvenile beech (*Fagus sylvatica* L.). submitted.

RALPH, S., ODDY, C., COOPER, D., YUEH, H., JANCSEK, S., KOLOSOVA, N., PHILIPPE, R. N., AESCHLIMAN, D., WHITE, R., HUBER, D., RITLAND, C. E., BENOIT, F., RIGBY, T., NANTEL, A., BUTTERFIELD, Y. S. N., KIRKPATRICK, R., CHUN, E., LIU, J., PALMQUIST, D., WYNHOVEN, B., STOTT, J., YANG, G., BARBER, S., HOLT, R. A., SIDDIQUI, A., JONES, S. J. M., MARRA, M. A., ELLIS, B. E., DOUGLAS, C. J., RITLAND, K. und BOHLMANN, J. (2006a): Genomics of hybrid poplar (*Populus trichocarpa* x *deltoides*) interacting with forest tent caterpillars (*Malacosoma disstria*): normalized and full-length cDNA libraries, expressed sequence tags, and a cDNA microarray for the study of insect-induced defences in poplar. *Molecular Ecology* 15, 1275-1297.

RALPH, S. G., YUEH, H., FRIEDMANN, M., AESCHLIMAN, D., ZEZNIK, J. A., NELSON, C. C., BUTTERFIELD, Y. S. N., KIRKPATRICK, R., LIU, J., JONES, S. J. M., MARRA, M. A., DOUGLAS, C. J.,

RITLAND, K. und BOHLMANN, J. (2006b): Conifer defence against insects: microarray gene expression profiling of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) induced by mechanical wounding or feeding by spruce budworms (*Choristoneuro occidentalis*) or white pine weevils (*Pissodes strobi*) reveals large-scale changes of the host transcriptome. *Plant, Cell and Environment*, 1-26.

RAO, M. und DAVIS, K. R. (1999): Ozone-induced cell death occurs via two distinct mechanisms in *Arabidopsis*: the role of salicylic acid. *The Plant Journal* 17, 603-614.

RAO, M. V. und DAVIS, K. R. (2001): The physiology of ozone induced cell death. *Planta* 213, 682-690.

RAPP, H. und KIRST, G. O. (1974): Zur Physiologie der Galle von *Mikiola fagi* H_{TR}. auf Blättern von *Fagus sylvatica* L. 1. Vergleichende Untersuchungen einiger Inhaltsstoffe der Galle und des Blattes. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen (BPP)* 165, 437-444.

RDEVELOPMENTCORETEAM (2005): R: A language and environment for statistical computing. .

REITER, I. M., HÄBERLE, K. H., NUNN, A. J., HEERDT, C., REITMAYER, H., GROTE, R. und MATYSSEK, R. (2005): Competitive strategies in adult beech and spruce: space-related foliar carbon investment versus carbon gain. *Oecologia* 146, 337-349.

REYMOND, P., WEBER, H., DAMOND, M. und FARMER, E. E. (2000): Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12, 707-719.

ROBLES, C., GREFF, S., PASQUALINI, V., GARZINO, S., BOUSQUET-MELOU, A., FERNANDEZ, C., KORBOULEWSKY, N. und BONIN, G. (2003): Phenols and flavonoids in Aleppo pine needles as bioindicators of air pollution. *Journal of Environmental Quality* 32, 2265-2271.

RUNION, G. B. (2003): Climate change and plant pathosystems - future disease prevention starts here. *New Phytologist* 159, 531-533.

RYAN, C. A. (2000): The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology* 1477, 112-121.

SALEEM, A., LOPONEN, J., PIHLAJA, K. und OKSANEN, E. (2001): Effects of long-term open-field ozone exposure on leaf phenolics of European silver birch (*Betula pendula* Roth). *Journal of Chemical Ecology* 27, 1049-1062.

SANDERMANN, H., JR. (1999): Ozone/biotic disease interactions: molecular biomarkers as a new experimental tool. *Environmental Pollution* 108, 327-332.

SANDERMANN, H. J. (1996): Ozone and plant health. *Annual Review of Phytopathology* 34, 347-366.

SANDERMANN, H. J. (2000): Active oxygen species as mediators of plant immunity: Three case studies^a. *Biological Chemistry* 381, 649-653.

SANDERMANN, H. J., ERNST, D., HELLER, W. und LANGEBARTELS, C. (1998): Ozone: an abiotic elicitor of plant defence reactions. Elsevier Science Ltd. 3, 47-50.

SCHARDT, M., FAUSTER, B., GRUPPE, A. und SCHOPF, R. (2006): Einfluss der Blattposition auf Befallshäufigkeit und Entwicklungserfolg von *Rhynchaenus fagi* L. (Coleoptera: Curculionidae) an Buche (*Fagus sylvatica* L.). Mitteilungen der Deutschen Gesellschaft für allgemeine und angewandte Entomologie 15, 41-44.

SCHLAGNHAUFER, C. D., ARTECA, R. N. und PELL, E. J. (1997): Sequential expression of two 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase genes in response to biotic and abiotic stresses in potato (*Solanum tuberosum* L.) leaves. Plant Molecular Biology 35, 683-8.

SCHLOTTER, M., WINKLER, J. B., ANEJA, M. K., KOCH, N., FLEISCHMANN, F., PRITSCH, K., HELLER, W., STICH, S., GRAMS, T. E., GÖTTLEIN, A., MATYSSEK, R. und MUNCH, J. C. (2005): Short term effects of ozone on the plant-rhizosphere-bulk soil system of young beech. Plant Biology 7, 728-736.

SCHMELZER, E., NATON, B., FREYTAG, S., ROUHARA, I., KÜSTER, B. und HAHNBROCK, K. (1995): Infection-induced rapid cell death in plants: a means of efficient pathogen defense. Canadian Journal of Bot 73, 426-434.

SCHOENICHEN, W. (1950): Von deutschen Bäume. Berlin, De Gruyter

SCHRAUDNER, M., ERNST, D., LANGEBARTELS, C. und SANDERMANN JR, H. (1992): Biochemical plant responses to ozone. Plant Physiology 99, 1321-1328.

SCHRAUDNER, M., MOEDER, W., WIESE, C., VAN CAMP, W., INZÉ, D., LANGEBARTELS, C. und SANDERMANN, H. (1998): Ozone-induced oxidative burst in the ozone biomonitor plant, tobacco Bel W3. Plant Journal 16, 235-245.

SCHUBERT, R., BAHNWEG, G., NECHWATAL, J., JUNG, T., COOKE, D. E. L., DUNCAN, J. M., MÜLLER-STARCK, G., LANGEBARTELS, C., SANDERMANN, H. und OSWALD, W. (1999): Detection and quantification of *Phytophthora* species which are associated with root-rot diseases in European deciduous forests by species-specific polymerase chain reaction. European Journal of Forest Pathology 29, 169-188.

SCHÜTT, P., SCHUCK, H. J. und AAS, G. (2002): *Fagus sylvatica*. Enzyklopädie der Holzgewächse: Handbuch und Atlas der Dendrologie. Landsberg/Lech, Ecomed Verlagsgesellschaft, 1-20.

SCHÜTT, P., SCHUCK, J. und STIMM, B. (1992): Lexikon der Forstbotanik. Ecomed Verlagsgesellschaft mbh.

SCHWANZ, P. und POLLE, A. (1998): Antioxidative systems, pigment and protein contents in leaves of adult Mediterranean oak species (*Quercus pubescens* and *Q. ilex*) with lifetime exposure to elevated CO₂. New Phytologist 140, 411-423.

SCHWERDTFEGER, F. (1981): Waldkrankheiten. Hamburg, Berlin, Parey.

SFB 607 TEILPROJEKT C7: LASSER, R., ZU CASTELL, W. und FILBIR, F. (2007): Antrag auf Finanzierung der 4. Förderperiode des Sonderforschungsbereichs 607.

SHARMA, Y. K. und DAVIS, K. R. (1994): Ozone-induced expression of stress-related genes in *Arabidopsis thaliana* Plant Physiology 105, 1089-1096.

SHARMA, Y. K. und DAVIS, K. R. (1995): Isolation of a novel *Arabidopsis* ozone-induced cDNA by differential display. Plant Molecular Biology 29, 91-98.

SHARMA, Y. K. und DAVIS, K. R. (1997): The effects of ozone on antioxidant responses in plants. Free Radical Biology and Medicine 23, 480-8.

SHARMA, Y. K., LEON, J., RASKIN, I. und DAVIS, K. R. (1996): Ozone-induced responses in *Arabidopsis thaliana*: The role of salicylic acid in the accumulation of defense-related transcripts and induced resistance. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93, 5099-5104.

SHITAN, N., BAZIN, I., DAN, K., OBATA, K., KIGAWA, K., UEDA, K., SATO, F., FORESTIER, C. und YAZAKI, K. (2003): Involvement of CjMDR1, a plant multidrug-resistance-type ATP-binding cassette protein, in alkaloid transport in *Coptis japonica*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100, 751-756.

SINCLAIR, J. B. und CERKAUSKAS, R. F. (1996): Latent infection vs endophytic colonization by fungi. In: Endophytic fungi in grasses and woody plants St. Paul: APS Press, 3-29.

SINGH, K. B., FOLEY, R. C. und ONATE-SANCHEZ, L. (2002): Transcription factors in plant defense and stress responses. Current Opinion in Plant Biology 5, 430-436.

SITTE, P., ZIEGLER, H., EHRENDORFER, F. und BRESINSKY, A. (1998): Strasburger, Lehrbuch der Botanik für Hochschulen. Heidelberg, Berlin, Spektrum Akademischer Verlag.

SOONG, R., BEYSER, K., BASTEN, O., KALBE, A., RUESCHOFF, J. und TABITI, K. (2001): Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction detection of cytokeratin 20 in noncolorectal lymph nodes. Clin Cancer Res 7, 3423-9.

STARKE, R. (1996): Die Reproduktion der Buche (*Fagus sylvatica* L.) unter verschiedenen waldbaulichen Gegebenheiten. In: Biodiversität und nachhaltige Forstwirtschaft (MÜLLER-STARCK, G., eds.), Landsberg: Ecomed, 135-159.

STARKE, R., HATTEMER, H. H., ZIEHE, M., VORNAM, B., TUROK, J., HERZOG, S., MAURER, W. und TABEL, U. (1994): Genetische Variation an Enzym-Genloci der Buche. Allgemeine Forst und Jagd Zeitung 166, 161-167.

STAUDT, M., JOFFRE, R., RAMBAL, S. und KESSELMEIER, J. (2001): Effect of elevated CO₂ on monoterpene emission of young *Quercus ilex* trees and its relation to structural and ecophysiological parameters. Tree Physiology 21, 437-445.

STITT, M. (1991): Rising CO₂ levels and their potential significance for carbon flow in photosynthetic cells. Plant, Cell and Environment 14, 741-762.

STUERZENBAUM, S. R. und KILLE, P. (2001): Control genes in quantitative molecular biological techniques: the variability of invariance. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 130, 281-9.

TAMAOKI, M., MATSUYAMA, T., KANN, M., NAKAJIMA, N., KUBO, A., AONO, M. und SAJI, H. (2003): Differential ozone sensitivity among *Arabidopsis* accessions and its relevance to ethylene synthesis. *Planta* 216, 552-560.

TAMAYO, P., SLONIM, D., MESIROV, J., ZHU, Q., KITAREEWAN, S., DMITROVSKY, E., LANDER, E. S. und GOLUB, T. R. (1999): Interpreting patterns of gene expression with self-organizing maps: methods and application to hematopoietic differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2907-12.

T AUSZ, M., GONZALEZ-RODRIGUEZ, A. M., WONISCH, A., PETERS, J., GRILL, D., MORALES, D. und JIMENEZ, M. S. J. (2004): Photostress, photoprotection, and water soluble antioxidants in the canopies of five Canarian laurel forest tree species during a diurnal course in the field. *Flora* 199, 110-119.

TAYLOR, G., STREET, N. R., TRICKER, P. J., SJÖDIN, A., GRAHAM, L., SKOGSTRÖM, O., CALFAPIETRA, C., SCARASCIA-MUGNOZZA, G. und JANSSON, S. (2005): The transcriptome of *Populus* in elevated CO₂. *New Phytologist* 167, 143 - 154.

TAYLOR, G. E. J., PITELKA, L. F. und CLEGG, M. T. (1991): *Ecological Genetics and Air Pollution*. New York, Berlin, Heidelberg, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Springer-Verlag.

THANSEEM, I., JOSEPH, A. und THULASEEDHARAN, A. (2005): Induction and differential expression of beta-1,3-glucanase mRNAs in tolerant and susceptible *Hevea* clones in response to infection by *Phytophthora meadii*. *Tree Physiology* 25, 1361-8.

THEODOULOU, F. L., JOB, K., SLOCOMBE, S. P., FOOTITT, S., HOLDSWORTH, M., BAKER, A., LARSON, T. R. und GRAHAM, I. A. (2005): Jasmonic acid levels are reduced in COMATOSE ATP-binding cassette transporter mutants. Implications for transport of jasmonate precursors into peroxisomes. *Plant Physiology* 137, 835-840.

THOMAS, S. C. und JASIENSKI, M. (1996): Genetic variability and the nature of microevolutionary responses to elevated CO₂. In: *Carbon Dioxide, Populations, and Communities* (KÖRNER, C. und BAZZAZ, F. A., eds.), San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto: Academic Press.

TON, J., D'ALESSANDRO, M., JOURDIE, V., JAKAB, G., KARLEN, D., HELD, M., MAUCH-MANI, B. und TURLINGS, T. C. J. (2007): Priming by airborne signals boosts direct and indirect resistance in maize. *Plant Journal* 49, 16-26.

TOSTI, N., PASQUALINI, S., BORGOGNI, A., EDERLI, L., FALISTOCCO, E., CRISPI, S. und PAOLOCCI, F. (2006): Gene expression profiles of O₃-treated *Arabidopsis* plants. *Plant, Cell and Environment* 29, 1686-1702.

TSUKAMOTO, S., MORITA, S., HIRANO, E., YOKOI, H., MASUMURA, T. und TANAKA, K. (2005): A novel cis-element that is responsive to oxidative stress regulates three antioxidant defense genes in rice. *Plant Physiol* 137, 317-27.

TUOMAINEN, J., BETZ, C., KANGASJÄRVI, J., ERNST, D., YIN, Z.-H., LANGEBARTELS, C. und SANDERMANN JR., H. (1997): Ozone induction of ethylene emission in tomato plants: regulation by differential accumulation of transcripts for the biosynthetic enzymes. *The Plant Journal* 12, 1151-1162.

UPDEGRAFF, D. M. (1969): Semimicro determination of cellulose in biological materials. *Analytical Biochemistry* 32, 420-424.

VAN CAMP, W., WILLEKENS, H., BOWLER, C., VAN MONTAGU, M., INZÉ, D., REUPOLD-POPP, P., SANDERMANN JR., H. und LANGEBARTELS, C. (1994): Elevated levels of superoxide dismutase protect transgenic plants against ozone damage. *Nature Biotechnology* 12, 165-168.

VANDENABEELE, S., VANDERAUWERA, S., VUYLSTEKE, M., ROMBAUTS, S., LANGEBARTELS, C., SEIDLITZ, H., ZABEAU, M., MONTAGU VAN, M., INZÉ, D. und BREUSEGEM VAN, F. (2004): Catalase deficiency drastically affects gene expression induced by high light in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 39, 45-58.

VATER, H. (1927): Die Bewurzelung der Kiefer, Fichte und Buche. *Tharandter Forstliches Jahrbuch* 78, 5-85.

WALLING, L. L. (2000): The myriad plant responses to herbivores. *Journal of Plant Growth Regulation* 19, 195-216.

WARREN, C. R., LÖW, M., MATYSSEK, R. und TAUSZ, M. (2007): Internal conductance to CO₂ transfer of adult *Fagus sylvatica*: Variation between sun and shade leaves and due to free-air ozone fumigation. *Environmental and Experimental Botany* 59, 130-138.

WEGENER, A., GIMBEL, W., WERNER, T., HANI, J., ERNST, D. und SANDERMANN, H. (1997): Molecular cloning of ozone-inducible protein from *Pinus sylvestris* L with high sequence similarity to vertebrate 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-synthase. *Biochimica et Biophysica Acta-Gene Structure and Expression* 1350, 247-252.

WERNER, H. und FABIAN, P. (2002): Free-air fumigation of mature trees - A novel system for controlled ozone enrichment in grown-up beech and spruce canopies. *Environmental Science and Pollution Research* 9, 117-121.

WIESER, G., HECKE, K., TAUSZ, M., HÄBERLE, K.-H., GRAMS, T. E. und MATYSSEK, R. (2003): The influence of microclimate and tree age on the defense capacity of European beech (*Fagus sylvatica* L.) against oxidative stress. *Ann. For. Sci.* 60, 131-135.

WILSON, D. und CARROLL, G. C. (1994): Infection studies of *Discula quercina*, an endophyte of *Quercus garryana*. *Mycologia* 86, 635-647.

WOHLGEMUTH, H., MITTELSTRASS, K., KSCHIESCHAN, S., BENDER, J., WEIGEL, H. J., OVERMYER, K., KANGASJÄRVI, J., SANDERMANN, H. und LANGEBARTELS, C. (2002): Activation of an oxidative burst is a general feature of sensitive plants exposed to the air pollutant ozone. *Plant, Cell and Environment* 25, 717-726.

WOLF, H. und BRAUN, H. (1996): Beiträge der Forstpflanzenzüchtung zur Erhaltung und Erhöhung der genetischen Vielfalt. In: Biodiversität und nachhaltige Forstwirtschaft (MÜLLER-STARCK, G., eds.), Landsberg: Ecomed, 60-77.

WORLEY, J., BECHTOL, K., SHARRON, P., ROACH, D., HANZEL, D., TROUNSTINE, M. und BARKER, D. (2000): A systems approach to fabrication and analyzing DNA microarrays. In: Microarray Biochip Technology (SCHENA, M., eds.), Sunnyvale, CA, USA: Eaton, F. W., 65 - 86.

WUSTMAN, B. A., OKSANEN, E., KARNOSKY, D. F., NOORMETS, A., ISEBRANDS, J. G., PREGITZER, K. S., HENDREY, G. R., SOBER, J. und PODILA, G. K. (2001): Effects of elevated CO₂ and O₃ on aspen clones varying in O₃ sensitivity: Can CO₂ ameliorate the harmful effects of O₃? Environmental Pollution 115, 473-481.

YALPANI, N., ENYEDI, A. J., LEON, J. und RASKIN, I. (1994): Ultraviolet light and ozone stimulate accumulation of salicylic acid, pathogenesis-related proteins and virus resistance in tobacco. Planta 193, 372-376.

ZINSER, C., ERNST, D. und SANDERMANN, H. (1998): Induction of stilbene synthase and cinnamyl alcohol dehydrogenase mRNAs in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings. Planta 204, 169-176.

ZINSER, C., JUNGBLUT, T., HELLER, W., SEIDLITZ, H. K., SCHNITZLER, J.-P., ERNST, D. und SANDERMANN JR., H. (2000): The effects of ozone in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) gene expression, biochemical changes and interactions with UV-B radiation. Plant, Cell and Environment 23, 975-982.

6 ANHANG

6.1 Gewächshaus

Tabelle 54: Zusammenfassung der statistischen Ergebnisse. Aufgetragen sind die Inhaltsstoffe und die Modelle oder deren Faktoren, angegeben ist jeweils der p-Wert, wobei Signifikanzen in fett und rot gekennzeichnet sind. Für das Modell Behandlung*Zeit*Infektion ergaben sich keine Signifikanzen. Mit Ausnahme der acylierten Flavonolglycoside, Quercetinderivate und Gesamtflavonolen wurden die restlichen Inhaltsstoffe zur statistischen Auswertung logarithmisch transformiert.

Inhaltsstoffe	Modell	Zeit	Behandlung	Infektion	Zeit* Behandlung	Zeit* Infektion	Behandlung *Infektion
Gesamtflavonoide		0.0005	0.0001	0.0672	0.3720	0.1300	0.0490
Summe unbekannt		0.0017	0.0326	0.5059	0.7014	0.7199	0.2189
Hydroxizimtsäurederivate		0.0010	<0.0001	0.0508	0.1903	0.9049	0.0004
Flavan/ Flavanon		0.4439	0.0107	0.0276	0.3231	0.9544	0.0081
Kämpferolderivate		0.0041	0.0016	0.1231	0.2363	0.7455	0.5539
Quercetinderivate		0.7591	0.0057	0.2126	0.3294	0.2331	0.6105
Acetylierte Flavonolglycoside		0.3234	0.7850	0.8948	0.1457	0.1780	0.6226
Gesamtflavonol		0.0024	0.0017	0.3799	0.0746	0.1340	0.7105

Legende:

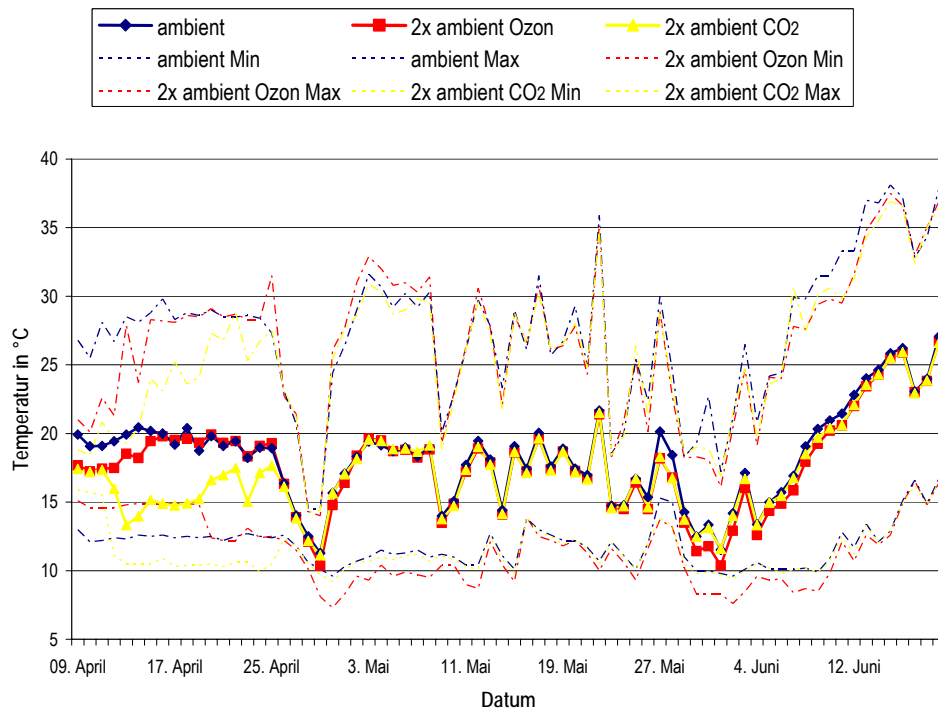


Abbildung 63: Temperaturverlauf in den verschiedenen Kammern (ambient, 2x ambient Ozon, 2x ambient CO2) des Gewächshauses der GSF im Versuchszeitraum vom 09. April bis 19. Juni des Jahres 2006.

6.2 Kranzberger Forst – Einfluss von Ozon und Insekten

Tabelle 55: Durch Insekten veränderte Transkriptspiegel (\log_2 Ratio) von ESTs des Primär-, Energiemetabolismus und des Zellwachstums in unterschiedlichen Ozonkonzentrationen der etwa 60 Jahre alten Buchen (*Fagus sylvatica* L.) des Kranzberger Forstes, eingeteilt in Schadbilder, Sonnen- und Schattenblätter (dunkelgrün = reprimiert, CV<50; orange = induziert, hellgrün = reprimiert).

Genname	1x ambient Ozon					2x ambient Ozon				
	Schattenblätter		Sonnenblätter			Schattenblätter		Sonnenblätter		
	Minen	Lochfraß	Minen	Lochfraß	Galle	Minen	Lochfraß	Minen	Lochfraß	Galle
Primärmetabolismus										
Aminosäure										
Acetohydroxy acid isomeroreductase	-0.41	-0.35	-0.33	-0.03	0.19	-0.19	0.13	-0.54	-1.39	-0.03
Alanine racemase family protein	-0.72	-0.25	-0.49	-0.16	0.04	-0.40	-0.29	-1.61	-4.10	-0.55
Anthranilate synthase beta subunit 9	0.02	-0.29	-0.21	-0.85	0.33	-0.38	x	x	-3.29	x
Polyglutamine binding protein variant 4	x	x	x	x	-0.85	1.17	0.19	x	0.72	x
Polyglutamine binding protein variant 4	-0.16	3.17	-0.39	-0.47	-0.42	0.47	-0.62	x	0.23	0.60
Polyglutamine binding protein variant 4	-0.11	-0.42	0.47	-0.30	-0.12	0.19	0.02	0.46	-4.11	-0.29
Polyglutamine binding protein variant 4	-0.51	3.25	x	-0.37	x	0.03	x	-0.36	-0.61	x
Polyglutamine binding protein variant 4	-0.40	0.17	-0.28	-0.05	0.25	-0.03	-0.38	-0.65	-2.22	-0.10
Polyglutamine binding protein variant 4	-0.66	-0.19	-0.31	-0.43	-0.17	-0.21	-0.23	-0.54	-4.51	-0.03
Polyglutamine binding protein variant 4	-0.40	x	-0.73	-1.25	-0.73	-0.50	-0.93	x	-2.16	x
Polyglutamine binding protein variant 4	x	x	x	x	-0.01	-0.64	-1.87	x	x	x
Polyglutamine binding protein variant 4	-0.58	x	x	x	-1.34	-0.13	-1.26	x	1.43	x
Zucker und Polysaccharide										
GDP-4-keto-6-deoxy-D-mannose-3	-0.70	-0.03	-0.36	-0.12	0.04	-0.40	-0.06	-0.88	-2.16	-0.43
Glucosyltransferase-12	-0.66	0.01	-0.40	-0.16	-0.01	-0.35	-0.25	-1.36	-3.53	-0.51
Glycoside hydrolase, family 1	1.13	-0.03	-1.53	-0.42	-0.46	1.14	-0.63	2.03	1.11	x
Intramolecular transferase, phosphotransferases	-0.39	-0.02	-0.13	-0.95	-1.33	-0.21	-0.47	x	-2.09	-0.94
Phosphoglyceromutase	0.14	2.40	-0.49	-0.22	-0.29	0.03	0.07	0.15	-0.45	0.08
Kofaktoren										
Putative reduced viability upon starvation protein 161	-0.70	0.24	-0.44	0.13	0.16	-0.39	-0.10	-0.76	-1.90	-0.37
Energie										
Glykolyse										
Triosephosphate isomerase	-0.46	0.33	0.05	0.27	0.11	0.09	0.33	-0.68	-1.10	-0.15
Glukoneogenese										
Glutaredoxin I	-1.76	3.45	x	x	-0.24	-0.03	-1.02	1.13	-1.72	x
Glutaredoxin I	-0.66	0.59	-0.17	0.06	0.02	-0.21	0.23	-0.83	-2.07	0.02
TCA-Zyklus										
Malate dehydrogenase	-0.79	0.25	-0.26	-0.15	0.09	-0.23	-0.12	-0.91	-2.22	-0.15
Elektronentransport										
AAA ATPase	-0.54	0.74	0.23	-0.18	0.15	-0.26	-1.13	-0.82	-4.28	-0.39
Chloroplast envelope quinone-oxidoreductase	0.10	-1.00	0.03	-0.07	-0.27	-0.12	0.25	0.01	0.27	-0.09
Cytochrome b5 domain-containing protein	-0.30	-0.06	-0.10	0.31	0.26	-0.30	0.25	-0.25	-1.28	-0.09
Cytochrome P450 like TBP	-0.66	-0.19	-0.72	-0.71	-0.49	-0.57	-0.81	-0.73	-6.30	-0.34
NADP-dependent malic protein-like mRNA (b)	-0.55	-0.28	-0.35	-0.24	-0.05	-0.32	-0.48	-0.72	-5.27	-0.28
Oxidoreductase	x	4.52	-0.75	-0.19	-0.47	-0.40	-0.29	1.54	-0.07	x
Plastoquinol-plastocyanin reductase	x	x	x	x	x	x	-0.28	1.21	x	x
Vacuolar proton ATPase proteolipid subunit	-0.53	0.58	-0.51	-0.15	0.14	-0.04	-0.05	-0.26	-1.15	-0.10
Photosynthese										
Cytosolic aldolase	0.10	-0.07	-0.37	-0.38	0.13	0.00	0.02	0.14	0.24	1.06
Nonphosphorylating NADP-specific GAPDH	-0.70	-0.04	0.01	0.20	0.09	-0.30	0.14	-0.25	-1.36	0.32
Putative glycolate oxidase b	-0.74	-0.30	-0.02	0.04	-0.05	-0.32	0.12	-0.39	-1.54	-0.28
Zellwachstum										
DNA-Synthese und Replikation										
Nucleosome assembly protein 1	0.12	1.20	-0.11	0.02	0.12	0.10	0.15	-0.05	-0.10	0.07
Putative transposase	-0.65	-0.28	-0.58	-0.70	0.01	-0.70	-0.19	-0.98	-2.65	-0.64
Rekombination und Reparatur										
Putative cytochrome C oxidase proteins	x	x	x	x	-0.10	x	-1.24	x	0.71	x
Putative cytochrome C oxidase proteins	-0.57	0.04	-0.35	-0.10	-0.07	-0.34	0.09	-0.77	-2.09	0.02
Putative cytochrome C oxidase proteins	-0.42	0.25	-0.53	-0.09	-0.12	-0.43	0.09	-0.20	-1.38	-0.53
Wachstumsregulatoren										
Auxin-regulated protein	-0.73	0.01	-0.39	-0.10	-0.02	-0.45	0.00	-1.04	-2.86	-0.43
Auxin-regulated protein gene	0.20	-0.06	0.41	0.05	-1.02	0.33	0.35	0.34	0.77	x
Gibberellin 20-oxidase	-1.01	0.42	-0.18	-0.09	-0.11	-0.11	-0.11	-0.81	-2.10	-0.34
Nine-cis-epoxycarotenoid dioxygenase4	-0.44	0.24	0.04	0.20	0.21	-0.29	0.12	-0.05	-1.13	0.08

Tabelle 56: Durch Insekten veränderte Transkriptspiegel (\log_2 Ratio) von ESTs der Transkription und des Proteinmetabolismus und des Zellwachstums in unterschiedlichen Ozonkonzentrationen der etwa 60 Jahre alten Buchen (*Fagus sylvatica* L.) des Kranzberger Forstes, eingeteilt in Schadbilder, Sonnen- und Schattenblätter (dunkelgrün = reprimiert, CV<50; orange = induziert, hellgrün = reprimiert).

Genname	1x ambient Ozon					2x ambient Ozon				
	Schattenblätter		Sonnenblätter			Schattenblätter		Sonnenblätter		
	Minen	Lochfraß	Minen	Lochfraß	Galle	Minen	Lochfraß	Minen	Lochfraß	Galle
Transkription										
mRNA-Synthese										
(Suppressor-of-White-APricot)/surp domain-containing protein / D111/G-patch domain-containing protein	-1.57	0.81	-0.24	-0.14	0.26	-0.15	-0.13	-0.70	-2.56	-0.43
Timing of CAB expression 1-like protein mRNA	-0.48	0.24	-0.19	0.05	0.33	-0.28	0.06	-1.00	-1.35	-0.29
Repressoren										
Histone deacetylase	-1.00	0.44	-0.12	0.09	-0.09	0.12	0.35	-0.08	-0.47	0.19
Transkriptionsfaktoren										
Ankyrin repeat BTB/POZ domain-containing protein	x	x	x	x	x	x	-1.21	x	x	-0.11
BTB/POZ domain-containing protein	-0.54	0.40	-0.07	0.06	0.23	-0.08	x	-0.88	-2.26	-0.52
DNA-binding family protein	-0.68	-0.07	-0.30	-0.23	0.12	-0.56	-0.29	-1.24	-4.00	-0.43
Homeobox leucine zipper protein	-0.46	-0.20	-0.41	-0.19	0.03	-0.44	-0.05	-1.33	-4.08	-0.64
Plastid-lipid-associated protein	-0.39	0.53	-0.31	-0.10	0.09	-0.18	-0.14	-0.28	-1.57	-0.19
Plastid-lipid-associated protein	-1.28	x	-1.14	-1.22	-0.46	-0.65	-0.87	x	-0.96	-0.47
Putative zinc finger POZ domain protein	-0.45	4.57	-0.58	-0.37	-0.47	-0.35	-0.55	x	-3.07	x
WRKY-type transcription factor	-0.77	-0.03	-0.50	-0.21	-0.20	-0.03	-0.24	-0.42	-1.29	-0.60
Zinc finger NF-X1-type	-0.40	2.60	-1.16	-0.57	-0.15	0.23	-0.26	0.45	-0.30	0.06
Zinc finger Protein T2-6	-0.54	0.42	-0.05	-0.02	0.22	-0.01	0.02	-0.85	-1.63	-0.22
ZIP	-0.57	0.43	-0.17	0.08	0.12	-0.23	-0.12	-0.78	-1.95	-0.35
Proteinsynthese										
Ribosomale Proteine										
40S ribosomal protein S25	-0.56	0.64	0.04	-0.08	0.21	-0.08	0.15	-0.45	-1.13	-0.15
60S ribosomal protein L37	-0.55	0.07	-0.33	-0.13	0.01	-0.35	-0.13	-0.91	-4.13	-0.14
Acidic ribosomal protein, putative	0.75	2.37	0.35	0.17	0.21	0.54	0.26	0.30	0.66	0.16
Plastid ribosomal protein PRPL5	-0.44	0.24	-0.59	0.30	-0.36	0.18	0.33	1.04	0.87	-0.24
Ribosomal L27	-0.54	0.77	-0.09	0.01	0.02	-0.11	0.21	-0.41	-1.02	-0.20
Ribosomal protein L18a	-0.85	-0.18	-0.23	-0.25	-0.06	-0.21	-0.02	-0.68	-1.21	-0.32
Ribosomal protein L24	-0.54	0.69	-0.18	0.02	0.36	0.07	0.16	-0.93	-3.76	-0.54
Translationsfaktoren										
Translation initiation factor 2 beta	-0.47	0.77	-0.35	0.02	0.14	-0.14	0.18	-0.87	-2.65	-0.36
Ribosomale RNA										
16S rRNA	-0.97	x	x	x	x	x	-1.38	x	x	x
18S ribosomal	-0.39	-0.17	0.34	-0.33	-0.28	-0.14	-0.04	-0.34	-4.22	-0.29
18S ribosomal RNA	0.65	-0.55	-0.02	0.06	-0.31	1.01	0.60	0.45	0.47	0.47
18S ribosomal RNA	0.87	x	-0.26	0.62	-0.34	0.03	0.20	-0.08	-2.18	0.13
18S ribosomal RNA	-0.33	3.50	-0.24	-0.05	-0.37	-0.11	x	0.90	-0.50	0.42
18S ribosomal RNA	0.59	x	-1.85	x	-0.52	0.97	-2.18	x	0.84	x
18S ribosomal RNA	-0.37	0.21	-0.09	0.19	0.31	-0.35	-0.28	-0.42	-1.18	0.02
18S ribosomal RNA	0.71	6.77	-0.34	-0.27	-0.05	x	-1.46	0.75	1.62	x
18S ribosomal RNA	0.36	0.17	0.08	0.09	0.16	1.92	-0.11	0.65	0.73	0.34
26 rRNA a	-0.94	0.73	-0.26	-0.04	-0.18	-0.14	-0.11	-0.05	-1.37	-0.32
26 rRNA b	-0.13	-0.35	0.21	-0.15	0.04	0.14	0.21	0.28	-6.29	-0.29
26 S ribosomal RNA	0.05	-0.39	-0.25	-0.43	0.02	0.04	0.08	0.14	-6.73	-0.29
26 S rRNA	-0.09	-0.32	0.22	-0.12	0.07	0.18	0.27	0.22	-6.28	-0.29
26S large subunit ribosomal RNA	-0.08	-0.11	0.35	-0.26	0.14	0.29	0.09	0.49	-3.65	-0.26
26S ribosomal RNA	-0.19	-0.25	0.45	-0.36	0.00	0.57	0.31	0.45	-4.92	-0.29
26S ribosomal RNA	-0.56	-0.04	0.44	-0.30	-0.20	0.35	0.23	-0.22	-4.30	-0.29
26S ribosomal RNA	-0.27	-0.15	0.23	0.15	0.03	0.27	0.47	0.02	-4.70	-0.29
26S ribosomal RNA	-0.06	-0.39	0.15	-0.46	-0.27	0.14	0.03	0.15	-5.21	0.17
26S ribosomal RNA	-0.43	0.22	0.89	-0.02	-0.07	0.11	0.68	-0.13	-3.45	-0.29
26S ribosomal RNA	-0.47	-0.05	0.48	-0.05	-0.02	0.16	0.22	-0.12	-3.54	-0.29
26S ribosomal RNA	-0.39	-0.10	-0.27	-0.35	-0.06	-0.07	-0.40	-0.15	-4.99	-0.25
26S ribosomal RNA	-0.06	-0.12	0.40	-0.09	0.07	0.25	0.55	0.37	-5.93	-0.29
26S ribosomal RNA	0.04	-0.36	-0.26	-0.40	0.04	0.06	-0.08	0.17	-6.92	-0.29
26S ribosomal RNA	-0.29	-0.23	-0.03	-0.27	-0.06	-0.08	-0.03	-0.23	-5.24	-0.29
26S rRNA c	-0.26	0.27	0.64	0.15	-0.02	0.13	0.52	0.07	-4.31	-0.29
5S ribosomal RNA Length	-0.36	0.29	-0.16	-0.08	0.13	-0.19	-0.17	-0.68	-1.56	-0.19

Tabelle 57: Durch Insekten veränderte Transkriptspiegel (\log_2 Ratio) von Transporter ESTs und ESTs der Zellstruktur und Signaltransduktion in unterschiedlichen Ozonkonzentrationen der etwa 60 Jahre alten Buchen (*Fagus sylvatica* L.) des Kranzberger Forstes, eingeteilt in Schadbilder, Sonnen- und Schattenblätter (dunkelgrün = reprimiert, CV<50; orange = induziert, hellgrün = reprimiert).

Genname	1x ambient Ozon					2x ambient Ozon				
	Schattenblätter		Sonnenblätter			Schattenblätter		Sonnenblätter		
	Minen	Lochfraß	Minen	Lochfraß	Galle	Minen	Lochfraß	Minen	Lochfraß	Galle
Transporter										
Ionen										
Phosphate transporter b	-0.76	0.38	-0.16	-0.08	0.02	-0.19	0.11	-0.94	-1.83	-0.66
ABC-Typ										
BAT1	x	3.13	x	x	x	x	x	1.11	x	x
BAT1	-0.88	x	x	-1.28	-0.70	x	-0.29	1.07	2.95	x
BAT1	0.53	0.62	-0.39	-0.15	0.25	1.04	0.13	0.61	0.55	-1.11
BAT1	-0.05	x	-0.16	x	-0.53	0.28	-1.22	0.84	1.00	x
BAT1	-0.77	0.44	-0.10	-0.31	0.05	0.18	0.06	-0.58	-1.87	-0.16
BAT1	-0.68	-0.06	-0.40	-0.10	0.12	-0.19	-0.05	-0.78	-1.57	-0.29
BAT1a	-0.54	-0.02	-0.12	0.05	0.37	-0.26	0.14	-0.51	-1.10	-0.24
BAT1d	-0.66	0.11	-0.06	-0.01	-0.08	-0.19	-0.12	-0.69	-1.39	-0.11
Major facilitator superfamily MFS1	-0.57	2.60	-1.17	-0.47	-0.68	-0.06	-0.35	0.33	-3.21	0.14
Andere										
Multidrug resistance-associated protein	-1.16	0.29	0.07	-0.23	0.20	-0.15	0.15	-0.36	-0.91	0.00
Sulphate transporter	-0.67	0.11	-0.50	-0.18	-0.10	-0.26	0.26	-0.65	-1.64	-0.32
Intrazellulärer Transport										
Mitochondrial										
Adenine nucleotide translocator	-0.60	0.12	0.02	-0.26	0.52	-0.42	0.04	-0.40	-1.83	-0.51
Vesikular										
GDP dissociation inhibitor	-0.85	0.04	-0.07	0.11	0.35	-0.36	0.12	-0.57	-1.18	-0.43
Zellstruktur										
Zellwand/ Stressantwort										
Putative membrane protein	-0.94	0.69	-0.69	x	0.19	0.86	-1.31	0.45	0.28	-1.67
Zytoskelett										
Alpha-tubulin	-0.42	1.03	0.35	-0.18	1.71	-0.05	0.38	-0.19	-1.40	1.60
Chloroplasten										
Aminolevulinic acid dehydratase	-0.16	0.68	0.42	0.49	0.68	-0.13	-0.18	-1.17	-4.19	0.05
PS II type I chlorophyll a/b-binding protein a	-0.65	0.01	0.63	-0.60	0.32	-0.11	-0.19	-0.32	-1.32	-0.26
PS II type I chlorophyll a/b-binding protein b	-0.34	0.21	0.55	-0.08	0.41	0.18	0.07	-0.73	-2.05	-0.43
Light harvesting chlorophyll a/b binding protein	-0.63	-0.01	1.64	-0.61	0.13	0.11	0.11	0.16	-0.65	-0.09
NifU-like protein	-0.03	1.32	0.17	-0.16	-0.30	0.00	-0.01	0.34	0.43	0.09
PS I reaction center protein subunit II (psaD)	-1.04	-0.63	-0.05	-0.28	-0.21	-0.34	0.35	-0.22	-0.26	-0.13
PS I reaction center subunit VI	-0.30	x	-0.67	x	x	-0.48	-0.82	-0.83	-1.55	-0.51
PS II stability/assembly factor HCF136, chloroplast	-0.51	x	x	x	-0.49	x	x	x	-1.21	x
Red chlorophyll catabolite reductase	-0.30	4.47	0.12	-0.04	-0.08	0.35	0.02	0.84	0.41	0.41
Rieske [2Fe-2S] region	0.08	2.98	-0.40	-0.05	-0.56	0.57	x	2.42	-0.48	-0.07
RNA binding / nucleic acid binding	-0.26	2.62	-0.27	-0.08	-0.48	0.37	-0.12	0.39	-0.13	-0.02
RNA recognition motif-containing protein	0.50	4.03	-0.19	-0.38	-0.67	-0.07	-0.41	0.87	-0.14	x
RNA-binding region RNP-1	x	10.48	-2.22	0.05	x	-0.06	-0.69	1.61	-1.05	x
Thylakoid lumen 15.0 kDa protein	-1.11	0.39	0.14	-0.47	0.07	-0.06	-0.13	-0.79	-1.48	-0.19
Ty1-copia-like retrotransposon partial pol pseudogene	-0.17	0.35	-0.42	-0.06	-0.18	-0.56	0.15	-1.39	-2.01	-0.83
Signaltransduktion										
Kinasen										
4-(cytidine 5'-phospho)-2-C-methyl-D-erithritol kinase	-1.04	0.80	-0.08	-0.08	-0.04	0.17	0.18	-0.38	-1.07	-0.43
Nucleoside diphosphate kinase II	-0.47	0.28	-0.20	0.06	0.23	-0.13	-0.02	-0.85	-2.10	-0.26
PfkB-type carbohydrate kinase family protein	-0.50	0.99	0.09	-0.10	0.74	0.05	0.03	-0.82	-3.37	-0.14
Phosphatidylinositol 3- and 4-kinase, catalytic	x	x	x	x	0.31	x	-1.33	x	x	x
Phosphoribulokinase	-1.82	-0.28	-0.27	-0.12	-0.12	-0.01	0.25	0.03	0.19	0.00
Protein kinase	-0.91	0.68	-0.02	0.14	-0.01	-0.06	0.01	-0.49	-1.02	-0.35
Protein kinase	-0.40	0.21	-0.26	0.04	0.17	-0.36	0.19	-0.93	-2.00	-0.22
Salicylic-induced protein kinase	x	x	-1.18	-0.94	-0.92	0.22	-0.23	0.39	1.39	x
Serine/threonine/tyrosine kinase	-0.43	0.37	-0.18	0.11	0.26	-0.37	-0.27	-0.92	-2.03	-0.03
Wound-induced protein kinase	x	x	-0.61	x	x	0.44	-0.28	x	2.50	x
Wound-inducible carboxypeptidase	-0.48	0.44	-0.32	0.15	0.19	-0.36	-0.04	-0.76	-3.03	-0.49
Sonstige										
ACC oxidase b	-0.75	0.54	-0.02	-0.01	0.52	0.06	-0.01	-1.07	-2.24	-0.14

Tabelle 58: Durch Insekten veränderte Transkriptspiegel (\log_2 Ratio) von ESTs der Abwehr/Krankheit und des Sekundärmetabolismus in unterschiedlichen Ozonkonzentrationen der etwa 60 Jahre alten Buchen (*Fagus sylvatica* L.) des Kranzberger Forstes, eingeteilt in Schadbilder, Sonnen- und Schattenblätter (dunkelgrün = reprimiert, CV<50; orange = induziert, hellgrün = reprimiert).

Genname	1x ambient Ozon					2x ambient Ozon				
	Schattenblätter		Sonnenblätter			Schattenblätter		Sonnenblätter		
	Minen	Lochfraß	Minen	Lochfraß	Galle	Minen	Lochfraß	Minen	Lochfraß	Galle
Krankheit/ Abwehr										
Abwehrverwandt										
14-3-3 related protein SGF14A	-0.64	-0.03	-0.15	0.09	0.06	0.03	0.21	-0.23	-1.02	0.34
NtPRp27-like protein	-0.16	1.03	-0.05	0.12	0.08	0.12	-0.11	-0.49	-1.86	-0.17
Stressantwort										
Amine oxidase	-0.57	0.45	-0.08	0.28	0.29	-0.11	0.21	-0.66	-2.49	-0.24
Cysteine proteinase	-0.22	0.59	-0.04	-0.14	0.37	-0.27	-0.07	-0.33	-2.48	-0.10
DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein	-0.55	-0.05	-0.28	-0.02	-0.27	-0.20	0.13	-0.16	-1.36	-0.40
DNAJ heat shock protein	-0.57	0.53	-0.13	0.22	0.30	-0.32	0.57	-1.22	-3.32	0.21
DnaJ protein	-0.48	0.35	0.07	0.11	0.26	-0.16	0.42	-0.49	-1.53	-0.19
Heat shock protein binding	0.06	7.50	x	x	0.17	x	-1.63	x	x	x
Putative drought-induced protein RDI	-0.46	x	-0.39	0.06	-1.01	-0.21	-2.02	1.11	0.16	-0.21
Stress and pathogenesis-related protein	-0.43	0.11	0.17	0.30	0.28	-0.32	0.04	-0.27	-2.62	0.08
Entgiftung										
Glutamylcysteine synthetase	-0.61	0.89	-0.02	0.16	0.24	-0.17	0.12	-0.94	-3.14	-0.18
Glutathione S-transferase	-0.35	0.65	0.27	0.16	0.53	-0.09	-0.02	-1.31	-3.54	-0.55
Katalase a_catalase (cat2 gene)	-0.63	0.60	-0.12	0.08	0.35	0.27	-0.07	-0.57	-2.08	-0.16
L-ascorbate oxidase (Ascorbase)	0.46	0.05	-0.22	0.18	-0.50	-0.26	0.10	-0.41	-1.99	-1.21
Lipoxygenase	-0.22	0.34	-0.04	0.31	-0.06	0.28	0.24	-0.88	-2.52	0.07
Lipoxygenase	-0.62	0.79	0.18	-0.08	0.11	-0.07	-0.25	-0.91	-2.70	-0.34
Manganese superoxide dismutase	-0.23	-0.15	0.17	-0.64	-0.32	-0.01	-0.17	0.16	-6.26	-0.29
Peroxidase	0.37	1.42	0.34	-0.32	-0.14	0.40	0.21	0.44	-0.04	x
Superoxiddismutase Fe	-0.47	0.26	-0.25	-0.05	-1.30	-0.57	-0.36	-0.67	-1.87	-0.70
Sonstige										
Chitinase-like protein	-0.90	0.81	-0.11	-0.08	1.93	-0.43	-0.22	0.01	-0.50	2.71
Disease resistance protein	0.19	5.82	-0.45	x	-1.72	0.21	-0.32	0.26	-0.15	x
Hypersensitive-induced response protein	-0.82	0.45	-0.28	0.02	0.13	-0.24	-0.04	-0.48	-1.49	0.02
Prunasin hydrolase isoform PH I precursor	-0.17	0.58	-0.14	0.15	-0.25	0.75	0.01	-0.56	-1.59	-0.30
Putative senescence-associated protein	-0.20	1.29	0.00	-0.41	-0.68	0.21	-1.10	0.46	-4.93	0.30
Sekundärmetabolismus										
Phenylpropanoide										
4-coumarate:CoA ligase	0.10	-0.02	-0.29	x	x	-0.35	0.15	0.37	0.54	1.36
Anthocyanidin synthase	-0.72	0.34	-0.28	-0.31	0.06	0.22	0.38	-0.07	-1.08	0.11
Caffeic acid O-methyltransferase	-0.83	0.27	0.15	0.09	0.35	0.14	-0.22	-0.21	-1.20	-0.04
Caffeic acid O-methyltransferase	0.09	-0.02	-0.34	0.10	-0.62	-0.22	-0.33	x	-2.30	x
Flavanone 3-hydroxylase (F3H gene)	-0.78	0.05	0.01	-0.18	0.11	0.16	0.50	-0.02	-1.05	0.16
Flavonoid 3-O-galactosyl transferase	-0.61	0.15	-0.53	-0.25	-0.30	-0.06	-0.44	-0.46	-1.07	0.07
Isoflavone reductase-related	0.07	-0.46	-0.05	-0.40	0.00	-0.08	0.16	0.07	-6.21	-0.29
Methyltransferase MT-A70 family protein	-0.75	0.74	-0.56	-0.34	-0.05	-0.28	-0.18	-0.75	-2.36	-0.42
Phenylalanine ammonium lyase	0.11	0.20	-0.49	-0.56	-1.18	-0.58	-0.12	x	-0.26	1.22
Sonstige										
Benzoyl coenzyme A: benzyl alcohol benzoyl transferase	-0.58	0.22	-0.22	-0.27	-0.07	-0.39	-0.06	-0.30	-1.58	-0.27
Chalcone reductase-like protein	-0.72	0.79	-0.45	-0.47	0.02	-0.46	0.20	-0.81	-2.18	-0.59

Tabelle 59: Durch Insekten veränderte Transkriptspiegel (\log_2 Ratio) von unklassifizierten ESTs und ESTs unklarer Einteilung in unterschiedlichen Ozonkonzentrationen der etwa 60 Jahre alten Buchen (*Fagus sylvatica* L.) des Kranzberger Forstes, eingeteilt in Schadbilder, Sonnen- und Schattenblätter (dunkelgrün = reprimiert, CV<50; orange = induziert, hellgrün = reprimiert).

Genname	1x ambient Ozon					2x ambient Ozon				
	Schattenblätter		Sonnenblätter			Schattenblätter		Sonnenblätter		
	Minen	Lochfraß	Minen	Lochfraß	Galle	Minen	Lochfraß	Minen	Lochfraß	Galle
Unklare Einteilung										
Aldehyde dehydrogenase	-0.42	0.67	-0.16	0.09	0.47	-0.02	x	-1.00	-3.34	-0.11
Aldehyde dehydrogenase 1 precursor	-0.63	0.01	-0.01	0.03	-0.09	-0.16	0.32	-0.27	-1.10	-0.09
Beta-galactosidase = Lactase a	-0.42	0.54	-0.08	-0.06	-0.01	-0.37	-0.20	-0.79	-2.84	-0.02
Beta-galactosidase = Lactase b	-0.23	0.35	0.47	0.18	0.08	0.07	0.21	-0.17	-2.77	0.41
Putative permease gene	-0.45	0.27	-0.17	0.10	0.03	-0.04	0.33	-0.74	-2.42	-0.05
Unklassifiziert										
Expressed protein	-0.38	0.44	-0.13	0.24	0.11	0.01	0.05	-0.22	-1.61	0.36
Expressed protein	-0.63	0.90	-0.05	0.17	0.27	0.00	0.18	-0.43	-1.47	-0.12
Expressed protein	-1.31	0.05	-0.02	0.02	0.21	-0.07	0.25	-0.41	-1.50	-0.53
Expressed protein	-0.70	0.67	-0.11	0.02	0.02	-0.17	0.34	-1.19	-2.50	-0.12
Expressed protein	-0.45	0.01	-0.49	-0.16	0.24	-0.49	-0.52	-1.16	-3.20	-0.69
Expressed protein	-0.66	0.74	-0.14	0.14	0.92	-0.51	0.08	-0.90	-2.61	-0.24
Expressed protein	-1.08	0.24	-0.13	0.10	0.22	-0.62	-0.34	-1.15	-4.43	-0.18
Hypothetical protein 3	-0.32	2.87	-1.70	1.94	-0.39	0.06	-0.37	0.53	0.58	-0.35
Hypothetical protein 3	-0.15	-0.11	-0.26	-0.72	-0.34	-0.11	-0.81	0.12	-5.58	-0.23
Hypothetical protein 3	x	2.96	-0.11	-0.83	-0.47	-0.06	x	0.82	-0.80	x
Microsatellite DNA	-0.32	0.12	-0.29	0.02	0.04	0.23	0.03	-0.37	-1.07	-0.29
Microsatellite sequence	-0.62	-0.15	-0.42	-0.23	-0.08	-0.27	-0.02	-1.28	-3.06	-0.66
Putative polyketide synthase module	-1.03	-0.16	-0.25	-0.18	-0.08	0.07	x	-0.08	-0.08	0.00
Putative protein	-1.49	-0.08	-0.45	0.08	-0.17	-0.11	-1.01	-0.39	x	-0.22
Unknown protein	x	5.81	x	x	-0.65	x	-1.06	x	x	0.43
Unknown protein	-0.53	0.84	-0.18	0.07	0.14	-0.21	0.22	-0.91	-2.77	-0.57
Unknown protein	-1.82	3.86	-5.30	x	-0.42	1.14	-1.00	x	-0.46	x
Unkown protein	-0.25	-0.16	-0.20	-1.22	-0.75	-0.28	-0.76	0.28	-2.01	0.04

Tabelle 60: Durch Insekten veränderte Transkriptspiegel (\log_2 Ratio) der unbekannt ESTs in den unterschiedlichen Ozonkonzentrationen der etwa 60 Jahre alten Buchen (*Fagus sylvatica* L.) des Kranzberger Forstes, eingeteilt in Schadbilder, Sonnen- und Schattenblätter.

Genname	2x ambient Ozon					Kontrollbedingungen				
	Schattenblätter		Sonnenblätter			Schattenblätter		Sonnenblätter		
	Minen	Lochfraß	Minen	Lochfraß	Galle	Minen	Lochfraß	Minen	Lochfraß	Galle
reprimiert	0	39	19	130	1	8	0	5	4	13
induziert	11	1	33	23	1	2	86	2	0	1

7 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Schematische Darstellung der photochemischen Ozonbildung in der Troposphäre (KW = Kohlenwasserstoffe) (VOLZ-THOMAS et al., 1990)	5
Abbildung 2: Ozonwirkung innerhalb pflanzlichen Gewebes, modifiziert nach LANGEBARTELS et al. (2002).....	6
Abbildung 3: Infektionszyklus <i>P. citricola</i> , modifiziert nach ERWIN und RIBEIRO (1996)	7
Abbildung 4: Infektion und Schadbild von <i>A. errabunda</i> in Anlehnung an BUTIN (1989).	8
Abbildung 5: Signalkette in der pflanzlichen Zelle nach Pathogenbefall, modifiziert nach LANGEBARTELS et al. (2002).	9
Abbildung 6: Gallenbildung durch <i>M. fagi</i>	11
Abbildung 7: Lochfraß (A) und Minierung (B) durch Käfer beziehungsweise Imago von <i>R. fagi</i> . ..	11
Abbildung 8: Überblick über den Arbeitsablauf zur Erstellung des Buchen cDNA-Microarrays ...	16
Abbildung 9: Containerbelegung bei Buche in Misch- und Monokultur. Anmerkung: für die Transkriptanalysen wurden nur die Randbäume verwendet.	39
Abbildung 10: Aufstellung der Buchen im Gewächshaus (gelb = 2x ambientes CO ₂ , blau = ambiente Bedingungen, rot = 2x ambientes Ozon, rot umrandet = <i>A. errabunda</i> infiziert, grün = uniniziert).	40
Abbildung 11: Lysimeterbuchen 2003 (Foto von E. Bieber).....	41
Abbildung 12: Funktionelle Einteilung der bekannten ESTs (Angabe in Prozent; A=frühe SSH; B=späte SSH)	44
Abbildung 13: Microarraybelegung, funktionelle Einteilung der 489 bekannten ESTs (Angabe in Prozent).....	44
Abbildung 14: Lignin, Zellulose und restlichen Zellwandbestandteile in Prozent vom Trockengewicht der dreijährigen Klimakammerbuchen unter 1x ambientem CO ₂ (hell) und 2x ambientem CO ₂ (dunkel) zu den Zeitpunkten 24 Stunden und 16 Tagen. Die Zellulose nahm signifikant im Laufe der Zeit ab (p < 0,05).	47
Abbildung 15: SOM2 der dreijährigen Buchen, die in der Klimakammer unter ambienten und 2x ambienten CO ₂ kultiviert und mit <i>P. citricola</i> infiziert wurden.....	60
Abbildung 16: A: SOM9 der dreijährigen Buchen, die in der Klimakammer unter ambienten und 2x ambienten CO ₂ kultiviert und mit <i>P. citricola</i> infiziert wurden.....	61
Abbildung 17: Aufreihung der Transkriptspiegel der Klimakammerbuchen unter 1x und 2x ambienten CO ₂ -Bedingungen, 24 und 41 Stunden nach der Infektion mit <i>P. citricola</i> (pink =	

1x CO ₂ ; gelb = 2x CO ₂). Die Funktionellen Klassen sind von 1 bis 20 durchnummeriert, falls notwendig, werden diese im laufenden Text erklärt.	62
Abbildung 18: Aufreihung der Transkriptspiegel der Klimakammerbuchen unter 1x und 2x ambienten CO ₂ -Bedingungen, sechs und 16 Tage nach der Infektion mit <i>P. citricola</i> (pink = 1x CO ₂ ; gelb = 2x CO ₂).	63
Abbildung 19: Vorhersage der Trefferquote durch die Trennung bezüglich der CO ₂ -Konzentration durch <i>P. citricola</i> Infektion. Trennung unter Einbeziehung aller funktionellen Klassen.	64
Abbildung 20: Durch SVM generierte Trennbilder bezüglich CO ₂ -Exposition (blau = 1x CO ₂ , orange = 2x CO ₂) nach der <i>P. citricola</i> Infektion. Einbezogen waren alle funktionellen Klassen.	64
Abbildung 21: Vorhersage der Trefferquote durch die Trennung bezüglich der CO ₂ -Konzentration durch <i>P. citricola</i> Infektion. Trennung unter Einbeziehung der funktionellen Klassen des Grundmetabolismus.	65
Abbildung 22: Durch SVM generierte Trennbilder bezüglich CO ₂ -Exposition (blau = 1x CO ₂ , orange = 2x CO ₂), nach der <i>P. citricola</i> Infektion. Einbezogen waren die funktionellen Klassen des Grundstoffwechsels.	65
Abbildung 23: Vorhersage der Trefferquote durch die Trennung bezüglich der CO ₂ -Konzentration durch <i>P. citricola</i> Infektion. Trennung unter Einbeziehung der funktionellen Klassen Signaltransduktion, Sekundärmetabolismus, Abwehr und Krankheit.	66
Abbildung 24: Durch SVM generierte Trennbilder bezüglich CO ₂ -Exposition (blau = 1x CO ₂ , orange = 2x CO ₂), nach der <i>P. citricola</i> Infektion. Einbezogen waren die funktionellen Klassen Signaltransduktion, Sekundärmetabolismus, Abwehr und Krankheit.	66
Abbildung 25: SOM3 von den Transkriptdaten der Ozon-behandelten Buchen in Mono- und Mischkultur mit Fichte zu verschiedenen Probennahmezeitpunkten (02.06.05 = 2x ambient Ozon, 0h= genau vor dem Ozonpeak von 200 ppb und 16h, 24h, 48h und 3d danach).	73
Abbildung 26: SOM1 von den Transkriptdaten der Ozon-behandelten Buchen in Mono- und Mischkultur mit Fichte zu verschiedenen Probennahmezeitpunkten (02.06.05 = 2x ambient Ozon, 0h= genau vor dem Ozonpeak von 200 ppb und 16h, 24h, 48h und 3d danach).	74
Abbildung 27: SOM4 von den Transkriptdaten der Ozon-behandelten Buchen in Mono- und Mischkultur mit Fichte zu verschiedenen Probennahmezeitpunkten (02.06.05 = 2x ambient Ozon, 0h= genau vor dem Ozonpeak von 200 ppb und 16h, 24h, 48h und 3d danach).	75

- Abbildung 28: SOM5 von den Transkriptdaten der Ozon-behandelten Buchen in Mono- und Mischkultur mit Fichte zu verschiedenen Probennahmezeitpunkten (02.06.05 = 2x ambient Ozon, 0h= genau vor dem Ozonpeak von 200 ppb und 16h, 24h, 48h und 3d danach). 76
- Abbildung 29: SOM9 von den Transkriptdaten der Ozon-behandelten Buchen in Mono- und Mischkultur mit Fichte zu verschiedenen Probennahmezeitpunkten (02.06.05 = 2x ambient Ozon, 0h= genau vor dem Ozonpeak von 200 ppb und 16h, 24h, 48h und 3d danach). 77
- Abbildung 30: Hierarchisches Cluster Transkriptdaten der Ozon-behandelten Buchen in Mono- und Mischkultur mit Fichte zu verschiedenen Probennahmezeitpunkten (02.06.05 eine Woche vor dem Ozonpeak, 0h= genau vor Exposition des Ozonpeaks von 200 ppb und 16h, 24h, 48h und 3d nach Ozonpeak). 78
- Abbildung 31: Transkriptdaten unmittelbar vor (0 Stunden) und drei Tage nach dem Ozonpeak der Buchen in Mono- (blau) und Mischkultur (grün). Die funktionellen Klassen sind an der y-Achse aufgetragen, die Transkriptspiegel (\log_2 Ratio) ohne nur nullnahe Werte auf der x-Achse. 79
- Abbildung 32: Darstellung der induzierten (rot) und reprimierten (grün) ESTs der Buchen in Misch- und Monokultur drei Tage nach Exposition von 200 ppb Ozon innerhalb der einzelnen Stoffwechselwege. 80
- Abbildung 33: Gehalt an genomischer *A. errabunda*-DNA 21 Tage nach der *A. errabunda*-Infektion der fünfjährigen Gewächshausbuchen, die unter verschiedenen Bedingungen (ambient, 2x ambient CO₂- und 2x ambient Ozon) standen. 83
- Abbildung 34: Gehalt an Flavonoiden in % vom Frischgewicht der Gewächshausbuchen (Ozon: Bäume 2 bis 8; CO₂: Bäume 1, 3, 4, 6 bis 9, 11, 12; Kontrollbäume: 1 bis 3, 6, 8 bis 10) am 29.05.06 (t=0) und 19.06.06 (t=5) unter ambienten, 2x ambient Ozon- und 2x ambient CO₂-Bedingungen. 86
- Abbildung 35: Gehalt an Flavonoiden in % vom Frischgewicht der Gewächshausbuchen (Ozon: Bäume 11, 13, 15, 17 bis 19, 21, 22; CO₂: Bäume 13, 14, 16, 17, 19, 21, 22, 24; Kontrollbäume: 12, 14, 16 bis 20) am 29.05.06 (t=0) vor und Gewächshausbuchen am 19.06.06 (t=5) nach der Infektion unter Kontroll-, 2x ambient Ozon- und 2x ambient CO₂-bedingungen. 87
- Abbildung 36: Gesamtflavonoide in % vom Frischgewicht der nicht infizierten Gewächshausbuchen (Ozon: Bäume 2 bis 8; CO₂: Bäume 1, 3, 4, 6 bis 9, 11, 12; Kontrollbäume: 1 bis 3, 6, 8 bis 10) am 29.05.06 (t=0) und der infizierten Gewächshausbuchen (Ozon: Bäume 11, 13, 15, 17 bis 19, 21, 22; CO₂: Bäume 13, 14, 16,

17, 19, 21, 22, 24; Kontrollbäume: 12, 14, 16 bis 20) am 19.06.06 (t=5) unter Kontroll-, 2x ambient Ozon- und 2x ambient CO ₂ -Bedingungen.	88
Abbildung 37: Flächeneinheiten der gesamten Zellwandhydrolysen pro mg Frischgewicht der nicht infizierten Gewächshausbuchen am 29.05.06 (t=0) und der infizierten Gewächshausbuchen am 19.06.06 (t=5) unter Kontroll-, 2x ambient Ozon- und 2x ambient CO ₂ -Bedingungen.	89
Abbildung 38: Flächeneinheiten der Zellwandhydrolysen nach 33,5 min pro mg Frischgewicht der nicht infizierten Gewächshausbuchen am 29.05.06 (t=0) und der infizierten Gewächshausbuchen am 19.06.06 (t=5) unter ambienten, 2x ambient Ozon- und 2x ambient CO ₂ -Bedingungen.	89
Abbildung 39: Maximale Quantenausbeute der nicht infizierten und infizierten (29.05.06 mit <i>A. errabunda</i>) Gewächshausbuchen, die unter normalen, 2x ambienten Ozon und 2x ambienten CO ₂ -Bedingungen standen (Messdaten: Thorsten Grams, TUM).....	90
Abbildung 40: Maximale Quantenausbeute der Gewächshausbuchen, die unter normalen Bedingungen standen und am 29.05.06 mit <i>A. errabunda</i> infiziert wurden (*signifikant unterschiedliche Werte).....	91
Abbildung 41: Bilder des Imaging PAM Chlorophyll Fluorometer einer nicht infizierten (A) und einer infizierten (B) fünfjährigen Buche, die unter normalen Bedingungen im Gewächshaus standen (Bilder: Thorsten Grams, TUM).	91
Abbildung 42: Sekundärmetabolite (%) bezogen auf das Frischgewicht der Lysimeterbuchen unter ambienten und 2x ambienten Ozonbedingungen. Eine signifikante Gehaltsabnahme über die Zeit wurde für die Hydroxyzimtsäurederivate (nicht linear), Kämpferolderivate (linear und nicht linear), Quercetinderivate (linear), acylierte Flavonolglycoside (linear) und Flavan/Flavanon (linear) festgestellt. Ein signifikanter Einfluss von Ozon wurde für die Hydroxyzimtsäurederivaten (nicht lineare) und acylierten Flavonolglycoside (linear) gesehen.	98
Abbildung 43: Gesamtflavonolderivate (in %) bezogen auf das Frischgewicht der Lysimeterbuchen im Jahr 2005 unter ambienten und 2x ambienten Ozonbedingungen. Signifikante zeitliche Abnahme der Gesamtflavonolderivatgehalte.	99
Abbildung 44: Gesamtgehalt an löslichen phenolischen Inhaltsstoffen in % vom Frischgewicht im Jahr 2005 der Lysimeterbuchen unter ambientem und 2x ambientem Ozon. Im nicht linearem Modell (Behandlung*Tage ²) wurde ein signifikanter Ozoneinfluss im zeitlichen Verlauf im Juli und Oktober festgestellt.	100

-
- Abbildung 45: Gehalt an freiem ACC in nmol/g Frischgewicht, der Buchen des Kranzberger Forstes unter ambientem und 2x ambientem Ozon. Die Probennahme der Schatten- und Sonnenblätter fand an folgenden Terminen statt: 12.05., 21.06., 05.08., 19.09., 13.10.2005. 103
- Abbildung 46: Gehalt an konjugiertem ACC in nmol/g Frischgewicht der Buchen des Kranzberger Forstes unter ambientem und 2x ambientem Ozon. Die Probennahme der Schatten- und Sonnenblätter fand an folgenden Terminen statt: 12.05., 21.06., 05.08., 19.09., 13.10.2005. 104
- Abbildung 47: Zellwand-gebundener ACC-Gehalt in nmol/g Frischgewicht der Buchen des Kranzberger Forstes unter ambientem und 2x ambientem Ozon. Die Probennahme der Schatten- und Sonnenblätter fand an folgenden Terminen statt: 12.05., 21.06., 05.08., 19.09., 13.10.2005. 105
- Abbildung 48: Gesamt ACC-Gehalt in nmol/g Frischgewicht der Buchen des Kranzberger Forstes unter ambientem und 2x ambientem Ozon. Die Probennahme der Schatten- und Sonnenblätter fand an folgenden Terminen statt: 12.05., 21.06., 05.08., 19.09., 13.10.2005. 106
- Abbildung 49: Trockengewicht in mg, der Kranzberger Forst Buchen unter ambientem und 2x ambientem Ozon. Die Probennahme der Schatten- und Sonnenblätter fand an folgenden Terminen statt: 12.05., 21.06., 05.08., 19.09., 13.10.2005. Das Trockengewicht der Sonnenblätter war signifikant höher, als das der Schattenblätter, des Weiteren wurde im nicht linearen Modell eine signifikante Änderung der Trockengewicht über den Jahresverlauf festgestellt. 107
- Abbildung 50: Prozentualer Zellwandgehalt vom Trockengewicht der Kranzberger Forstbuchen unter ambientem und 2x ambientem Ozon. Die Probennahme der Schatten- und Sonnenblätter fand an folgenden Terminen statt: 12.05., 21.06., 05.08., 19.09., 13.10.2005. 108
- Abbildung 51: Prozentualer Zellulosegehalt vom Trockengewicht der Kranzberger Forst Buchen unter ambientem und 2x ambientem Ozon. Die Probennahme der Schatten- und Sonnenblätter fand an folgenden Terminen statt: 12.05., 21.06., 05.08., 19.09., 13.10.2005. Signifikante Zunahme der Zellulose über die Zeit. 109
- Abbildung 52: Zusammenfassung der reprimierten (grün) und induzierten (rot) ESTs in den einzelnen funktionellen Klassen, eingeteilt nach Sonnen- und Schattenblätter und den

einzelnen Schadbildern (M= Minierung durch <i>R. fagi</i> , LF= Lochfraß durch <i>R. fagi</i> , G= Gallenbildung durch <i>M. fagi</i>).	110
Abbildung 53: Hierarchisches Cluster der durch Insekten veränderten Transkriptspiegel aller ESTs des Buchen-Microarrays. Die etwa 60 Jahre alten Buchen (<i>Fagus sylvatica</i> L.) des Kranzberger Forstes wuchsen in unterschiedlichen Ozonkonzentrationen und sind in Sonnen- und Schattenblättern und nach den verschiedenen Schadbildern eingeteilt.....	115
Abbildung 54: SOM6 der etwa 60 Jahre alten Buchen (<i>Fagus sylvatica</i> L.) des Kranzberger Forstes unter 1x und 2x ambientem Ozon, eingeteilt in Sonnen- und Schattenblättern und nach den verschiedenen Schadbildern.	116
Abbildung 55: A: SOM 3 der etwa 60 Jahre alten Buchen (<i>Fagus sylvatica</i> L.) aus dem Kranzberger Forst unter 1x ambientem und 2x ambientem Ozon, eingeteilt in Sonnen- und Schattenblättern und nach den verschiedenen Schadbildern.	117
Abbildung 56: Transkriptdaten der Kranzberger Forst Buchen, Schadbild Lochfraß an Sonnenblättern (pink = 1x Ozon, gelb = 2x Ozon). Die funktionellen Klassen sind an der y-Achse aufgetragen, die Transkriptspiegel (\log_2 Ratio) an der x-Achse.	118
Abbildung 57: Transkriptdaten der Kranzberger Forst Buchen, Schadbild Lochfraß und Minierung an Schattenblättern (pink = 1x Ozon, gelb = 2x Ozon). Die funktionellen Klassen sind an der y-Achse aufgetragen, die Transkriptspiegel (\log_2 Ratio) an der x-Achse.....	119
Abbildung 58: Transkriptdaten der Kranzberger Forst Buchen unter ambienten Bedingungen, Schadbilder Minierung und Lochfraß (gelb = Sonnenblätter, pink = Schattenblätter). Die funktionellen Klassen sind an der y-Achse aufgetragen, die Transkriptspiegel (\log_2 Ratio) auf der x-Achse.	120
Abbildung 59: Transkriptdaten der Kranzberger Forst Buchen unter 2x ambienten Ozonbedingungen, Schadbild Minierung (gelb = Sonnenblätter, pink = Schattenblätter). Die funktionellen Klassen sind an der y-Achse aufgetragen, die Transkriptspiegel (\log_2 Ratio) auf der x-Achse.	121
Abbildung 60: Durch SVM generierte Trennbilder bezüglich Ozonexposition (blau = 1x Ozon, orange = 2x Ozon), Schadbilder (Lochfraß, Gallenbildung, Minierung) und Blatttypen (Schatten- und Sonnenblätter). Nur ESTs ohne nur nullnahe Werte.....	122
Abbildung 61: Vorhersage der Trefferquote durch die Trennung bezüglich Ozonexposition durch die einzelnen Schadbilder und Blatttypen.	123

Abbildung 62: Durch SVM generierte Trennbilder bezüglich Ozonexposition (blau = 1x Ozon und orange = 2x Ozon), Schadbilder (Lochfraß, Minierung) und Blatttypen (Schatten- und Sonnenblätter).....	123
Abbildung 63: Temperaturverlauf in den verschiedenen Kammern (ambient, 2x ambient Ozon, 2x ambient CO ₂) des Gewächshauses der GSF im Versuchszeitraum vom 09. April bis 19. Juni des Jahres 2006.	188

8 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Sequenzierungs-PCR-Protokoll für den Thermocycler	17
Tabelle 2: Amplifizierungsprotokoll der cDNA für den Microarray	18
Tabelle 3: Thermocyclerprotokoll für die Amplifizierung der Microarray cDNA	19
Tabelle 4: RT-PCR-Ansatz pro Reaktion	22
Tabelle 5: AA-dNTP-Mix (10-fach)-Zusammensetzung	22
Tabelle 6: Primersequenzen, der zur qRT-PCR verwendeten Primer	30
Tabelle 7: HPLC- Komponenten	32
Tabelle 8: Lösungsmittelzusammensetzung	33
Tabelle 9: Gradientenprogramm für lösliche Inhaltsstoffe	33
Tabelle 10: Gradientenprogramm für zellwandgebundene Inhaltsstoffe	33
Tabelle 11: Kulturdaten der einzelnen Klimakammern in Freising	38
Tabelle 12: Gesamtübersicht der durch BlastN/X gefundenen Homologien der frühen und späten SSH-Bank	43
Tabelle 13: Qualität der durch BlastN/X gefundenen Homologien für die frühe und späte SSH-Bank	43
Tabelle 14: Durch CO ₂ -veränderte Transkriptspiegel (log ₂ Ratio; n=6) der dreijährigen Klimakammerbuchen zu den Zeitpunkten 24 Stunden und 16 Tagen nach der <i>P. citricola</i> -Infektion (rot = induziert, CV<50; dunkelgrün = reprimiert, CV<50; orange = induziert, n=6; hellgrün = reprimiert, n=6).	45
Tabelle 15: CO ₂ -beeinflusste Transkriptspiegel der dreijährigen Klimakammerbuchen zu den Zeitpunkten 24 Stunden und 16 Tagen nach der <i>P. citricola</i> -Infektion, Vergleich der qRT-PCR- und Microarraydaten (qRT-PCR: orange = induziert, nicht signifikant, gelb = unverändert, Microarray: gelb = unverändert; dunkelgrün = reprimiert, CV<50; orange = induziert, n=6; hellgrün = reprimiert, n=6).	46
Tabelle 16: <i>P. citricola</i> -veränderte Transkriptspiegel (log ₂ Ratio) von ESTs des Primärmetabolismus und des Energiehaushaltes der unter 1x ambient und 2x ambient CO ₂ kultivierten dreijährigen Klimakammerbuchen (rot = induziert, CV<50; dunkelgrün = reprimiert, CV<50; orange = induziert, n=4; hellgrün = reprimiert, n=4).	49
Tabelle 17: <i>P. citricola</i> -veränderte Transkriptspiegel (log ₂ Ratio) von ESTs des Zellwachstums, der Zellteilung und der Transkription der unter 1x und 2x ambient CO ₂ kultivierten	

- dreijährigen Klimakammerbuchen (rot = induziert, CV<50; dunkelgrün = reprimiert, CV<50; orange = induziert, n=4; hellgrün = reprimiert, n=4). 50
- Tabelle 18: *P. citricola*-veränderte Transkriptspiegel (\log_2 Ratio) von ESTs der Proteinsynthese, des Proteinverbleibs und der Proteinlagerung der unter 1x ambient und 2x ambient CO₂ kultivierten dreijährigen Klimakammerbuchen (rot = induziert, CV<50; dunkelgrün = reprimiert, CV<50; orange = induziert, n=4; hellgrün = reprimiert, n=4). 52
- Tabelle 19: *P. citricola*-veränderte Transkriptspiegel (\log_2 Ratio) der Transporter-ESTs der unter 1x ambient und 2x ambient CO₂ kultivierten dreijährigen Klimakammerbuchen (rot = induziert, CV<50; dunkelgrün = reprimiert, CV<50; orange = induziert, n=4; hellgrün = reprimiert, n=4). 53
- Tabelle 20: *P. citricola*-veränderte Transkriptspiegel (\log_2 Ratio) von ESTs der Zellstruktur und der Signaltransduktion der unter 1x ambient und 2x ambient CO₂ kultivierten dreijährigen Klimakammerbuchen (rot = induziert, CV<50; dunkelgrün = reprimiert, CV<50; orange = induziert, n=4; hellgrün = reprimiert, n=4). 54
- Tabelle 21: *P. citricola*-veränderte Transkriptspiegel (\log_2 Ratio) von ESTs der Signaltransduktion, der Abwehr/Krankheit und des Sekundärmetabolismus der unter 1x ambient und 2x ambient CO₂ kultivierten dreijährigen Klimakammerbuchen (rot = induziert, CV<50; dunkelgrün = reprimiert, CV<50; orange = induziert, n=4; hellgrün = reprimiert, n=4). 56
- Tabelle 22: *P. citricola*-veränderte Transkriptspiegel (\log_2 Ratio) unklassifizierter ESTs und ESTs unklarer Einteilung der unter 1x ambient und 2x ambient CO₂ kultivierten dreijährigen Klimakammerbuchen (rot = induziert, CV<50; dunkelgrün = reprimiert, CV<50; orange = induziert, n=4; hellgrün = reprimiert, n=4). 58
- Tabelle 23: Anzahl der durch *P. citricola* induzierten beziehungsweise reprimierten unbekanntesten ESTs, der unter 1x ambient und 2x ambient CO₂ kultivierten dreijährigen Klimakammerbuchen. 58
- Tabelle 24: Vergleich der *P. citricola*-veränderten qRT-PCR- und Microarraytranskriptspiegel der dreijährigen Buchen, die in der Klimakammer unter ambientem CO₂ kultiviert wurden (qRT-PCR: rot = induziert, signifikant; orange = induziert, nicht signifikant; hellgelb = unverändert; grün reprimiert, signifikant; n=6; Microarray: rot = induziert, CV<50; orange = induziert; grün = reprimiert, CV>50; n=4). 59
- Tabelle 25: Vergleich der *P. citricola*-veränderten qRT-PCR- und Microarraytranskriptspiegel der dreijährigen Buchen, die in der Klimakammer unter 2x ambientem CO₂ kultiviert wurden (qRT-PCR: orange = induziert, nicht signifikant; gelb = unverändert; dunkelgrün = reprimiert,

- signifikant; n=6; Microarray: gelb = unverändert; hellgrün = reprimiert, n=4; dunkelgrün = reprimiert, CV>50; n=4). 59
- Tabelle 26: Nach SOM2 verlaufende ESTs der dreijährigen Buchen, die in der Klimakammer unter ambienten und 2x ambienten CO₂ kultiviert und mit *P. citricola* infiziert wurden. 60
- Tabelle 27: Nach der SOM9 verlaufende ESTs der dreijährigen Buchen, die in der Klimakammer unter ambienten und 2x ambienten CO₂ kultiviert und mit *P. citricola* infiziert wurden. 61
- Tabelle 28: Ozon-veränderte Transkriptspiegel (log₂Ratio) von ESTs des Primär- und Energiemetabolismus, der Buchen in Mono- und Mischkultur mit Fichte zu den Probennahmezeitpunkten: 02.06.05; 0 Stunden vor Erhöhung der Ozon-Konzentration auf 200 ppb und 16 Stunden bis 3 Tage danach. (rot = induziert, CV<50; orange = induziert, n=1-4; dunkelgrün = reprimiert, CV<50; hellgrün = reprimiert, n=1-4). 67
- Tabelle 29: Ozon-veränderte Transkriptspiegel (log₂Ratio) von ESTs des Zellwachstum, der Zellteilung und der Transkription, der Buchen in Mono- und Mischkultur mit Fichte zu den Probennahmezeitpunkten: 02.06.05; 0 Stunden vor Erhöhung der Ozon-Konzentration auf 200 ppb und 16 Stunden bis 3 Tage danach (orange = induziert, n=1-4; hellgrün = reprimiert, n=1-4). 68
- Tabelle 30: Ozon-veränderte Transkriptspiegel (log₂Ratio) von ESTs der Proteinsynthese, des Proteinverbleibs, der Proteinlagerung und des Transportes der Buchen in Mono- und Mischkultur mit Fichte zu den Probennahmezeitpunkten: 02.06.05; 0 Stunden vor Erhöhung der Ozon-Konzentration auf 200 ppb und 16 Stunden bis 3 Tage danach (rot = induziert, CV<50; orange = induziert, n=1-4; dunkelgrün = reprimiert, CV<50; hellgrün = reprimiert, n=1-4). 69
- Tabelle 31: Ozon-veränderte Transkriptspiegel (log₂Ratio) von ESTs der Zellstruktur und der Signaltransduktion, der Buchen in Mono- und Mischkultur mit Fichte zu verschiedenen Probennahmezeitpunkten: 02.06.05; 0 Stunden vor Erhöhung der Ozon-Konzentration auf 200 ppb und 16 Stunden bis 3 Tage danach (rot = induziert, CV<50; orange = induziert, n=1-4; dunkelgrün = reprimiert, CV<50). 70
- Tabelle 32: Ozon-veränderte Transkriptspiegel (log₂Ratio) von ESTs der Abwehr/Krankheit und des Sekundärmetabolismus, der Buchen in Mono- und Mischkultur mit Fichte zu verschiedenen Probennahmezeitpunkten: 02.06.05; 0 Stunden vor Erhöhung der Ozon-Konzentration auf 200 ppb und 16 Stunden bis 3 Tage danach (rot = induziert, CV<50; orange = induziert, n=1-4; dunkelgrün = reprimiert, CV<50; hellgrün = reprimiert, n=1-4). 71

Tabelle 33: Ozon-veränderte Transkriptspiegel (\log_2 Ratio) von unklassifizierten ESTs, der Buchen in Mono- und Mischkultur mit Fichte zu verschiedenen Probennahmezeitpunkten: 02.06.05; 0 Stunden vor Erhöhung der Ozon-Konzentration auf 200 ppb und 16 Stunden bis 3 Tage danach (rot = induziert, CV<50; orange = induziert, n=1-4; dunkelgrün = reprimiert, CV<50; hellgrün = reprimiert, n=1-4).	72
Tabelle 34: Anzahl der jeweils induzierten oder reprimierten unbekanntesten ESTs der Ozon-behandelten Buchen in Mono- und Mischkultur mit Fichte zu den Probennahmezeitpunkten: 02.06.05; 0 Stunden vor Erhöhung der Ozon-Konzentration auf 200 ppb und 16 Stunden bis 3 Tage danach.	73
Tabelle 35: ESTs, die nach der SOM3 verlaufen.	73
Tabelle 36: ESTs, die nach der SOM1 verlaufen.	74
Tabelle 37: ESTs, die nach der SOM4 (Abbildung 27) verlaufen.	75
Tabelle 38: ESTs, die nach der SOM5 (Abbildung 28) verlaufen.	76
Tabelle 39: ESTs die nach der SOM9 verlaufen.	77
Tabelle 40: Veränderung des Transkriptspiegel (\log_2 Ratio) durch 2x ambientes CO ₂ und 2x ambientes Ozon von fünfjährigen Gewächshausbuchen (rot = induziert, CV<50; dunkelgrün = reprimiert, CV<50; orange = induziert, n=15-24).	81
Tabelle 41: Vergleich der Transkriptspiegel (\log_2 Ratio) von Microarray und qRT-PCR (dunkelgelb markierte Werte = signifikante Unterschiede zwischen Behandlung und Kontrolle; p<0,05; Microarray: orange = induziert)	82
Tabelle 42: Veränderung des Transkriptspiegel (\log_2 Ratio) von fünfjährigen Gewächshausbuchen, unter ambienten Bedingungen (n=20), 2x ambienten CO ₂ - (n=18) und 2x ambienten Ozon-Bedingungen (n=16), 21 Tage nach der Infektion mit <i>A. errabunda</i> (hellgrün = reprimiert, n=12-20; orange = induziert, n=12-20).	84
Tabelle 43: Vergleich der Transkriptspiegel (\log_2 Ratio) von Microarray- und qRT-PCR-Daten, der fünfjährigen Gewächshausbuchen, unter ambienten Bedingungen (n=20), 2x ambienten CO ₂ - (n=18) und 2x ambienten Ozon-Bedingungen (n=16), 21 Tage nach der Infektion mit <i>A. errabunda</i> (Microarray: hellgrün = reprimiert, n=12-20; orange = induziert, n=12-20; qRT-PCR: gelb = unverändert, nicht signifikant).	85
Tabelle 44: Veränderte Transkriptspiegel (\log_2 Ratio) von ESTs des Primärmetabolismus, des Energiehaushaltes des Zellwachstums der Transkription und des Proteinstoffwechsels der sechsjährigen Ozon-behandelten Lysimeterbuchen (orange = induziert n=15-20; hellgrün = reprimiert, n=15-20; dunkelgrün = reprimiert, CV<50).	93

Tabelle 45: Veränderte Transkriptspiegel (\log_2 Ratio) von Transporter ESTs und ESTs der Zellstruktur der sechsjährigen Ozon-behandelten Lysimeterrandbuchen (orange = induziert, n=15-20; hellgrün = reprimiert, n=15-20; dunkelgrün = reprimiert, CV<50).	94
Tabelle 46: Veränderte Transkriptspiegel (\log_2 Ratio) von ESTs der Signaltransduktion, der Abwehr/Krankheit und des Sekundärmetabolismus der sechsjährigen Ozon-behandelten Lysimeterrandbuchen (orange = induziert, n=15-20; hellgrün = reprimiert, n=15-20; dunkelgrün = reprimiert, CV<50).	95
Tabelle 47: Veränderte Transkriptspiegel (\log_2 Ratio) von ESTs unklarer Klassifizierung und unklassifiziert der sechsjährigen Ozon-behandelten Lysimeterrandbuchen (dunkelgrün = reprimiert, CV<50; orange = induziert, n=15-20; hellgrün = reprimiert, n=15-20).	96
Tabelle 48: Vergleich der qRT-PCR- und Microarraytranskriptspiegel (\log_2 Ratio), der sechsjährigen Ozon-behandelten Lysimeterrandbuchen (qRT-PCR: dunkelgrün = signifikant reprimiert, rot = signifikant induziert, hellgrün= reprimiert, orange= induziert; Microarray: rot = induziert, CV<50; dunkelgrün = reprimiert, CV<50; orange = induziert, n=15-20; hellgrün = reprimiert, n=15-20).	97
Tabelle 49: Transkriptspiegel (\log_2 Ratio) der Ozon-behandelten etwa 60 Jahre alten Buchen (<i>Fagus sylvatica</i> L.) aus dem Kranzberger Forst, eingeteilt in Sonnen- und Schattenblätter. Die Probennahmen erfolgten über den Jahresverlauf 2005 (rot = induziert, CV<50; dunkelgrün = reprimiert, CV<50; orange = induziert, n=5-10; hellgrün = reprimiert, n=5-10).	101
Tabelle 50: Transkriptspiegel (\log_2 Ratio) der Ozon-behandelten etwa 60 Jahre alten Buchen (<i>Fagus sylvatica</i> L.) aus dem Kranzberger Forst, eingeteilt in Sonnen- und Schattenblätter. Die Probennahmen erfolgten über den Jahresverlauf 2006 (rot = induziert, CV<50; dunkelgrün = reprimiert, CV<50; orange = induziert, n=5-10).	102
Tabelle 51: Verifizierung der durch Microarray erhaltenen Transkriptspiegel (\log_2 Ratio) mittels qRT-PCR der Ozon-behandelten etwa 60 Jahre alten Buchen (<i>Fagus sylvatica</i> L.) des Kranzberger Forstes, eingeteilt in Sonnen- und Schattenblätter aus dem Jahren 2005/2006 (qRT-PCR: dunkelgrün = signifikant reprimiert; hellgrün = reprimiert, nicht signifikant; gelb = unverändert; Microarray: hellgrün = reprimiert, n= 5-10; orange = induziert, n=5-10; rot = induziert, CV<50).	102
Tabelle 52: ESTs die nach der SOM6 verlaufen.	116
Tabelle 53: ESTs die nach der SOM3 verlaufen.	117

- Tabelle 54: Zusammenfassung der statistischen Ergebnisse. Aufgetragen sind die Inhaltsstoffe und die Modelle oder deren Faktoren, angegeben ist jeweils der p-Wert, wobei Signifikanzen in fett und rot gekennzeichnet sind. Für das Modell Behandlung*Zeit*Infektion ergaben sich keine Signifikanzen. Mit Ausnahme der acylierten Flavonolglycoside, Quercetinderivate und Gesamtflavonolen wurden die restlichen Inhaltsstoffe zur statistischen Auswertung logarithmisch transformiert. 188
- Tabelle 55: Durch Insekten veränderte Transkriptspiegel (\log_2 Ratio) von ESTs des Primär-, Energiemetabolismus und des Zellwachstums in unterschiedlichen Ozonkonzentrationen der etwa 60 Jahre alten Buchen (*Fagus sylvatica* L.) des Kranzberger Forstes, eingeteilt in Schadbilder, Sonnen- und Schattenblätter (dunkelgrün = reprimiert, CV<50; orange = induziert, hellgrün = reprimiert). 189
- Tabelle 56: Durch Insekten veränderte Transkriptspiegel (\log_2 Ratio) von ESTs der Transkription und des Proteinmetabolismus und des Zellwachstums in unterschiedlichen Ozonkonzentrationen der etwa 60 Jahre alten Buchen (*Fagus sylvatica* L.) des Kranzberger Forstes, eingeteilt in Schadbilder, Sonnen- und Schattenblätter (dunkelgrün = reprimiert, CV<50; orange = induziert, hellgrün = reprimiert). 190
- Tabelle 57: Durch Insekten veränderte Transkriptspiegel (\log_2 Ratio) von Transporter ESTs und ESTs der Zellstruktur und Signaltransduktion in unterschiedlichen Ozonkonzentrationen der etwa 60 Jahre alten Buchen (*Fagus sylvatica* L.) des Kranzberger Forstes, eingeteilt in Schadbilder, Sonnen- und Schattenblätter (dunkelgrün = reprimiert, CV<50; orange = induziert, hellgrün = reprimiert). 191
- Tabelle 58: Durch Insekten veränderte Transkriptspiegel (\log_2 Ratio) von ESTs der Abwehr/Krankheit und des Sekundärmetabolismus in unterschiedlichen Ozonkonzentrationen der etwa 60 Jahre alten Buchen (*Fagus sylvatica* L.) des Kranzberger Forstes, eingeteilt in Schadbilder, Sonnen- und Schattenblätter (dunkelgrün = reprimiert, CV<50; orange = induziert, hellgrün = reprimiert). 192
- Tabelle 59: Durch Insekten veränderte Transkriptspiegel (\log_2 Ratio) von unklassifizierten ESTs und ESTs unklarer Einteilung in unterschiedlichen Ozonkonzentrationen der etwa 60 Jahre alten Buchen (*Fagus sylvatica* L.) des Kranzberger Forstes, eingeteilt in Schadbilder, Sonnen- und Schattenblätter (dunkelgrün = reprimiert, CV<50; orange = induziert, hellgrün = reprimiert). 193
- Tabelle 60: Durch Insekten veränderte Transkriptspiegel (\log_2 Ratio) der unbekanntesten ESTs in den unterschiedlichen Ozonkonzentrationen der etwa 60 Jahre alten Buchen (*Fagus*

<i>sylvatica</i> L.) des Kranzberger Forstes, eingeteilt in Schadbilder, Sonnen- und Schattenblätter.	193
-------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

LEBENS LAUF

Maren Olbrich

Geboren am 30.03.1973 in Hildesheim, Niedersachsen

Schulbildung

1985 – 1989 Realschule in Hildesheim, Niedersachsen erweiterter Realschulabschluss

1989 – 1992 Gymnasium in Hildesheim, Abschluss mit Allgemeiner Hochschulreife

Schulische Berufsausbildung und erworbene Berufspraxis

10/92 – 10/94 Lehranstalt für Medizinisch-Technische-Laboratoriums-Assistenten der
Medizinischen Hochschule Hannover, Abschluss als staatlich anerkannte MTLA

10/94 – 09/99 Als MTLA im Zentrallabor des Städtischen Krankenhauses Siloah in Hannover

Hochschulausbildung

10/99– 03/04 Studium der Agrarwissenschaften, Fachrichtung Gartenbauwissenschaften an
der Technische Universität München Weihenstephan

09/03 – 05/04 Diplomarbeit: „Züchtungsforschung von Baldrian (*Valeriana officinalis*) mittels
phytochemischer und pharmakologischer Untersuchungen und gametischer
Embryogenese“ bei der Firma Vitaplant in Witterswil, Schweiz

05/04 Abschluss: als Diplom-Agraringenieurin Univ.

VERÖFFENTLICHUNGEN DER DISSERTATION

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht.

Publikationen

Olbrich, M., Betz, G., Gerstner, E., Langebartels, C., Ernst, D. (2005): Transcriptome analysis of ozone-reponsive genes in leaves at European beech (*Fagus sylvatica* L.), Plant Biology 5, 670-676.

Olbrich, M., Welzl, G., Fleischmann, F., Oßwald, W., Bahnweg, G., Gerstner, E., Ernst, D. (2007): Accuracy quantification of mRNAs and housekeeping gene selection for quantitative real-time RT-PCR normalization in European beech (*Fagus sylvatica* L.) during abiotic and biotic stress, *Tree Genetics and Genome*, submitted.

Pritsch, K., Ernst, D., Fleischmann, F., Gayler, S., Grams, T. E., Göttlein, A., Heller, W., Koch, N., Lang, H., Matyssek, R., Munch, J. C., Olbrich, M., Scherb, H., Stich, S., Winkler, J. B. und Schloter, M. (2007): Plant and soil system responses to ozone after three years in a lysimeter study with juvenile beech (*Fagus sylvatica* L.), submitted.

Tagungen

Olbrich, M., Betz, G., Ernst, D.: Ozone- and pathogen-inducible cDNAs from leaves of European beech (*Fagus sylvatica* L.) and gene expression analysis of secondary metabolism. Kurt-Mothes-Doktoranden-Workshop, Halle, 06.10.2005.

Olbrich, M., Bieber, E., Stich, S., Schloter, M., Reth, S., Seidlitz, H.K., Heller, W., Ernst, D.: Ozone effects on transcripts and secondary metabolites of European beech: a lysimeter study under outdoor conditions. IUFRO Tree Biotechnology, Pretoria, South Africa, 06.11.-11.11.2005

Betz, G., Olbrich, M., Gerstner, E., Langebartels, C., Ernst, D.: Ozone-inducible cDNAs from leaves of European beech (*Fagus sylvatica* L.) and gene expression analysis of secondary metabolism. IUFRO Tree Biotechnology, Pretoria, South Africa, 06.11.-11.11.2005

Olbrich, M., Heller, W., Fleischmann, F., Oßwald, W., Ernst, D.: Ozon- und pathogeninduzierte cDNA-Banken von Blättern der europäischen Buche (*Fagus sylvatica* L.) und Genexpressionsanalysen mit Hilfe der Microarray-Technology und qRt-PCR. Deutsche Gartenbauwissenschaftliche Gesellschaft, Potsdam, 22.02.-24.2.2006.

Olbrich M., Ernst D.: Accurate quantification of mRNAs and housekeeping gene selection for quantitative real-time RT-PCR normalization in European beech (*Fagus sylvatica* L.) during abiotic and biotic stress. 3rd International qPCR Event, Technische Universität München, 26.03.-30.03.2007

Olbrich M., Bieber E., Knappe C., Stich S., Bahnweg G., Heller W., Müller-Starck G., Ernst D.:
Comparative transcriptome and proteome expression profiling in herbaceous and woody
plants upon abiotic/biotic stress. COST E52, Berlin, Germany, 29.05.-01.06.2007

Fortbildungen und Auszeichnungen

Real-Time PCR Award 2006: First Prize for Plant and Agricultural Sciences, Applied
Biosystems, 15. 12.06.

Basic Real-Time PCR Training Course ABI PRISM® Real-Time PCR Platforms, Applied
Biosystems Darmstadt. 06.03.-07.03.2007

7th Course of Bioinformatic for PhD students, Bertinoro, Italien, 17.03.-22.03.2007

DANKSAGUNG

Meinem Betreuer Dr. habil D. Ernst möchte ich für die Überlassung dieses interessanten und vielseitigen Themas und für seine herzliche Unterstützung danken. Die Probennahmen im Kranzberger Forst ließen eine gute Höhentauglichkeit erkennen.

Außerdem bedanke ich mich bei meinem Prof. D. Treutter für die Betreuung der Dissertation seitens der Uni, Herrn Prof. G. Wenzel für seine Zusage sich als Zweitprüfer mit meiner Arbeit zu beschäftigen. Ein ausdrückliches Dankeschön möchte ich an Herrn Prof. Dr. R. Matyssek wenden, der sich mit Tatkraft und Herz für den SFB 607 engagiert und darüber hinaus noch den Vorsitz meiner Dissertationsprüfung übernommen hat.

Ein ganz großes, dickes herzliches Dankeschön möchte ich weiterhin an Elke Gerstner, meine Super-TA, richten. Sie stand und steht immer hilfreich und tatkräftig an meiner Seite. Wir waren ein Super-Team und hatten immer unseren Spaß!!! Vielen lieben Dank dafür!

Einen besonderen Dank möchte ich an die vielen Menschen richten, die mich während meiner Arbeit begleitet haben. Meiner Arbeitsgruppe: Evi Bieber für die hilfreiche administrative Betreuung, Christine Schäfer für die ihre Unterstützung und die Hilfe bei den Windungen der englischen Sprache, Stephan Kremb für seine kollegiale Art und das geduldige Beantworten von Fragen (Ritter sind auch in der heutigen Zeit noch sehr gefragt). Gunter Betz für die Einarbeitung und das Überlassen der SSH-Bank, Olaf Neuschäfer-Rube und Markus Plessl für Einarbeitung und Fachinformation über die praktischen Seiten der Microarray-Technologie. Uta von Rad für die Einführung in die Software von Acuity und Genepix und weitere Fragen. Susanne Stich und Werner Heller für die Analyse der phenolischen Inhaltsstoffe und die Hilfe bei der Eingabe von Daten in die SFB-Datenbank. Günther Bahnweg und seinem Team: Lucia Gößl, Claudia Knappe, Marion Wenig und Rosina Ludwig für die Anzucht von *Apiognomonium errabunda* und dem anschließenden Infektionsversuch, Einarbeitung in den Taqman, die Bestimmung von Lignin, ACC, Salizylsäure, Zellulose und Zellwand und die vielen netten Inspirationen. Danke auch an unser fleißiges Bienchen Bärbel Groß!!

Dank an alle SFB-Teilprojekte von denen ich Proben nehmen durfte: F. Fleischmann, W. Oßwald, W. Ritter, T. Grams, B. Winkler, M. Schloter, J. P. Munch, K. H. Häberle und dem Kranzberger Forst Team.

Vielen Dank auch an die Kollegen von EUS für die Betreuung der Buchen im Gewächshaus sowie auf dem Lysimeter und die Bereitstellung von diversen Klimadaten. Danke an Maren Schmalmack, die für mich maschinell lernte und einen norddeutschen Wind in der GSF wehen ließ.

Ein ganz großes Dankeschön an Gerhard Welzl und Hagen Scherb für die statistische Betreuung und das geduldige Beantworten von Fragen!!

Vielen lieben Dank an meine Fehlersucher Ralf Jürgensen, Andrea Rose, Kai Sparke und Barbro Winkler.

Danke auch an meinen wunderbaren Freund, der sich in Südengland zu mir gesellte und seitdem in der Ferne und Nähe immer für mich da war ;-).

Weiterhin möchte ich denen meinen Dank aussprechen, die mich auf meinem Lebensweg begleitet und geformt haben.