

KIT SCIENTIFIC REPORTS 7566

Transgene Ansätze zur Aufklärung der Isoprenemission in Pappel

Katja Behnke

Katja Behnke

Transgene Ansätze zur Aufklärung der Isoprenemission in Pappel

Karlsruhe Institute of Technology
KIT SCIENTIFIC REPORTS 7566

Transgene Ansätze zur Aufklärung der Isoprenemission in Pappel

von
Katja Behnke

Report-Nr. KIT-SR 7566

Dissertation, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Brsg.
Fakultät für Forst- und Umweltwissenschaften, 2009

Impressum

Karlsruher Institut für Technologie (KIT)
KIT Scientific Publishing
Straße am Forum 2
D-76131 Karlsruhe
www.ksp.kit.edu

KIT – Universität des Landes Baden-Württemberg und nationales
Forschungszentrum in der Helmholtz-Gemeinschaft



Diese Veröffentlichung ist im Internet unter folgender Creative Commons-Lizenz
publiziert: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/de/>

KIT Scientific Publishing 2010
Print on Demand

ISSN 1869-9669

Transgene Ansätze zur Aufklärung der Isoprenemission in Pappel

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Fakultät für Forst- und Umweltwissenschaften
der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Brsg.

vorgelegt von

Katja Behnke

Freiburg im Breisgau

2009

Dekan:

Referent:

Koreferent:

Datum der mündlichen Prüfung:

Prof. Dr. Dr. h.c. Gero Becker

Prof. Dr. Jörg-Peter Schnitzler

Prof. Dr. Heinz Rennenberg

08.12.2009

ZUSAMMENFASSUNG

Pflanzen tauschen nicht nur Wasser und CO₂ mit ihrer Umgebung aus, sondern emittieren auch verschiedenste flüchtige organische Verbindungen (BVOC). Isopren ist von allen pflanzlichen BVOC die dominierende Verbindung. Aufgrund seiner hohen Reaktivität ist Isopren an unterschiedlichen chemischen Prozessen in der Atmosphäre beteiligt. Es fördert die Bildung von troposphärischem Ozon, verringert die Verweildauer von Treibhausgasen und trägt zur Bildung von sekundärem organischem Aerosol bei. Dieser vielseitige Einfluss des Isoprens auf die Atmosphärenchemie begründet, warum Isopren immer noch einen so hohen Stellenwert in der Klima- und Umweltforschung einnimmt. Aber auch in der Pflanzenforschung spielt Isopren eine große Rolle, denn es ist größtenteils noch ungeklärt, warum Pflanzen in so großen Mengen Isopren emittieren. Verschiedene Arbeiten erbrachten Hinweise, dass die Emission von Isopren Pflanzen sowohl bei erhöhter Temperatur wie auch vor oxidativem Stress schützt. Die vorliegende Arbeit liefert einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung der Funktion der Isoprenemission in der Pappel. Die Untersuchungen wurden mit transgenen *Populus x canescens*-Pflanzen durchgeführt, in denen mit gentechnischen Methoden die Isoprenbiosynthese verändert worden ist.

Im ersten Teil der Arbeit sollten die langfristige Stabilität der gentechnischen Veränderung überprüft und die transgenen *Populus x canescens*-Pflanzen umfassend charakterisiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Isoprenbiosynthese effizient und stabil unterdrückt wurde, während der Versuch, die Isoprenbiosynthese zu erhöhen, nicht erfolgreich war. Die Charakterisierung der nicht Isopren emittierenden Pappeln ergab, dass der Wegfall der Isoprenbiosynthese weitreichende Konsequenzen in verschiedenen Stoffwechselwegen hatte. So zeigte sich, dass der Kohlenhydratmetabolismus umfassend in nicht Isopren emittierenden Pflanzen im Vergleich zum Pappel-Wildtyp herunterreguliert war. Diese Umstellungen reflektierten vermutlich die Balance von Produktion und Verbrauch von Kohlenhydraten, welche auch für die Isoprenbiosynthese genutzt werden. Des Weiteren konnte mit der Charakterisierung die Verknüpfung von Isopren mit der Regulation des Phenolstoffwechsels aufgezeichnet werden. Die Biosynthese von phenolischen Substanzen wird auf transkriptioneller Ebene neben anderen Signalen über reaktive Sauerstoffspezies (ROS) kontrolliert. Es konnte gezeigt werden, dass Isopren das Vorkommen von ROS mitbestimmte und somit an der Regulation des Phenolstoffwechsels beteiligt war.

Im zweiten Teil wurden die Funktionen von Isopren mit einem Temperatur- und einem Ozonversuch untersucht. Mit dem Temperaturversuch konnte zum ersten Mal basierend auf molekularbiologischen Methoden bewiesen werden, dass Isopren die Photosynthese der Pflanzen während kurzfristig hoher Blatttemperatur schützte. Mit der Messung verschiedener Parameter, mit denen einzelne Prozesse der Photosynthese genauer betrachtet wurden, stellte sich heraus, dass Isopren speziell membran-lokalisierte Prozesse aufrechterhielt. Daraus lässt sich ableiten, dass Isopren bei hohen Temperaturen die Photosynthesemembranen stabilisiert und/oder Schäden vermindert. Der Ozonversuch bestätigte indirekt antioxidative Eigenschaften für Isopren und somit eine der diskutierten Funktionen. Es zeigte sich, dass in den nicht Isopren emittierenden Pappeln verschiedene Antioxidantien (Ascorbat, α -Tocopherol und Zeaxanthin) in höheren Konzentrationen vorlagen. Diese Hochregulation des antioxidativen Systems resultierte in einer verbesserten Ozontoleranz der nicht Isopren emittierenden Pappeln gegenüber dem Wildtyp. Mit diesem Versuch wurde außerdem deutlich, dass die Pappel - bekannt als starker Isoprenemitter - stressinduziert auch eine Vielzahl anderer BVOC in nennenswerten Mengen emittiert.

Im letzten Teil dieser Arbeit wurde eine längerfristige Freilandstudie durchgeführt, in welcher die Relevanz der zuvor erbrachten Ergebnisse und Beobachtungen unter naturnahen Bedingungen getestet werden sollte. Es stellte sich heraus, dass unter diesen Bedingungen der Wegfall der Isoprenemission keinen entscheidenden Nachteil für die Pflanzen verursachte. Die nicht Isopren emittierenden Pappeln zeigten sogar ein leicht verbessertes Wachstum. Das bedeutet, dass die mit Laborversuchen nachgewiesenen Funktionen von Isopren unter naturnahen Bedingungen eine untergeordnete Rolle spielten bzw. die Pflanzen mit alternativen Mechanismen den Wegfall von Isopren kompensierten, wie es auch mit dem Ozonversuch deutlich wurde. Die Unterdrückung der Isoprenemission resultierte auch in Veränderungen der Interaktionen der Pappel mit phytopathogenen Pilzen und herbivoren Insekten. Im Rahmen dieser Arbeit konnte nicht geklärt werden, ob diese Effekte direkt auf die veränderte Isoprenemission zurückzuführen sind, oder ob die beobachteten Veränderungen im Stoffwechsel die Ursache sind. Dennoch verdeutlicht sich auf Basis dieser Beobachtungen und der Literatur eine ökologische Funktion der Isoprenemission.

SUMMARY

Plants not only exchange water and CO₂ with their environment, they also emit a variety of biogenic volatile organic compounds (BVOC). Isoprene is the dominant compound from all plant BVOC. Because of its high reactivity isoprene is part of different chemical reactions in the atmosphere. It forwards the formation of ozone in the troposphere, prolongs the lifetime of green house gases and is involved in the formation of secondary organic aerosol. This versatile influence of isoprene on the chemistry of the atmosphere constitutes for the remaining high importance in atmospheric and environmental research. But in plant science isoprene also plays a special role because it is still unexplained why plants emit so high amounts of isoprene. Different studies provided details that the emission of isoprene protects plants against high temperature and oxidative stress. The present work provides a relevant contribution to clarify the functions of isoprene emission in poplar. The analyses were conducted with transgenic *Populus x canescens* plants with genetically modified isoprene emission capacity.

In the first part of this work, the long-term stability of the genetic modifications was checked and the transgenic *Populus x canescens* plants were comprehensively characterized. It was demonstrated that the repression of isoprene emission was efficiently and soundly, whereas an enhancement failed. The characterization of the non-isoprene emitting poplars revealed that the loss of isoprene had extensive implications on different metabolic pathways. The carbohydrate metabolism of non-isoprene emitting plants was strongly down-regulated compared to plants of the wildtype. These adjustments presumably reflected the balance of production and consumption of carbohydrates, which among many other processes are also used for isoprene biosynthesis. Furthermore, the characterization sketched the connection between isoprene and the regulation of the phenolic compounds metabolism. The biosynthesis of phenolic compounds is transcriptional controlled by reactive oxygen species (ROS). It was demonstrated that isoprene codetermined the abundance of ROS and therefore it was participated in the regulation of the phenolic compounds metabolism.

In the second part of this work, the functions of isoprene were analysed with a temperature and an ozone experiment. With the temperature experiment it was demonstrated for the first time using molecular techniques that isoprene protects photosynthesis during short high temperature episodes. Measuring several photosynthesis parameters which analyzed single processes of photosynthesis revealed

that especially membrane localized processes were maintained by isoprene. From this study it can be deduced that at high temperatures isoprene stabilizes photosynthesis membranes and/or reduced oxidative damage. The ozone experiment confirmed indirectly the antioxidative properties of isoprene and therefore one of the discussed functions of isoprene. It was shown that non-isoprene emitting plants had higher levels of different antioxidative compounds (ascorbate, α -tocopherol and zeaxanthin) compared to wildtype. This up-regulation of the antioxidative system resulted in a higher ozone tolerance of non-isoprene emitting poplars. Furthermore this experiment revealed that poplars known as strong isoprene emitters also emit noteworthy amounts of stress induced BVOC.

In the last part of this work a long-term outdoors study was conducted to test the relevance of afore provided results and observations under close to nature conditions. It turned out that the Knock-down of isoprene emission had no negative effects on the plants. The non-isoprene emitting plants showed even slightly enhanced growth. That means, the functions of isoprene verified with laboratory studies played a secondary role under close to nature conditions and alternative mechanisms compensated the loss of isoprene respectively. The repression of isoprene emission also resulted in implications on the interactions of poplar with phytopathogenic fungi and herbivory insects. Within this work it was not clarified if these effects could be directly attributed to isoprene or if the observed metabolic changes were responsible. Nevertheless, an ecological function of isoprene based on the observed effects and additional references from the literature arised.

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|--|--------|
| ABBILDUNGSVERZEICHNIS | vi |
| ABKÜRZUNGEN..... | vii |
| 1 EINLEITUNG..... | - 1 - |
| 1.1 Allgemeine Bedeutung der Isoprenemission für die Atmosphärenchemie | - 1 - |
| 1.1 Plastidäre Isoprenoidbiosynthese..... | - 2 - |
| 1.2 Physiologische und ökologische Funktionen der Isoprenemission | - 5 - |
| 2 ZIELSETZUNG | - 9 - |
| 3 MATERIAL & METHODEN & VERSUCHSKAMPAGNEN | - 11 - |
| 3.1 Konstruktion der Vektorsysteme zur Überexpression und Repression der Isoprensynthase in <i>Populus x canescens</i> (<i>PclSPS</i>)..... | - 11 - |
| 3.2 Pflanzenanzucht – Kultur und Vermehrung der Sprosskulturen..... | - 12 - |
| 3.3 Versuchsdesign für Gewächshauskultur | - 12 - |
| 3.4 Versuchsdesign für Temperaturversuche..... | - 14 - |
| 3.5 Versuchsdesign für Ozonversuche..... | - 15 - |
| 3.6 Versuchsdesign für den Beetkastenversuch im S1-Käfiggewächshaus in Göttingen | - 16 - |
| 4 ERGEBNISSE & DISKUSSION..... | - 21 - |
| 4.1 Stabilität und Charakterisierung der transgenen <i>Populus x canescens</i> - Linien | - 21 - |
| 4.1.1 Screening der Isoprenemissionsraten mit Pflanzen aus der Sprosskultur | - 21 - |
| 4.1.2 Umfangreiche Charakterisierung der Gewächshauspflanzen | - 22 - |
| 4.2 Untersuchungen zur Rolle der Isoprenemission in der Toleranz von abiotischem Stress..... | - 25 - |
| 4.2.1 Temperaturversuche | - 25 - |
| 4.2.2 Ozonversuche | - 27 - |
| 4.3 Wachstum und Pflanzenfitness der transgenen Linien unter Freilandbedingungen | - 30 - |
| 5 ZUSAMMENFASSENDE SCHLUSSFOLGERUNG & AUSBLICK..... | - 37 - |
| 6 LITERATUR | - 41 - |
| 7 PUBLIKATIONEN | - 53 - |
| 8 DANKSAGUNG..... | - 55 - |

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Isoprenoidbiosynthese in der Pflanzenzelle über den cytosolischen Mevalonat-Stoffwechselweg (MVA) und den chloroplastidären 2-C-Methylerythritol-4-Phosphat-Stoffwechselweg (MEP) - 4 -

Abbildung 2: Überblick über die in der Literatur diskutierten physiologischen und ökologischen Funktionen von Isopren - 8 -

Abbildung 3: Schematische Darstellung der Transformationsvektoren pBinAR und pART27 - 12 -

Abbildung 4: Pflanzeninkubationskammern (CSTR) am Forschungszentrum Jülich.. - 16 -

Abbildung 5: Bepflanzungsmuster der zwei Beetkästen in Göttingen im sogenannten Random-Plot-Design..... - 17 -

Abbildung 6: Beetkastenversuch im S1-Käfiggewächshaus - 19 -

Abbildung 7: Infrarotaufnahmen von *Populus x canescens*-Blättern mit unterschiedlicher Blatttemperatur..... - 26 -

Abbildung 8: Ozoninduzierte Nekrosen in *Populus x canescens*. - 29 -

Abbildung 9: CO₂-Assimilationsraten und Holz-Trockenbiomasse von transgenen *Populus x canescens*-Pflanzen mit reprimierter Isoprenemission..... - 32 -

Abbildung 10: Schadsymptome an *Populus x canescens*, verursacht durch die Infektion mit einem phytopathogenen Pilz. - 33 -

Abbildung 11: Resistenz gegenüber *Pollacia radios*a (phytopathogener Pilz) und *Phratora vitellinae* (Kleiner Weidenblattkäfer) von transgenen *Populus x canescens*-Pflanzen mit veränderter Isoprenemission. - 34 -

Abbildung 12: *Phratora vitellinae* (Kleiner Weidenblattkäfer) auf *Populus x canescens* (Graupappel)..... - 35 -

ABKÜRZUNGEN

| | |
|-------------------------------|---|
| ABA | Abscisinsäure |
| ANOVA | Varianzanalyse („analysis of variance“) |
| ATP | Adenosin-5'-Triphosphat |
| BVOC | biogene flüchtige organische Kohlenwasserstoffe („ <i>biogenic volatile organic compounds</i> “) |
| C | Kohlenstoff („carbon“) |
| CO ₂ | Kohlenstoffdioxid |
| DNA | Deoxyribonukleinsäure („deoxyribonucleic acid“) |
| DOXP | 1-Deoxy- <i>D</i> -Xylulose-5-Phosphat |
| DXR | 1-Deoxy- <i>D</i> -Xylulose-5-Phosphat-Reduktoisomerase |
| DXS | 1-Deoxy- <i>D</i> -Xylulose-5-Phosphat-Synthase |
| ETR | Elektronentransportrate |
| FOS | Fosmidomycin |
| Fg | Frischgewicht |
| g | Gramm |
| GA-3P | Glycerinaldehyd-3-Phosphat |
| GC | Gaschromatograph |
| GLV | Wundalkohole („green leaf volatile“) |
| h | Stunde |
| H ₂ O | Wasser |
| H ₂ O ₂ | Wasserstoffperoxid |
| HPLC | Hochauflösende Flüssigchromatographie („high performance liquid chromatography“) |
| IDI | IDP-Isomerase |
| IDP | Isopentenyl-Diphosphat |
| ISPS | Isoprensynthase |
| M | molar |
| m | Meter |
| m | milli (10 ⁻³) |
| MEP | 2-C-Methylerythritol-4-Phosphat |
| MeSA | Methylsalicylat |
| min | Minute |
| μ | mikro (10 ⁻⁶) |
| mRNA | Boten-RNA („messenger ribonucleic acid“) |
| MS | Massenspektrometer |
| MS | Murashige und Skoog (Medium) |
| MVA | Mevalonat |
| N | Stickstoff |
| n | nano (10 ⁻⁹) |
| n | experimentelle Wiederholungen |
| NADPH | Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat |

ABKÜRZUNGEN

| | |
|-----------------------------|---|
| n.s. | nicht signifikant |
| O ₂ | Sauerstoff |
| ¹ O ₂ | Singulett-Sauerstoff |
| OH | Hydroxylradikal |
| O ₃ | Ozon |
| P | Irrtumswahrscheinlichkeit in Statistikttests |
| Pc | <i>Populus x canescens</i> |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion („Polymerase chain reaction“) |
| PEP | Phosphoenolpyruvat |
| PEPC | Phosphoenolpyruvatcarboxylase |
| pH | negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Konzentration |
| PPFD | Photosynthetische Photonenflussdichte |
| PTR-MS | Proton-Transfer-Reaktions-Massenspektrometer |
| RT | Raumtemperatur |
| s | Sekunde |
| SD | Standardabweichung („standard deviation“) |
| SE | Standardfehler („standard error“) |
| Tg | Trockengewicht |
| TMTT | (3E,7E)-4,8,12-Trimethyl-1,3,7,11-Tridecatetradiene |
| Tps | Terpensynthase |
| VOC | Flüchtige Kohlenwasserstoffe („volatile organic compounds“) |
| WT | Wildtyp |
| y | Jahr |
| z.B. | zum Beispiel |

1 EINLEITUNG

1.1 Allgemeine Bedeutung der Isoprenemission für die Atmosphärenchemie

Pflanzen stehen wie alle Organismen in einem regen Austausch von Gasen mit der Atmosphäre. Hierzu gehörten neben den Hauptkomponenten Wasser (H_2O) und Kohlenstoffdioxid (CO_2) auch eine Vielzahl von Spurengasen, welche in nennenswerten Mengen von Pflanzen abgegeben und in die Atmosphäre eingetragen werden. Diese Gase werden als biogene flüchtige organische Kohlenwasserstoffe (BVOC, engl. „biogenic volatile organic compounds“) bezeichnet und umfassen Isopren, Monoterpene, Sesquiterpene und oxygenierte Verbindungen (Alkohole und Carbonyle). Isopren (2-Methyl-1,3-Butadien) ist von allen pflanzlichen BVOC die dominierende Verbindung und erreicht eine globale Flussdichte in die Atmosphäre von $175-503 \text{ Tg C y}^{-1}$, welche vergleichbar ist mit der von Methan (500 Tg C y^{-1} , Kesselmeier & Staudt 1999). Im Gegensatz zu Methan ist die Verweildauer von Isopren in der Atmosphäre jedoch sehr kurz, weil es aufgrund seiner hohen Reaktivität an unterschiedlichen chemischen Prozessen in der Atmosphäre beteiligt ist. In anthropogen mit Stickoxiden verschmutzter Luft fördert Isopren die Bildung von troposphärischem Ozon (O_3), indem es in oxidierter Form Stickstoffoxid (NO) in Stickstoffdioxid (NO_2) umwandelt, welches wiederum licht- und sauerstoffabhängig zu NO und O_3 photolysiert wird (Williams et al. 1997, Lerdau 2007). Hauptreaktionspartner von Isopren in der Atmosphäre ist das Hydroxylradikal (OH). Konsequenz dieser Reaktion ist die Abnahme der atmosphärischen OH -Konzentration, womit das Oxidationspotenzial der Atmosphäre verringert und somit die Verweildauer von Treibhausgasen (z.B. Methan) verlängert wird (Thompson 1992). Isopren, Monoterpene und Sesquiterpene tragen außerdem zur Bildung von sekundärem organischem Aerosol bei, welches wiederum einen positiven Effekt auf die Erderwärmung haben kann (Claeys et al. 2004).

Der vielseitige Einfluss des Isoprens auf die Atmosphärenchemie begründet, warum Isopren und andere BVOC immer noch einen so hohen Stellenwert in der Klima- und Umweltforschung einnehmen. Aus pflanzenphysiologischer Sicht stellt sich die Frage, warum Pflanzen in so großen Mengen Isopren emittieren. Sanadze (1957) entdeckte als erster, dass Pflanzen Isopren emittieren und charakterisierte die Isoprenemission als stark licht- und temperaturabhängigen Prozess (Sanadze & Kalandaze 1966, Sanadze & Kursanov 1966, Sanadze 1969). Die meisten Isopren-emittierenden Arten sind unter den

Baumarten zu finden. Die stärksten mitteleuropäischen Isoprenemitter sind anzutreffen bei den *Fagaceae* (Buchengewächsen) mit der Gattung *Quercus* (Eichen) und bei den *Salicaceae* (Weidengewächsen) mit den Gattungen *Salix* (Weiden) und *Populus* (Pappeln) (Kesselmeier & Staudt, 1999). Isopren emittierende Arten findet man aber auch bei den *Poaceae* (Süßgräser), *Hamamelidaceae* (Zaubernussgewächse) und *Myrtaceae* (Myrtengewächse).

1.1 Plastidäre Isoprenoidbiosynthese

Isopren gehört zu der Stoffgruppe der Isoprenoide, deren Biosynthese auf dem gemeinsamen C₅-Grundgerüst IDP (Isopentenyl-Diphosphat) bzw. seinem Isomer DMADP (Dimethylallyl-Diphosphat) aufbaut. Für die Bildung von Isopren ist DMADP die direkte Vorstufe, während durch Kopf-Schwanz-Kondensation von mehreren C₅-Körpern Mono- (C₁₀), Sesqui- (C₁₅), Di- (C₂₀), Tri- (C₃₀) und Tetraterpene (C₄₀) entstehen. Die Synthese von IDP bzw. DMADP kann über zwei unabhängige Stoffwechselwege erfolgen. Seit Jahrzehnten bekannt ist der sogenannte Acetat-Mevalonat-Weg (MVA), bei dem die Synthese von IDP über Acetyl-CoA und Mevalonat erfolgt (Croteau 1987, Lalitha & Ramasarma 1987). Erst 1993 wurde ein zweiter Isoprenoidstoffwechselweg von Rohmer et al. nachgewiesen. Die alternative Synthese erfolgt über das dabei entstehende Zwischenprodukt 2-C-Methylerythritol-4-Phosphat (MEP), nach dem auch der Stoffwechselweg benannt wurde (Rohmer 2008). Lichtenthaler et al. (1997) konnten zeigen, dass die Synthese von vermutlich allen chloroplastidären Isoprenoiden (Isopren, Mono-/Diterpene, Carotinoide, Phytol und Plastochinon) primär über den MEP-Stoffwechselweg erfolgt, während die Synthese von Sesqui-/Tri- und Polyterpenen sowie Sterolen auf dem cytosolischen MVA-Stoffwechselweg basiert. Inzwischen ist der gesamte MEP-Stoffwechselweg komplett aufgeklärt (Adam et al. 2002). Alle beteiligten Enzyme und die korrespondierenden Gene sind bekannt. Im ersten Schritt katalysiert die 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat-Synthase (DXS) eine Decarboxylierungsreaktion, bei der aus Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GA-3P) 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat (DOXP) gebildet wird. DOXP ist nicht nur ein Intermediat im MEP-Stoffwechsel, sondern auch im Thiamin-Stoffwechsel. Das erste für diesen Stoffwechsel spezifische Produkt entsteht im nächsten Schritt und wird von der 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat-Reduktoisomerase (DXR) katalysiert. Hierbei wird DOXP unter NADPH-Aufwand zu MEP reduziert. In einer Sequenz von fünf weiteren Schritten entsteht 1-Hydroxy-2-Methyl-2-(E)-Butenyl-4-Phosphat, welches anschließend vom Enzym 1-Hydroxy-2-Methyl-2-(E)-

Butenyl-4-Phosphat-Reduktase (HDR) zu IDP und DMADP im Verhältnis 5:1 umgewandelt wird (Adam et al. 2002). Isomerisierung von IDP zu DMADP und umgekehrt erfolgt durch die IDP-Isomerase (IDI). IDI ist ein essentielles Enzym für die vollständige Funktion der chloroplastidären Isoprenoidbiosynthese und ist wahrscheinlich verantwortlich für die Regulation des IDP:DMADP-Verhältnisses entsprechend des Verbrauchs für die verschiedenen Isoprenoide (Page et al. 2004).

Obwohl die gesamte Sequenz der Teilschritte aufgeklärt werden konnte, sind regulatorische Aspekte noch weitgehend ungeklärt. Aufgrund der einleitenden Rolle wurde für DXS eine zentrale regulatorische Funktion im MEP-Stoffwechsel vermutet. In der Tat konnten mehrere Studien zeigen, dass die Genexpression der DXS positiv mit der Isoprenoidkonzentration korreliert (Lois et al. 2000, Estévez et al. 2001, Muñoz-Bertomeu et al. 2006). Vergleichbare Ergebnisse lieferten auch Arbeiten zur Rolle der DXR (Carretero-Paulet et al. 2002, 2006). Dennoch sind weitere Untersuchungen notwendig, um die Regulation des Isoprenoidstoffwechsels unter verschiedensten Entwicklungs- und Umwelteinflüssen zu verstehen.

Ursprünglich wurde angenommen, dass Isopren nur durch Säure geförderten Zerfall von DMADP entsteht (Sanadze 1990). Silver & Fall (1991) konnten jedoch in *Populus deltoides* (Bartr. ex Marsh) zeigen, dass ein Enzym die Abspaltung der Phosphatgruppen unter Bildung einer Doppelbindung katalysiert. Das Enzym wurde Isoprensynthase (ISPS) genannt und in der Folgezeit in verschiedensten Pflanzen nachgewiesen und charakterisiert (Kuzma & Fall 1993, Silver & Fall 1995, Schnitzler et al. 1996, Lehning et al. 1999). ISPS kann im Chloroplast unterschiedlich lokalisiert sein, gelöst im Stroma, aber auch gebunden an die Thylakoidmembran (Wildermuth & Fall 1998, Schnitzler et al. 2005). Die erste Isolierung eines Gens für die ISPS gelang Miller (2001) aus der Graupappel (*Populus x canescens* (Ait.) Sm.). Gegenwärtig ist neben ISPS-Genen aus verschiedenen Pappelarten/hybriden lediglich die ISPS aus einer weiteren Art (Kudzu = *Pueraria montana*, Sharkey et al. 2005) bekannt. Homologievergleiche zeigten eine Eingruppierung in die Multigenfamilie der Terpensynthasen, mit höchster Homologie zur Untergruppe *Tps-b* (Bohlmann et al. 1998), welche alle Terpensynthasen aus dikotylen Pflanzen umfasst.

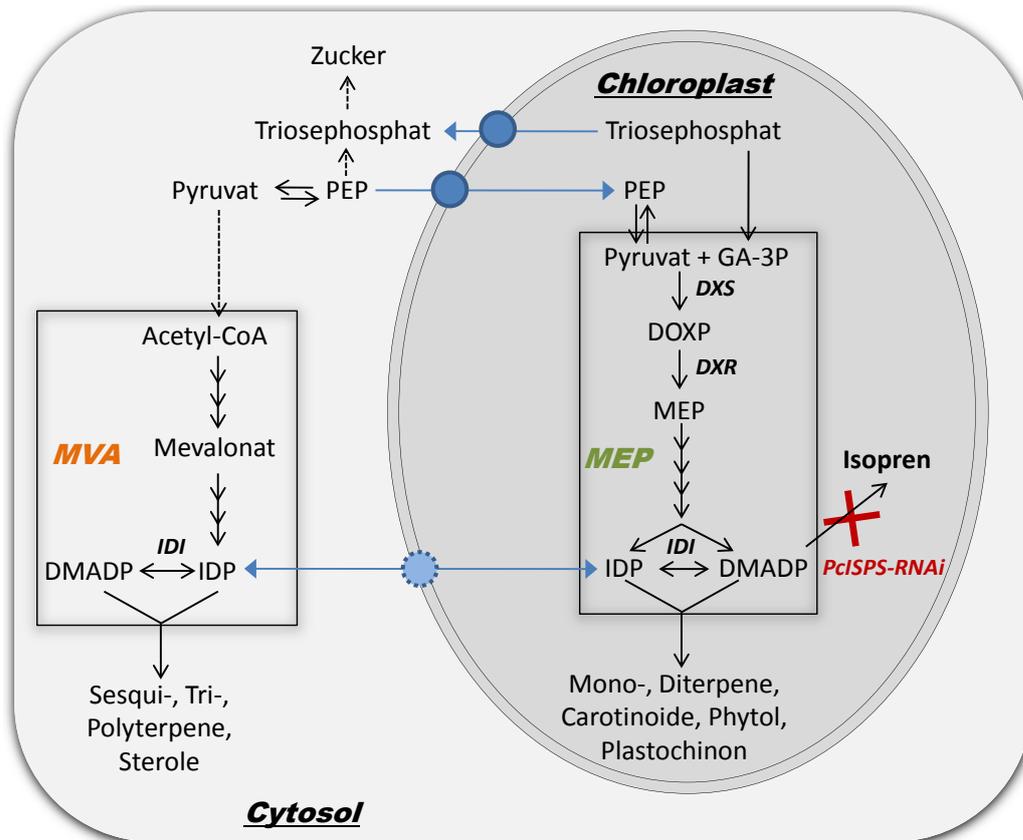


Abbildung 1: Isoprenoidbiosynthese in der Pflanzenzelle über den cytosolischen Mevalonat-Stoffwechselweg (MVA) und den chloroplastidären 2-C-Methylethritol-4-Phosphat-Stoffwechselweg (MEP). Adaptiert nach Lichtenthaler 1999, Rosenstiel et al. 2004, Flüge und Gao 2004.

Die wichtigsten Regulationsfaktoren für die Isoprenbiosynthese und -emission sind weitgehend bekannt. Die Isoprenbiosynthese verbraucht primär photosynthetisch assimilierten Kohlenstoff, was auch aufgrund der Lichtabhängigkeit der Isoprenemission vermutet wurde (Sanadze 1969, Rasmussen & Jones 1973). Verschiedene $^{13}\text{CO}_2$ -Fütterungsversuche konnten direkt nachweisen, dass ca. 80% des über Isopren emittierten Kohlenstoffs direkt aus der Photosynthese stammt (Sanadze et al. 1972, Schnitzler et al. 2004). Der Verbrauch von DMADP bzw. die Isoprenemission bedeuten für die Pflanze Verluste des photosynthetisch fixierten Kohlenstoffs von bis zu 15-20% (Sharkey et al. 1996, Brüggemann & Schnitzler 2002). Ein Teil des Isoprenkohlenstoffs stammt jedoch nicht direkt aus der CO_2 -Assimilation, sondern resultiert vom Import alternativer C-Körper aus dem Cytoplast (Karl et al. 2002, Schnitzler et al. 2004). Die Möglichkeit, alternative C-Quellen zu nutzen, stellt sicher, dass die Isoprenbiosynthese auch während eingeschränkter Photosynthese wie z.B. unter Trockenstress (Brilli et al. 2007) aufrechterhalten werden kann. Der Einbau dieser cytosolischen Komponenten wirkt

die Frage nach der Möglichkeit des Austauschs verschiedener MVA- und MEP-Stoffwechselintermediate auf. Flügge und Gao (2004) konnten zeigen, dass neben dem Transport von Triosephosphat und Phosphoenolpyruvat über die Chloroplastenmembran auch der Austausch von DOXP und IDP prinzipiell möglich ist. Studien weisen jedoch darauf hin, dass der Austausch sehr gering ist (Karl et al. 2002, Affek & Yakir 2003, Schnitzler et al. 2004). Weitere Untersuchungen sind jedoch notwendig, um die Bedeutung einer Verknüpfung zwischen den kompartimentierten Stoffwechselwegen zur Isoprenoidbiosynthese aufzuklären.

1.2 Physiologische und ökologische Funktionen der Isoprenemission

Neben der Abhängigkeit von der Photosynthese und der damit verbundenen Versorgung mit Kohlenstoff ist die Isoprenbiosynthese stark temperaturabhängig. Ab einer Temperatur von ca. 30°C steigt die Isoprenemission stark an und erreicht ihr Maximum bei ca. 45°C (Monson et al. 1992, Sharkey & Loreto 1993). Dies führte zu der Hypothese von Sharkey & Singsaas (1995), nach welcher Isopren einen Schutzmechanismus gegen erhöhte Blatttemperatur darstellen kann. Eine Möglichkeit, dieser Frage experimentell nachzugehen, ist die Hemmung des MEP-Stoffwechsels über Fosmidomycin (FOS), einen kompetitiven Inhibitor für die DXR. Eine zweite Möglichkeit, die Rolle von Isopren zu untersuchen, ist die Begasung nicht Isopren emittierender Pflanzen mit Isopren. Mit Hilfe dieser Ansätze konnten verschiedene Arbeiten zeigen, dass Isopren den Photosyntheseapparat während erhöhter Blatttemperatur schützt bzw. eine Erholung vom Temperaturstress fördert (Sharkey et al. 2001, Velikova & Loreto 2005, Peñuelas et al. 2005). Es gibt verschiedene Hinweise, dass der durch Isopren gewährleistete Schutz eine besondere Rolle bei transienten Änderungen der Blatttemperatur spielt und weniger bei konstant erhöhter Temperatur (zusammengefasst in Sharkey et al. 2008). Die Blatttemperatur ist stark abhängig von der einwirkenden Strahlung. Deshalb resultieren transiente Änderungen der Lichtintensität, wie etwa Lichtflecken, in ebenso fluktuierender Blatttemperatur. Isopren emittierende Pflanzen sind kaum verbreitet in den Tropen bzw. nicht zu finden in den Wüsten, wo eher konstant hohe Temperaturen vorherrschen. Auch in einer einzelnen Baumkrone finden sich höhere Isoprenemissionsraten in den Blättern im oberen Bereich, wo die Wahrscheinlichkeit höher ist, Licht/Hitze-Flecken ausgesetzt zu sein (zusammengefasst in Sharkey et al. 2008).

Der Mechanismus, mit dem der Photosyntheseapparat bei erhöhter Temperatur durch Isopren geschützt wird, ist noch unklar. Sharkey & Yeh (2001) sowie Singaas et al. (1997) vermuten, dass sich Isopren aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften primär in die Chloroplastenmembranen einlagert und auf mechanische Weise Membranfluidität/-stabilität bei erhöhter Temperatur gewährleistet. Bisher gibt es einen experimentellen Beweis, der diesen positiven Effekt des Isoprens bestätigt, allerdings mit artifiziellen Membranen (Siwko et al. 2007). Andererseits zeigte sich bei den Temperaturstressexperimenten, dass Isopren die Entstehung bzw. die Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies (z.B. H_2O_2) reduziert und somit oxidativen Schäden vorbeugt (Velikova et al. 2005, Velikova & Loreto 2005). Isopren hat offensichtlich antioxidative Eigenschaften, welche zurückzuführen sind auf die im Molekül vorhandenen Doppelbindungen. Vergleichbare Eigenschaften haben unter anderem α -Tocopherol und Zeaxanthin, welche speziell in der Chloroplastenmembran lokalisiert sind und den Photosyntheseapparat vor oxidativen Schäden schützen (Havaux & Niyogi 1999, Havaux et al. 2005). Die antioxidativen Eigenschaften von Isopren wurden mit weiteren Experimenten bestätigt. Loreto et al. (2001) und Loreto & Velikova (2001) konnten zeigen, dass Isopren durch Ozon verursachte sichtbare Schäden und die Beeinträchtigung der Photosynthese vermindert. Ozon wird von Pflanzen über die Stomata aufgenommen, löst sich im apoplastischen Wasserfilm und generiert dort weitere reaktive Sauerstoffspezies (ROS) bei der Reaktion mit Ascorbat, anderen Antioxidantien oder Zellkomponenten (einen Überblick gibt Sandermann 2008). Das bedeutet, dass Isopren im Zusammenhang mit erhöhter Ozontoleranz dazu beiträgt, toxische Sekundärprodukte (ROS, Lipidperoxide) abzufangen. Aufgrund der geringen Reaktivität von Isopren mit Ozon kann die Isoprenemission jedoch nicht dazu beitragen, dass Ozon schon außerhalb des Apoplasten abgefangen wird (Atkinson 1997). Affek & Yakir (2002) konnten etwas detaillierter zeigen, dass Isopren die Akkumulation von Singulett-Sauerstoff (1O_2) verhindert. 1O_2 entsteht primär bei der Lichtabsorption im Photosyntheseapparat.

Dennoch ist der Mechanismus, mit dem Isopren erhöhte Lichtflecken- oder Ozontoleranz bewirkt, noch nicht genau geklärt. Es ist jedoch gut möglich, dass Isopren in beiden Fällen als ROS-Fänger wirkt. Denn auch erhöhte Temperatur resultiert in ROS-Akkumulation und oxidativem Stress (Kotak et al. 2007). ROS sind jedoch nicht primär schädlich, sondern entstehen permanent als Nebenprodukte im Stoffwechsel. Erst wenn das Gleichgewicht von ROS-Entstehung und ROS-Entgiftung nicht mehr ausbalanciert ist, ist oxidativer Stress die Folge, und es kommt zu undefinierter Oxidation von Biomolekülen (Membranen, Proteinen, DNA). Erst durch negative Umwelteinflüsse (Stress) entstehen ROS vermehrt, oder effiziente Entgiftung ist vermindert. Vermutlich durch diese allgegenwärtige Präsenz und die Dynamik in Bezug auf Stress, nehmen ROS eine

wichtige Schlüsselfunktion in Stressperzeption und Signalweiterleitung ein (Foyer & Noctor 2005). Das bedeutet, dass Isopren als Antioxidans auch beteiligt ist an Signalsequenzen und somit Teil eines fein abgestimmten Stressmetabolismus ist (Velikova et al. 2005).

Wenn die Photosynthese durch Trockenstress und hohe Temperaturen limitiert ist, kann durch Isoprenemission bis zu 20% des fixierten Kohlenstoffs freigesetzt werden. Es ist aber nicht nur der nennenswerte Verlust an Kohlenstoff, sondern auch der hohe Energieverbrauch, der die Isoprenbiosynthese kostspielig für die Pflanze macht. Für ein Molekül Isopren werden 20 ATP und 14 NADPH verbraucht (Sharkey & Yeh, 2001). Dies führte zu der Hypothese, dass die Isoprenemission eine Art Ventil für überschüssige Metabolite oder Energieäquivalente darstellt ("safety valve hypothesis"). Rosenstiel et al. (2004) vermuten, dass die Isoprenemission die Akkumulation von DMADP und damit übermäßiges Sequestrieren von Phosphat im Chloroplasten verhindert. Sanadze (2004) sieht eher den Verbrauch von ATP und NADPH als Möglichkeit, überschüssige photosynthetische Energie abzuleiten, wenn die CO₂-Fixierung limitiert ist.

Eine weitere Vermutung zur Funktion der Isoprenemission, die sogenannte opportunistische Hypothese („opportunistic hypothesis“) von Owen & Peñuelas (2005), beruht auf den deutlich unterschiedlichen *K_m*-Werten von ISPS (millimolar) und Geranyldiphosphat-Synthase (micromolar). Hiernach sind DMADP und IDP primär für die Synthese essentieller Isoprenoide (Carotinoide, Chlorophyllbestandteil Phytol) bestimmt. Die Emission volatiler Isoprenoide profitiert von überschüssigem Substrat und hängt somit von deren Biosynthese ab.

Neben den vorgestellten physiologischen Funktionen stellten Terry et al. (1995) die Hypothese auf, dass Isopren ein Signalmolekül ist und somit auch eine ökologische Funktion haben kann. Es wurde gezeigt, dass Begasung mit Isopren einen Einfluss auf entwicklungsbiologische Prozesse (Blütenbildung) in Isopren emittierenden und nicht Isopren emittierenden Pflanzen haben kann. Bisher gibt es jedoch laut Literatur keine weiterführenden Arbeiten, die diese Hypothese näher untersuchten.

Im Gegensatz zu Mono- und Sesquiterpenen, deren Funktionen in der indirekten Abwehr von Fraßfeinden bekannt sind (Arimura et al. 2005), konnte bisher eine ähnliche Rolle für Isopren nicht gezeigt werden. Erst kürzlich konnten jedoch auch ökologische Funktionen von Isopren in Pflanzen-Insekten-Interaktionen nachgewiesen werden. Laothawornkitkul et al. (2008) zeigten, dass die Larve des Tabakschwärmers nicht Isopren emittierenden WT-Tabak als Futterpflanze gegenüber transgenen Isopren emittierenden Tabakpflanzen bevorzugt. Isopren kann also, wie in diesem Fall gezeigt, eine abschreckende Wirkung auf Fraßfeinde haben. Neben den direkten Effekten auf die Fraßfeinde kann auch das Verhalten ihrer Räuber oder Parasitoide von Isopren beeinflusst werden (Loivamäki et al.

2008). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Isopren das Anlocken des natürlichen Feindes der Kohlmotte beeinträchtigt, wenn die Kohlmotte auf Isopren emittierenden Arabidopsis-Pflanzen frisst. Beide Arbeiten konnten zum ersten Mal klar zeigen, dass Isopren Funktionen in Pflanze-Insekt-Interaktionen haben kann.

Gegenwärtig sind noch immer all diese Hypothesen in Diskussion (zusammengefasst in Abbildung 2). Mit der erfolgreichen Klonierung des Isoprensynthasegens aus der Pappel (*PcISPS*, Miller 2001), erstmals gelungen am IMK-IFU, ergaben sich neue molekularbiologische/gentechnische Möglichkeiten, die physiologische wie auch die ökologische Funktion(en) von Isopren zu untersuchen. Die vorliegende Dissertation fasst die Arbeiten mit transgenen nicht Isopren emittierenden Pappeln zusammen, welche die verschiedenen Hypothesen zur Funktion der Isoprenemission adressiert und wesentlich zur deren Aufklärung beigetragen haben.

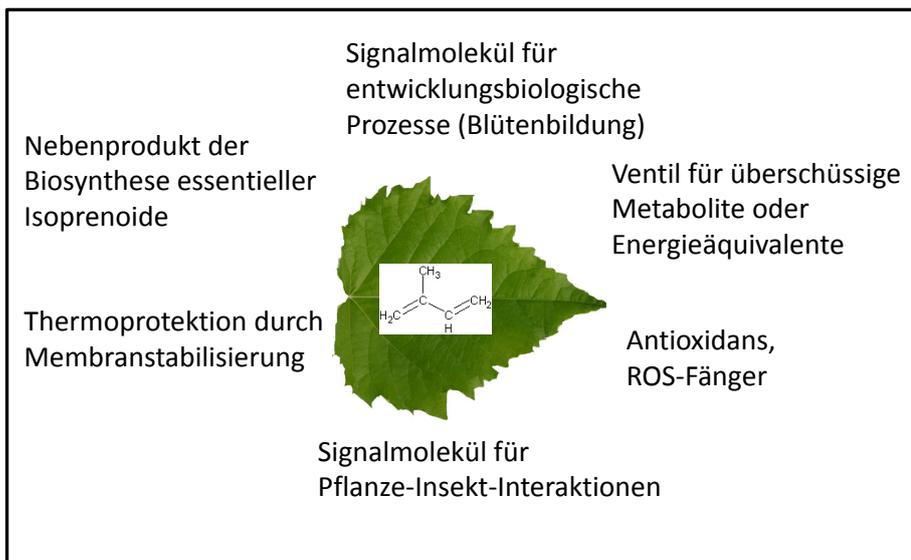


Abbildung 2: Überblick über die in der Literatur diskutierten physiologischen und ökologischen Funktionen von Isopren.

2 ZIELSETZUNG

Die Ziele der vorliegenden Arbeit bauen auf den Ergebnissen auf, die in der ersten Phase der DFG-Forschergruppe „Poplar – a model to address tree specific questions“ (2004 – 2007) gewonnen wurden. So wurden dort unter anderem Konstrukte erstellt, mit denen (i) eine Überexpression der *Pc/SPS* (35S::*Pc/SPS*-6x-His) oder aber (ii) eine Unterdrückung der *Pc/SPS*-Expression (35S::*Pc/SPS*-RNAi) erreicht werden soll, und Sprosskulturen der Pappel erfolgreich transformiert. Aufbauend auf diesen Linien sollten in der vorliegenden Arbeit folgende Ziele bearbeitet werden, um die Funktionen von Isopren in der Pappel aufzuklären:

- Selektion positiver transgener Pappellinien mit erhöhter und unterdrückter Isoprenemission
 - Mit der Proton-Transfer-Reaktions-Massenspektrometrie steht eine effiziente Methode für das Selektieren positiver Pappellinien, mit erhöhter oder unterdrückter Isoprenemission, zur Verfügung. Eine erste Aufnahme der Isoprenemissionsraten von einer Vielzahl transgener Linien sollte mit auf Nährmedium kultivierten Sprosskulturen erfolgen. Im zweiten Schritt sollte mit der Kultur von Pflanzen über eine gesamte Wachstumsperiode im Gewächshaus die Stabilität der gentechnischen Manipulation überprüft werden.
- Biomolekulare und physiologische Charakterisierung der transgenen Pappellinien
 - Zusätzlich zur Aufnahme der Isoprenemissionsraten sollten in den transgenen Linien auch verschiedene Enzyme und Metabolite des MEP-Stoffwechsels analysiert werden, um den Einfluss der manipulierten Isoprenemission auf den gesamten Stoffwechsel näher zu untersuchen.
- Überprüfung der diskutierten Funktionen der Isoprenemission mit Laborexperimenten
 - Im Rahmen von Laborexperimenten sollte unter kontrollierten Bedingungen die Thermotoleranz und Ozontoleranz der Isopren emittierenden und nicht Isopren emittierenden Pappeln getestet werden.
- Einfluss veränderter Isoprenemission auf die allgemeine Pflanzenfitness und das Wachstum der transgenen Pflanzen unter Freilandbedingungen
 - Mit der Kultur ausgewählter transgener Linien für (i) eine Wachstumsperiode im Gewächshaus in Garmisch-Partenkirchen und (ii)

zwei Wachstumsperioden im S1-Käfiggewächshaus in Göttingen (Freilandbedingungen) sollte die Stabilität der Linien getestet und der Einfluss saisonaler Faktoren analysiert werden.

Die vorliegende Arbeit umfasst als kumulative Dissertationsschrift die im Anhang dokumentierten bisher veröffentlichten bzw. zur Veröffentlichung eingereichten Artikel aus der Doktorarbeit und erste Ergebnisse der Freilandstudie. Die Arbeiten für diese Studie sind im Rahmen der Doktorarbeit in Göttingen durchgeführt worden und Teil-Ergebnisse, welche bisher erfasst bzw. ausgewertet wurden, sollen in der Dissertation mit vorgestellt werden, da sie das Bindeglied zwischen den verschiedenen Versuchsansätzen darstellen. Die nachfolgenden Seiten geben einen Überblick über die wissenschaftlichen Fragestellungen, die dafür angewandten Methoden und durchgeführten Experimente und abschließend eine integrative Zusammenfassung.

3 MATERIAL & METHODEN & VERSUCHSKAMPAGNEN

3.1 Konstruktion der Vektorsysteme zur Überexpression und Repression der Isoprensynthase in *Populus x canescens* (*PcISPS*)

Die Konstruktion der verwendeten Vektorsysteme und die anschließende Transformation von *Populus x canescens* (Ait.) Sm. wurde in der ersten Phase der DFG-Forschergruppe durchgeführt und erfolgte nach den in Publikation I (Behnke et al. 2007) detailliert beschriebenen Methoden. Für die Überexpression der *PcISPS* in *Populus x canescens* wurde die vollständige Sequenz der *PcISPS*-cDNA inklusive eines C-terminalen His-Tags (sechs aufeinanderfolgende Histidine) in den binären Vektor pBinAR (Bevan 1984) unter Kontrolle des konstitutiven 35S-Promotors und des ocs3-Terminators geklont (Abbildung 3). Die mit diesem Konstrukt (35S::*PcISPS*-6xHis) transformierten Linien sind folgend als O-Linien (für „Overexpression“) bezeichnet.

Für die Repression der *PcISPS* wurden Sense- und Antisense-Sequenzen eines 160bp-langen hochspezifischen Fragments der *PcISPS* mit Hilfe eines Introns in selbstkomplementierender Orientierung in den binären Vektor pART27 (Wesley et al. 2001) unter Kontrolle des 35S-Promotor/ocs3-Terminators geklont (Abbildung 3). Mit dieser Konstruktion wird posttranskriptionell die Degradation der *PcISPS*-mRNA ausgelöst und eine Translation der *PcISPS*-mRNA verhindert. Die mit diesem Konstrukt (35S::*PcISPS*-RNAi) transformierten Linien sind folgend als RA-Linien (für „Repression“) bezeichnet.

Die entstandenen Konstrukte zur Überexpression und Repression der *PcISPS*, wie auch leerer pBinAR zur Vektorkontrolle (K-Linien), wurden in *Agrobacterium tumefaciens* transformiert. Positive Klone wurden zur Transformation von *Populus x canescens* (Ait.) Sm. verwendet, und anschließende Selektion positiver Pappellinien erfolgte durch Kultur auf Kanamycin-haltigem ½ Murashige und Skoog (MS)-Medium (Leplé et al. 1992).

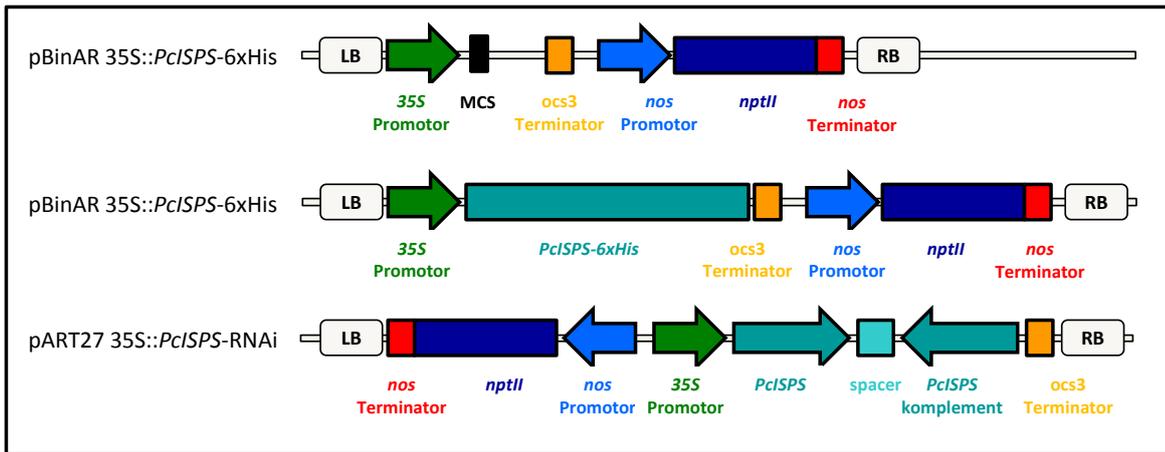


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Transformationsvektoren pBinAR und pART27, wie sie in der Arbeit Behnke et al. (2007) verwendet wurden. MCS: multicloning site, nptII: Kanamycinresistenz.

3.2 Pflanzenanzucht – Kultur und Vermehrung der Sprosskulturen

Stammkulturen aller transgenen Linien sowie Wildtyp von *Populus x canescens* wurden steril kultiviert auf $\frac{1}{2}$ MS-Medium in 1 L Glasgefäßen mit je 6 bis 7 Pflanzen pro Glas. Die Standardkulturbedingungen in der Pflanzenkulturkammer waren ein Tag/Nachtrhythmus von 16h:8h und 27°C:24°C, mit circa $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPFD während der Lichtperiode. Die Pflanzen wurden alle 8-10 Wochen geschnitten und Sprosse von ca. 2 cm auf frisches Medium umgesetzt. Für Versuchszwecke wurden einzelne Sprosse im Alter von 4 Wochen auf Erdkultur umgestellt. Hierfür sind je 3-4 Pflanzen in 1 L Glasgefäße mit 200 ml Substrat umgesetzt, mit Leitungswasser bewässert und schrittweise akklimatisiert worden. Nach circa 4 Wochen in der Pflanzenkulturkammer unter Standardbedingungen konnten die Pflanzen vereinzelt und in 2.2 L Töpfe mit demselben Substrat gebracht werden. Die weitere Kultivierung erfolgte dann in der Klimakammer oder im Gewächshaus des IMK-IFU oder unter Freilandbedingungen in Göttingen.

3.3 Versuchsdesign für Gewächshauskultur

Mit der Kultur von Pflanzen über eine gesamte Wachstumsperiode im Gewächshaus sollte (i) die Stabilität der gentechnischen Manipulation, also der transgenen Linien, mit vollständig entwickelten Pflanzen überprüft werden und (ii) eine umfassende Charakterisierung mit verschiedensten biochemischen und molekularbiologischen

Analysen durchgeführt werden. Eine detaillierte Beschreibung der Methoden zu dieser Arbeit ist in der Publikation III (Behnke et al. 2009 b) zu finden.

Für den Versuch wurden Anfang März 2006 mindestens je sechs Pflanzen (drei Monate alt) folgender transgener Linien ins Gewächshaus gebracht und dort weiter kultiviert:

- 35S::*Pc/SPS*-RNAi: RA1/2/17/18/22
- 35S::*Pc/SPS*-6x-His: O10/11/15/24/25/26/78/79/80
- Vektorkontrolle pBinAR: K12/14

plus 20 Wildtyppflanzen (WT).

Im Gewächshaus wurden die Pflanzen regelmäßig bewässert. Temperatur und Licht entsprachen dem jahreszeitlichen Verlauf, es bestand keine Klimakontrolle. Alle Pflanzen waren gleichmäßig auf vier Tischen verteilt, deren Position im wöchentlichen Rhythmus geändert wurde, um Schatten- und Lichtstandorte auszugleichen. Auch wöchentlich wurden die Wachstumsparameter (Längenzuwachs, Blattzuwachs, Wurzelhalsdurchmesser) aller Pflanzen bestimmt. Zu folgenden vier Terminen in der Vegetationsperiode 2006 sind Probennahmen an allen Pflanzen durchgeführt worden: 27./28. Juni, 25.-27. Juli, 4.- 6. September und 12., 13., 16. Oktober.

Dabei wurden für das Screening der Isoprenemissionsrate je Pflanze vier Blattscheiben à 19.6 mm² (je zwei von Blatt Nummer 9 und 10) ausgestanzt und sofort in 2 ml-Glasgefäße, gefüllt mit 200 µl Mineralwasser, überführt. Nach 30 min offener Inkubation im Dunklen zum Verflüchtigen der Wundalkohole, sind die Gläschen verschlossen und unter definierten Bedingungen (ca. 40°C und 300 µmol m⁻² s⁻¹ PPFD) für genau eine Stunde inkubiert worden. Anschließend wurde in der Gasphase der Gläschen per Online-PTR-MS-Messung die Menge an gebildetem Isopren bestimmt. Mit dieser Methode konnten pro Tag 30 Pflanzen vermessen werden.

Das restliche Blattmaterial von Blatt Nummer 9 und 10 wurde sofort nach dem Ausstanzen der Blattscheiben in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C für weitere biochemische und molekularbiologische Analysen aufbewahrt. Hierzu zählte die Quantifizierung verschiedener Metabolite (DMADP, Carotinoide, Chlorophyll, ABA, PEP/Pyruvate, Aminosäuren). Von ausgewählten Genen wurden Transkriptgehalte (Phosphoenolpyruvatcarboxylase (*PcPEPC*), *PcDXS*, *PcDXR*, *PcISPS*, *PcPSY*) und Enzymaktivitäten (*PcPEPC*, *PcIDI*, *PcISPS*) bestimmt. Mit den Analysen wurde speziell der MEP-Stoffwechselweg näher untersucht, da dieser mit der Überexpression bzw. Repression der *PcISPS* direkt betroffen ist. Aber auch „weiter entfernte“ möglicherweise beeinflusste Stoffwechselwege wurden anhand von Analysen von Stoffwechselintermediaten (Pyruvat, PEP, Aminosäuren) untersucht. Diese Messungen

wurden in Kooperation mit den Universitäten Freiburg, Braunschweig und Tübingen durchgeführt. Die Auswertung der Proben erfolgte im Rahmen dieser Arbeit.

Eine Möglichkeit, unspezifisch nach Veränderungen im gesamten Stoffwechsel zu suchen, bieten sogenannte Metabolom- und Transkriptom-Analysen. Dabei wird versucht, das gesamte Spektrum verschiedenster Metabolite und alle exprimierten Gene zu erfassen. Die Fouriertransformations-Ionencyclotronresonanz-Massenspektrometrie (FT-ICR-MS) bietet die Möglichkeit, ein hochaufgelöstes Spektrum der Metabolitzusammensetzung zu bekommen (Schmitt-Kopplin & Hertkorn 2007). Mit dem Affymetrix GenChip® Poplar Genome Array können 56000 Pappel-spezifische Gen-Transkripte detektiert werden (Azaiez et al. 2009, Kreuzwieser et al. 2009). Für diese Untersuchungen wurden zum Beprobungszeitpunkt im Juli parallel zur normalen Probennahme zusätzliche Blattproben genommen. Es wurden insgesamt 9 Blätter je WT und RA1 zu 3 Proben vereint. Die FT-ICR-MS-Messung dieser Proben wurde durchgeführt am *HelmholtzZentrum München*, Institut für Ökologische Chemie (AG P. Schmitt-Kopplin). Für die Microarray-Analysen übernahm die *Microarray Facility* in Tübingen die RNA-Qualitätskontrolle, RNA-Prozessierung und Hybridisierung. Die Auswertung der Daten ist Bestandteil der vorliegenden Arbeit.

Parallel zur Gewächshaus-Kultur wurde ein Satz Pflanzen für 6 Monate (Mai-Oktober 2007) im S1-Käfiggewächshaus als Topfpflanzen kultiviert: je 6 Stück von Vektorkontrolle K14, *Pc/SPS*-RNAi-Linien RA1 und RA17 und *Pc/SPS*-6xHis-Linie O15. Für diese Pflanzen wurde im September eine Probennahme analog zu den Probennahmen mit den Gewächshauspflanzen durchgeführt.

3.4 Versuchsdesign für Temperaturversuche

Erhöhte Thermotoleranz, insbesondere bei schnellen kurzfristigen Fluktuationen der Blatttemperatur, ist eine der diskutierten Funktionen, die Isopren zugeschrieben wird (Sharkey et al. 2001). Um diese mögliche Funktion zu testen, wurden Temperaturstressexperimente durchgeführt. Hierfür wurden einzelne Blätter von WT-Pflanzen und verschiedenen transgenen Pflanzen mit erhöhter Temperatur behandelt. Eine detaillierte Beschreibung dieser Versuche und Ergebnisse findet sich in der Publikation I (Behnke et al. 2007).

Für die Messungen wurde das Gaswechsel-Fluoreszenz-System GSF-3000 von WALZ verwendet. Das System bzw. die verwendete Messküvette ermöglicht schnelle Wechsel der Blatttemperatur. Nach je 30 min Dunkel- und Lichtadaptation ($1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

PPFD) bei 30°C folgten 3 Zyklen mit erhöhter Temperatur von 38-40°C für ca. 5 min und Erholungsphasen bei wieder 30°C für ca. 15 min. Es wurden verschiedene Photosyntheseparameter (u.a. Assimilation (A), Transpiration (E), photosynthetischer Elektronentransport (ETR), nicht-photochemisches Quenching der Chlorophyllfluoreszenz (NPQ)) aufgezeichnet, um das Verhalten der Photosynthese während des Temperaturprogramms zu dokumentieren. Mit Hilfe von Online-PTR-MS wurde die Isoprenemission verfolgt. Das Temperaturstressexperiment wurde zweifach unabhängig voneinander durchgeführt:

- (i) Mit 4 Monate alten Pflanzen, angezogen unter Standardkulturbedingungen in der Pflanzenkulturkammer (Tag/Nachtrhythmus von 16h:8h und 27°C:24°C, mit circa 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPFD während der Lichtperiode).
- (ii) Mit 9 Monate alten Pflanzen, kultiviert für 6 Monate als Topfpflanze im S1-Käfiggewächshaus in Göttingen, d.h. unter mit Freiland vergleichbaren klimatischen Bedingungen.

3.5 Versuchsdesign für Ozonversuche

Um die mögliche Funktion von Isopren als Antioxidans/ROS-Fänger zu überprüfen, wurde eine Ozonbehandlung von Pappeln in Zusammenarbeit mit dem Forschungszentrum Jülich am Institut für Chemie und Dynamik der Geosphäre, ICG-III, durchgeführt. Eine detaillierte Beschreibung dieser Versuche findet sich in der Publikation II (Behnke et al. 2009a).

Im ICG-III stehen Pflanzeninkubationskammern (CSTRs, „continuously stirred tank reactors“) unterschiedlicher Größe zur Verfügung, in denen einzelne oder auch mehrere Pflanzen kontrolliert verschiedenen Umwelteinflüssen, wie z.B. Ozon, ausgesetzt und beobachtet werden können (Abbildung 4). Das Verhalten der Pflanzen in den CSTRs wurde mittels verschiedener physiologischer Parameter kontrolliert. Im Fokus stand das Monitoring der BVOC-Emission der Pflanzen über ein Online-GC/MS-System. Die Photosynthese wurde über Assimilations- und Transpirationsraten bestimmt. Für diesen Versuch wurden Wildtyp- (WT) und *Pc/SPS*-RNAi-Pflanzen (RA1) zunächst für 3 Monate im Gewächshaus in Garmisch-Partenkirchen angezogen. Einen Monat vor Start der Versuche wurden sie nach Jülich gebracht und dort in der Klimakammer weiter kultiviert (12/12 h Tag/Nachtrhythmus, 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPFD und 21°C). In diesem Versuch wurden WT- und *Pc/SPS*-RNAi-Pflanzen einem akuten Ozonpuls ausgesetzt. Diese Methode ermöglichte einerseits eine zum Stress zeitnahe Messung der BVOC-Emission,

welche nicht gleichzeitig mit der Ozonapplikation möglich ist, da es unter Vorhandensein von Ozon zur Oxidation der BVOC in der Gasphase kommt. Andererseits spielen Adaptationsmechanismen der Pflanzen bei einem akuten Ozonpuls und einer relativ kurzen Beobachtungszeit kaum eine Rolle bei der Antwort der Pflanzen auf den Stress. Im Fokus dieser Modellstudie standen primär die Ozontoleranz und nicht die längerfristigen Anpassungsmechanismen.

Die Versuche am Forschungszentrum Jülich verfolgten drei wesentliche Fragestellungen:

- (i) Unterscheiden sich WT und nicht Isopren emittierende *P. x canescens*-Pflanzen hinsichtlich ihrer Ozonaufnahme?
- (ii) Beeinflusst die Repression der Isoprenemission das Emissionsmuster anderer BVOC?
- (iii) Welche Rolle spielt Isopren in der Ozontoleranz von *P. x canescens*?

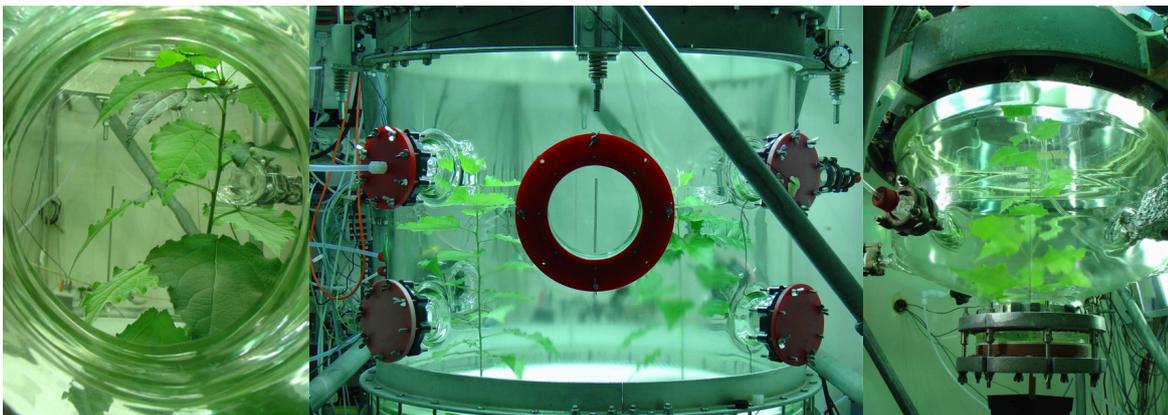


Abbildung 4: Pflanzeninkubationskammern (CSTR) am Forschungszentrum Jülich (Institut für Chemie und Dynamik der Geosphäre, ICG-III). Die CSTRs ermöglichen die Kultur von einzelnen, aber auch mehreren Pflanzen. Es befindet sich nur der oberirdische Teil der Pflanze(n) in der Kammer. An die CSTRs ist Messanalytik für photosynthetischen Gaswechsel und ein Online-GC/MS-System angeschlossen.

3.6 Versuchsdesign für den Beetkastenversuch im S1-Käfiggewächshaus in Göttingen

Unabhängig von unterschiedlicher Temperatur- oder Ozontoleranz sollte das langfristige Verhalten und Wachstum von Isopren emittierenden und nicht Isopren emittierenden Pappeln in einem Großversuch getestet werden. Hierfür wurden insgesamt 112 Pflanzen im S1-Käfiggewächshaus in Göttingen für zwei Vegetationsperioden kultiviert (Mai 2007 bis Oktober 2008). Die vorgesehenen Pflanzen wurden zunächst für drei Monate im

Gewächshaus herangezogen und waren zum Zeitpunkt der Pflanzung im Mai vier Monate alt. Jeweils 56 Stück kamen in einer Zufallsverteilung in einen Beetkasten (3m x 3m), von denen die äußere Reihe die Randpflanzen bildeten und die zentralen Hauptpflanzen umrandeten (Abbildung 5). Die Randpflanzen gewährleisteten bei diesem Versuchsaufbau gleichmäßige Kulturbedingungen für die zentralen Hauptpflanzen. Mit zwei Beetkästen standen insgesamt 60 Hauptpflanzen zur Verfügung: 20 Pflanzen Vektorkontrolle (K14) sowie je 20 Pflanzen von zwei *Pc/SPS*-RNAi-Linien (RA1, RA2). Zu vier Erntezeitpunkten (18.9.2007, 8.5.2008, 15.7.2008 und 24.9.2008) wurden folgende Parameter aufgenommen:

- (i) Gesamtlänge Spross: Abstand Wurzelhals – Spitze längster Spross
- (ii) Gesamtblattfläche: wurde berechnet über Gesamtfrischgewicht der Blätter und das Verhältnis Blattfläche/Frischgewicht von ca. 10 repräsentativen Blättern ($\Sigma_{ges}LA = \Sigma_{ges}FG * LA_i/FG_i$)
- (iii) Wurzelhalsdurchmesser
- (iv) Frisch- und Trockengewicht von Hauptspross, Nebenspross, Grobwurzel, Feinwurzel, Gesamtanzahl Blätter

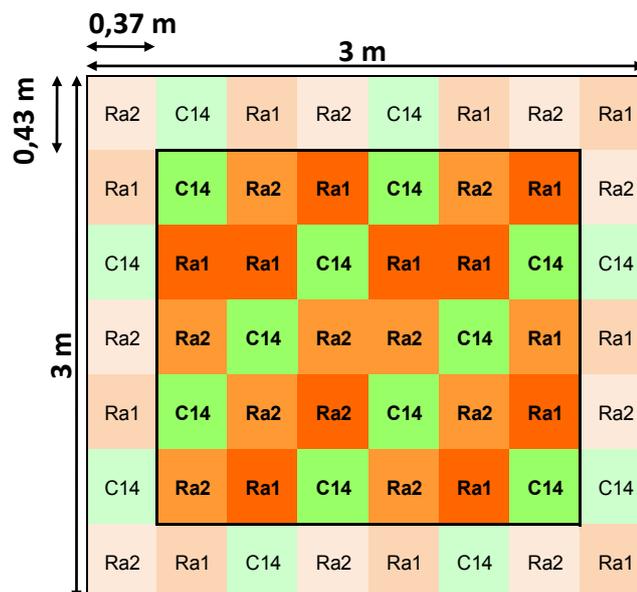


Abbildung 5: Bepflanzungsmuster der zwei Beetkästen in Göttingen im sogenannten Random-Plot-Design. Beide Beetkästen à 9 m² sind in diesem Muster bepflanzt worden, mit jeweils 26 Randpflanzen und 30 Hauptpflanzen. Insgesamt waren es jeweils 20 Hauptpflanzen je transgener Linie. K14: Vektorkontrollpflanzen, RA1: *Pc/SPS*-RNAi-Linie 1, RA2: *Pc/SPS*-RNAi-Linie 2.

Während der gesamten Kulturperiode wurden nicht invasiv Wachstumsparameter bestimmt: Gesamtlänge Spross, Wurzelhalsdurchmesser, Blattzuwachs. Mit der Kultur unter Freilandbedingungen konnten und sollten Phytopathogene und Insekten nicht ausgeschlossen werden. Ende Juni 2007 wurde deutlich, dass der gesamte Bestand in beiden Beetkästen von einem endogenen Pilz befallen wurde. Die vorläufige systematische Einordnung ergab, dass es sich um *Pollacia radiosia* (Lib.) Bald. Et Cif. handelt, welcher die sogenannte Triebspitzenkrankheit auslöst. Der Pilzbefall stellte eine interessante Möglichkeit dar, den Einfluss eines biotischen Stressfaktors auf die Pappeln zu beobachten. Deshalb wurde die Bonitur des Pilzbefalls im zweiwöchigen Abstand bis Ende August 2007 durchgeführt.

Im folgenden Jahr war der Pilzbefall kaum vorhanden und wurde deshalb nicht wieder bonitiert. 2008 kam es jedoch zu einem starken Befall mit einem Blattkäfer (*Phratora vitellinae* (L.), Kleiner Weidenblattkäfer), welcher auch bevorzugt auf Pappel lebt (Urban 2006). Das Ausmaß des Käferbefalls wurde zu den drei Erntezeitpunkten 2008 durch Ablesen und Zählen der Käfer auf allen vorhandenen Pflanzen bestimmt.

Ein weiterer wesentlicher Bestandteil des Großversuchs waren Photosynthese- und BVOC-Messungen zu vier Zeitpunkten, jeweils direkt vor den Ernten (3.9.-7.9.2007, 4.5.-8.5.2008, 9.7.-13.7.2008 und 15.9.-23.9.2008). Wie schon für das Temperaturstressexperiment wurde für die Messungen der Photosynthese das Gaswechsel-Fluoreszenz-System GSF-3000 von WALZ verwendet (beschrieben in Publikation I, Behnke et al. 2007). Es wurden verschiedene Photosyntheseparameter (u.a. Assimilation (A), Transpiration (E), photosynthetischer Elektronentransport (ETR), nicht-photochemisches Quenching der Chlorophyllfluoreszenz (NPQ)) aufgezeichnet. Mit der Online-PTR-MS-Messung wurde September 2007, Mai 2008 und Juli 2008 die Isoprenemission aufgezeichnet (beschrieben in Publikation I, Behnke et al. 2007). Im September 2008 stand ein Isoprensensoren (FIS, „fast isoprene sensor“, Hills Scientific, Boulder, Colorado, USA, Brüggemann & Schnitzler 2002) für die Messungen der Isoprenemissionsrate zur Verfügung.

Die Gaswechsel- und BVOC-Messungen wurden immer an Blatt Nummer 8 an einem der Hauptsprosse durchgeführt. Zu Zeitpunkt im Mai 2008 war das jedoch nicht möglich, da diese Messungen nur wenige Wochen nach dem Blattaustrieb Anfang April stattfanden. Hier wurde auf das älteste Blatt (Nummer 5) ausgewichen. Nach Abschluss der Messungen an allen Pflanzen wurden alle vermessenen Blätter zu einem gemeinsamen Zeitpunkt (11:00 – 12:00) für spätere Analysen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.



Abbildung 6: Beetkastenversuch im S1-Käfiggewächshaus. Aufnahmen zu den jeweiligen Messkampagnen-/Ernte-Zeitpunkten September 2007 (A), Mai (B), Juli (C) und September (D) 2008.

4 ERGEBNISSE & DISKUSSION

4.1 Stabilität und Charakterisierung der transgenen *Populus x canescens*-Linien

4.1.1 Screening der Isoprenemissionsraten mit Pflanzen aus der Sprosskultur

Nach der Transformation von *Populus x canescens* mit den Vektorsystemen zur Überexpression (35S::*Pc/SPS*-6xHis) und zur Repression (35S::*Pc/SPS*-RNAi) und erfolgreicher Selektion positiver Klone wurde ein erstes Screening verschiedener Linien mit Sprosskulturen durchgeführt. Die Ergebnisse sind detailliert in der Publikation I (Behnke et al. 2007) beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit wurden 10 transgene Linien mit dem *Pc/SPS*-RNAi-Konstrukt zur Repression der *Pc/SPS* getestet. Alle 10 RA-Linien zeigten nur marginale *Pc/SPS*-Transkriptionsraten, kaum detektierbare ISPS-Aktivität und marginale Isoprenemissionsraten. Die Repression der Isoprenemission in *Populus x canescens* mittels RNAi war somit erfolgreich.

Für die Überexpression der *Pc/SPS* wurden insgesamt 25 O-Linien aus sterilen Sprosskulturen getestet, welche ein ganz unterschiedliches Muster der Isoprenemission aufwiesen. Sieben Linien zeigten erhöhte Isoprenemissionen im Vergleich zum WT (bis zu 150%), die restlichen Linien zeigten nicht erhöhte bzw. z.T. sehr stark reduzierte Isoprenemissionen. Die Enzymaktivitäten in den O-Linien spiegelten das variable Muster in den Isoprenemissionsraten wider. Auf Transkriptionsebene zeigte sich allerdings für alle O-Linien eine Überexpression der *Pc/SPS*. Das bedeutet, dass posttranskriptional ein Abbau der *Pc/SPS*-mRNA stattfand, so dass kein aktives Enzym gebildet wurde und die Überexpression der *Pc/SPS* nicht in erhöhter Isoprenemission resultieren konnte. Die wahrscheinliche Ursache sind sogenannte Co-Suppressions-Effekte (Depicker und Van Montagu 1997), welche begründet sind in der Homologie des transformierten Gens zum internen Homolog. Die teilweise erhöhte Isoprenemission wie auch die Co-Suppressionseffekte waren abhängig vom Blattalter. Von den drei untersuchten Blattetagen pro Pflanze zeigten jeweils die jüngsten Blätter die höchsten Emissionsraten. Somit muss angenommen werden, dass der Effekt nicht stabil ist und der Versuch, die Isoprenemission in *Populus x canescens* zu steigern, nicht erfolgreich war.

4.1.2 Umfangreiche Charakterisierung der Gewächshauspflanzen

Mit der Kultur von verschiedenen transgenen *Populus x canescens*-Linien im Gewächshaus für eine Vegetationsperiode sollte die langfristige saisonale Stabilität der Linien überprüft sowie die ersten Ergebnisse des Screenings der Sprosskulturen vertieft und erweitert werden. Ergänzend zum Experiment am IMK-IFU wurde ein Satz Pflanzen für 6 Monate im S1-Käfiggewächshaus in Göttingen als Topfpflanzen kultiviert. Die durchgeführten Analysen beinhalteten eine umfassende Untersuchung des Isoprenoid-Stoffwechsels mittels gezielter Analysen ausgewählter Komponenten. Des Weiteren wurden kombinierte Metabolom- und Transkriptom-Analysen durchgeführt, um einen systembiologischen Eindruck zu erhalten. Die Ergebnisse dieser umfangreichen Studie sind in der Publikation III (Behnke et al. 2009b) detailliert beschrieben.

Für diesen Versuch wurden insgesamt fünf *Pc/SPS*-RNAi-Linien, sieben *Pc/SPS*-6xHis-Linien und 2 Vektorkontroll-Linien sowie WT-Pflanzen getestet. Zu vier Zeitpunkten (Juni, Juli, September und Oktober) wurden Probenahmen durchgeführt. Für die *Pc/SPS*-6xHis-Linien bestätigten sich generell die Ergebnisse des Screenings mit den Sprosskulturen. Zwei Linien (O11 und O15) zeigten sehr variable Isoprenemissionsraten zwischen 110% (Juni), 50% (Juli und Oktober) und 25% (September) der WT-Isoprenemissionsraten. Eine zweite Gruppe O-Linien (O24, O25, O26, O78, O80) emittierte tendenziell etwas mehr Isopren im Vergleich zum WT. Die fünf *Pc/SPS*-RNAi-Linien (RA1/2/17/18/22) zeigten zu allen vier Zeitpunkten wie schon die Sprosskulturen aus der Klimakammer eine starke und über den längeren Zeitraum stabile Repression der Isoprenemission.

Der Wegfall der Isoprenemission führte in den *Pc/SPS*-RNAi-Linien wie auch in den reprimierten O-Linien (O11 und O15) zu einer Akkumulation der metabolischen Isopren-Vorstufe DMADP. DMADP und das Isomer IDP sind auch Vorstufen der höheren plastidären Isoprenoide. Die Konzentration der Carotinoide war von der Repression der Isoprenemission zu keinem Zeitpunkt beeinflusst, während zu zwei Zeitpunkten (Juli und Oktober) die *Pc/SPS*-RNAi-Pflanzen eine geringfügig höhere Chlorophyllkonzentration aufwiesen. Die unter Freilandbedingungen kultivierten Pflanzen (K14, RA1, RA17 und O15) zeigten vergleichbare Ergebnisse. Die Repression der Isoprenemission resultierte in der Akkumulation von DMADP, aber nicht in einer Änderung der Carotinoid- oder Chlorophyllkonzentration.

Mit einem ausgewählten Probensatz (WT, K12/14, RA1/17) wurden weitere Komponenten des Isoprenoidstoffwechsels bzw. im Zusammenhang zu diesen stehende analysiert. Die Repression der Isoprenemission hatte weder einen Einfluss auf die Genexpression von *PcDXS*, *PcDXR*, *PcPSY* und *PcPEPC*, noch auf die Enzymaktivität von *PcPEPC* oder

PcIDI. Die Akkumulation von DMADP führte zu keiner Veränderung in der Gesamtkonzentration von Pyruvat und Phosphoenolpyruvat bzw. deren Verhältnis. Und auch die Zusammensetzung und Konzentration des Aminosäure-Pools blieb unverändert. Ein weiterer wichtiger zu klärender Punkt war, ob das Abschalten der Isoprenemission einen Einfluss auf die Abscisinsäure (ABA)-Konzentration und somit auf die Evapotranspiration hat. Hinweise auf eine solche Beeinflussung gab es aus Versuchen von Barta & Loreto (2006). Die ABA-Konzentrationen der *Pc/SPS*-RNAi-Pflanzen zeigten zu keinem Zeitpunkt im Jahr einen Unterschied zum WT. Die ABA-Messungen wurden ergänzt mit der Messung des Kohlenstoff-Isotopen-Verhältnisses, ausgedrückt in $\delta^{13}\text{C}$. Die $\delta^{13}\text{C}$ -Messung spiegelt die Diskriminierung von $^{13}\text{CO}_2$ der RubisCO wider und stellt somit einen integrativen Wert für CO_2 -Verfügbarkeit bzw. indirekt für die Transpiration dar. Mit den $\delta^{13}\text{C}$ -Messungen konnte bestätigt werden, dass die *Pc/SPS*-RNAi-Pflanzen nicht in ihrer Transpiration beeinträchtigt waren.

Zusammenfassend zeigte sich, dass die Repression der Isoprenemission und die resultierende Akkumulation von DMADP keine Konsequenzen für die Regulation des Isoprenoidstoffwechsels im Chloroplast haben und auch im Zusammenhang stehende Komponenten bzw. Prozesse nicht beeinflusst sind.

Der zweite wesentliche Teil der Studie umfasste vergleichende Metabolom- und Transkriptom-Analysen für einen Zeitpunkt (Juli) von WT und einer nicht Isopren emittierenden Linie (*Pc/SPS*-RNAi-Linie RA1), um einen systembiologischen Einblick auf Genexpressions- und Metabolit-Ebene zu ermöglichen. Wesentliche Ergebnisse dieser umfassenden Betrachtung waren zum einen, dass auf Transkriptebene die Glykolyse in der RA1-Linie herunterreguliert war. Andererseits zeigte sich eine Herunterregulation des phenolischen Sekundärstoffwechsels auf Transkript- und Metabolitebene.

Die Herunterregulation der Glykolyse spiegelte sich hauptsächlich auf der Transkriptionsebene wider. Insgesamt 10 glykolytische Enzyme (z.B. Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, Hexokinase, Pyruvat-Kinase, Fructose-Bisphosphat-Aldolase und Phosphoglycerat-Mutase) waren weniger stark exprimiert in der RA1-Linie. Es zeigte sich jedoch kaum eine Veränderung auf Metabolitebene. Neben der Glykolyse zeigte sich auch in anderen Kohlenhydrat-Stoffwechselwegen eine Herunterregulation der Transkriptgehalte beteiligter Enzyme (Fructose-/Mannose-/Saccharose-/Stärke-Metabolismus). Die mögliche Erklärung für den Effekt auf den Kohlenhydratmetabolismus, insbesondere auf die Glykolyse, ist eine Art negative Rückkopplung in Folge der DMADP-Akkumulation. Insbesondere für den Kohlenhydratmetabolismus ist bekannt, dass Stoffwechselendprodukte die Transkription der Stoffwechsellzyme hemmen (Sheen 1990, Yu 1999). Zudem gibt es auch Hinweise aus der Literatur, dass phosphorylierte Kohlenhydrate einen negativen Einfluss auf den Kohlenhydratfluss in der Glykolyse haben

können (Hohmann et al. 1996, Teusink et al. 1998). Somit ist es denkbar, dass die übermäßige Akkumulation von DMADP in den RA-Linien einen hemmenden Einfluss auf den Kohlenhydrat-Stoffwechsel und insbesondere die Glykolyse hat. Diese Art der Rückkopplung ermöglicht eine strikte Kontrolle des Kohlenhydratstoffwechsels und das Ausbalancieren der Kohlenhydratallokationen entsprechend der Bereitstellung und des Verbrauchs in den verschiedenen Prozessen des Primär-, Sekundär- und Energiestoffwechsels.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen zur Glykolyse reflektierten sowohl Transkriptom- als auch Metabolom-Daten die Herunterregulation des Phenylpropanoidstoffwechsels in der RA1-Linie im Vergleich zu WT-Pflanzen. Insgesamt neun an der Biosynthese von Flavonoiden beteiligte Enzyme waren in der RA1-Linie weniger stark exprimiert (z.B. Phenylalanin-Ammonia-Lyase, 4-Coumaroyl-CoA-Synthetase, Chalcon-Isomerase und Leucocyanidin-Oxygenase), und auch die Konzentration der Endprodukte war geringer (Flavone, Flavonole, Anthocyane). Auf Genexpressionsebene umfasste die Regulation aber auch schon die vorangehenden Schritte, den Shikimatweg und die Biosynthese der aromatischen Aminosäuren, setzte also schon am Schnittpunkt von Primär- und Sekundärstoffwechsel an. Metabolitkonzentrationen dieser einleitenden Stoffwechselwege waren jedoch nicht beeinflusst. Die Tatsache, dass sich die Herunterregulation des Aromatenstoffwechsels auch in der Metabolitkonzentration widerspiegelte, spricht für eine funktionelle Bedeutung in den Pflanzen. Die Quantifizierung des Gesamtphenolgehaltes und der Proanthocyanidin-Konzentration für alle vier Zeitpunkte des Jahres bestätigte die geringeren Konzentrationen an phenolischen Substanzen in mehreren *Pc/SPS*-RNAi-Linien für Juli, nicht aber für die anderen Monate. Laut Klimadaten für die Vegetationsperiode 2006 waren die Pflanzen im Juli den höchsten Temperaturen und Lichtintensitäten ausgesetzt. In der Tat ist die Temperatur ein kritischer Faktor, der die Biosynthese von Flavonoiden kontrolliert. Niedrige Temperaturen bewirken eine Stimulation der Flavonoidbiosynthese (Christie et al. 1994, Leyva et al. 1995) und hohe Temperaturen eine Hemmung (Bilger et al. 2007, Dela et al. 2003). Die genauen Mechanismen dieser Regulation bei hohen Temperaturen sind noch nicht geklärt. Bekannt ist, dass die Genexpression von Enzymen des Shikimatwegs und des Phenylpropanoidstoffwechsels unter der Kontrolle von spezifischen MYB-Transkriptionsfaktorkomplexen steht (Lillo et al. 2008, Tohge et al. 2005, Rowan et al. 2009). Außerdem konnten Vanderauwera et al. (2005) demonstrieren, dass die Akkumulation von H₂O₂ eine wesentliche Rolle in der Signalkaskade spielt und für die Herunterregulation des Phenylpropanoidstoffwechsels mitverantwortlich ist. Die Transkriptom-Analysen zeigten, dass auch in der nicht Isopren emittierenden RA1-Linie Komponenten der MYB-Transkriptionsfaktorkomplexe an der Herunterregulation des

Phenylpropanoidstoffwechsels beteiligt waren. Mittels Konfokaler-Laser-Scanning Mikroskopie konnte außerdem eine vermehrte Akkumulation von H_2O_2 während moderat hoher Temperatur und Lichtintensität (HLHT, 30°C und $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPF) *in vivo* in der nicht Isopren emittierenden Linie nachgewiesen werden, während bei Wildtyp-Pflanzen HLHT nicht in einer H_2O_2 -Akkumulation resultierte.

Demzufolge scheinen die hohen Temperaturen und Lichtintensitäten im Juli in der RA1-Linie und den anderen *Pc/SPS-RNAi*-Linien zu einer vermehrten H_2O_2 -Akkumulation zu führen, welche die Herunterregulation des Phenylpropanoidstoffwechsels auf molekularer Ebene induzierte. Die Akkumulation von H_2O_2 in den nicht Isopren emittierenden Pflanzen verweist auf eine der meist diskutierten Funktionen von Isopren bzw. der Isoprenemission. Verschiedene Studien zeigten, dass Isopren antioxidative Eigenschaften besitzt und effektiv ROS abfangen kann (Affek & Yakir 2002, Velikova & Loreto 2005). In dieser Funktion scheint Isopren die Konzentration von ROS zu kontrollieren, welche einerseits eine schädliche Wirkung haben können, andererseits als Signalmoleküle für die Regulation verschiedenster zellulärer Prozesse benötigt werden (Foyer & Noctor 2005).

4.2 Untersuchungen zur Rolle der Isoprenemission in der Toleranz von abiotischem Stress

4.2.1 Temperaturversuche

Zur Überprüfung der verschiedenen diskutierten Funktionen der Isoprenemission für die Pflanzen wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Stressexperimente durchgeführt. Mit einem Temperaturstressexperiment wurde die schützende Funktion des Isoprens während schnell fluktuierender Blatttemperaturen nachgewiesen. Die Details zu diesem Versuch sind in der Publikation I (Behnke et al. 2007) beschrieben.

Der Temperaturversuch wurde zweimal unabhängig durchgeführt, mit Pflanzen angezogen in der Klimakammer und mit Pflanzen kultiviert unter Freilandbedingungen. Beide Versuche konnten zeigen, dass Isopren den Photosyntheseapparat während Temperaturzyklen schützt. Eine Erhöhung der Temperatur von 30°C auf 40°C bewirkte im WT eine Stimulation des Elektronentransports (ETR), während gleichzeitig die Assimilation zurückging. Das daraus resultierende Ungleichgewicht zwischen absorbierter Energie und Photochemie spiegelte sich im Anstieg des nicht-photochemischen Quenchings der Chlorophyllfluoreszenz (NPQ) wider. In jedem Zyklus stellten sich im WT mit der Abnahme der Temperatur zurück auf 30°C wieder die Ausgangswerte für ETR,

Assimilation und NPQ her. Die *Pc/SPS*-RNAi-Pflanzen zeigten jedoch ein anderes Verhalten während der Temperaturzyklen. Die Stimulation der ETR bei 40°C war im Vergleich zum WT weniger ausgeprägt und der Rückgang in den Erholungsphasen (30°C) verstärkt. Daraus resultierten ein kontinuierlicher Rückgang der ETR und ein stetiger Anstieg des NPQ in den *Pc/SPS*-RNAi-Pflanzen während des gesamten Temperaturprogramms. Die Assimilation der nicht Isopren emittierenden Pflanzen zeigte bis zum zweiten Temperaturanstieg einen zum WT vergleichbaren Verlauf, brach dann jedoch ein und erholte sich bis zum Ende des Temperaturprogramms nicht. Mit allen drei Parametern (ETR, Assimilation, NPQ) konnte gezeigt werden, dass fluktuierende Blatttemperatur in nicht Isopren emittierenden Pflanzen die Photosynthese beeinträchtigt. Im Detail stellte sich heraus, dass ohne den Schutz von Isopren zuerst der Membran-lokaliserte Elektronentransport (ETR) Schaden nimmt. Die Auswirkungen auf die nicht Membran-lokaliserten CO₂-Fixierungsreaktionen, repräsentiert durch die Assimilation, zeichneten sich erst verzögert ab. Mit dieser zeitlichen Auflösung konnte nachgewiesen werden, dass sich fluktuierende Blatttemperaturen in den *Pc/SPS*-RNAi-Pflanzen primär auf die Photosynthesemembranen negativ auswirkten. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Isopren seine Schutzfunktion in der Photosynthesemembran ausübt. Der genaue Mechanismus, mit dem Isopren den Schutz bewirkt, konnte mit diesen Experimenten nicht näher aufgeklärt werden. Es ist möglich, dass Isopren die Membran stabilisiert, somit auch bei hoher Temperatur einen kontrollierten ETR über die einzelnen Membran-lokaliserten Komponenten gewährleistet. Hinweise hierfür liefern Modellversuche von Siwko et al. (2007). Fehlt Isopren, wird die Membran instabil, der ETR gerät außer Kontrolle und verursacht die vermehrte Entstehung von ROS. Die Akkumulation von ROS verursachte in Folge Lipid- oder Proteinoxidation an den Komponenten der Photosynthese. Andererseits ist es auch denkbar, dass Isopren nicht primär eine Verbesserung der Membranstabilität bewirkt. Vielmehr könnte es auch aufgrund seiner antioxidativen Eigenschaften die negativen Konsequenzen der Membranstabilität abmildern, welche primär die Akkumulation von ROS sind.

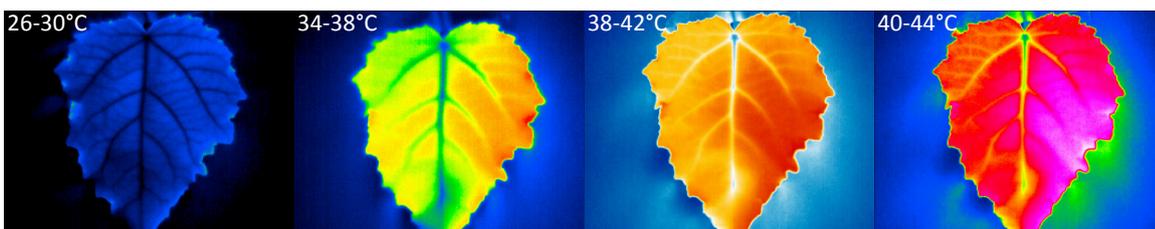


Abbildung 7: Infrarotaufnahmen von *Populus x canescens*-Blättern mit unterschiedlicher Blattemperatur. Die Blätter sind in kurzer Zeit mit einem Föhn erwärmt worden. Die Aufnahmen verdeutlichen, dass Pappel-Blätter aufgrund ihrer geringen Wärmespeicherkapazität sehr empfindlich auf die Änderung der Umgebungstemperatur reagieren.

4.2.2 Ozonversuche

Mit Hilfe einer Ozonbehandlung von Pappeln wurde die schützende Funktion des Isoprens in Zusammenhang mit erhöhter Ozonkonzentration getestet. Die Details zu diesem Versuch sind in der Publikation II (Behnke et al. 2009a) beschrieben.

Im ersten Teil dieses Versuches wurde geklärt, ob sich WT- und *Pc/SPS-RNAi*-Pflanzen (RA1-Linie) hinsichtlich ihres Ozonaufnahmemechanismus unterscheiden. Die Ozonaufnahme der Pflanzen findet prinzipiell über die Stomata der Blätter statt und wurde bestimmt über die Differenz der Ozonkonzentration an Kammereingang und Kammerausgang. Hierfür musste jedoch ausgeschlossen werden, dass weder das Material der Versuchskammer noch Pflanzenoberflächen (Kutikula, Spross) zusätzliche Senken für Ozon darstellen. Außerdem können emittierte BVOC in der Kammer mit Ozon reagieren und stellen somit auch eine theoretische Senke für Ozon dar (Fares et al. 2008). Das BVOC-Emissionsprofil nicht gestresster Pappeln ergab, dass WT-Pflanzen hauptsächlich Isopren und Methanol und RA1-Pflanzen nur Methanol emittieren. Andere BVOC waren unter der Nachweisgrenze. Für Isopren und Methanol können theoretisch Reaktionen mit Ozon in der Kammer ausgeschlossen werden (Atkinson 1997). Es wurde aber auch experimentell gezeigt, dass weder Kammer- oder Pflanzenoberflächen noch Methanol/Isopren-Emissionen einen signifikanten Beitrag zum Ozonverlust leisten.

Unter verschiedensten Kulturbedingungen und Ozonkonzentrationen zeigte sich stets eine nahezu 1:1-Korrelation von stomatärer Leitfähigkeit für Ozon und der tatsächlich aufgenommenen Ozonkonzentration. Somit war die Ozonaufnahme in Isopren emittierenden und nicht Isopren emittierenden *Populus x canescens*-Pflanzen allein abhängig von der stomatären Leitfähigkeit der Blätter.

Bei der Durchführung der Versuche zur Ozontoleranz von WT- und RA1-Pflanzen wurde explizit darauf geachtet, dass die tatsächlich aufgenommene Ozondosis die Referenzgröße für den Vergleich der Behandlung war und nicht nur die applizierte Menge an Ozon. Der Ozonpuls resultierte in WT- und RA1-Pflanzen in transienten induzierten Emissionen verschiedener BVOC, welche in unterschiedlichen zeitlichen Verlaufsmustern emittiert wurden. Direkt nach dem Ozonpuls konnten hohe Emissionen an Wundalkoholen (GLV, „green leaf volatiles“) in einem relativ kurzen Zeitfenster von acht Stunden beobachtet werden. GLV gehören zu den oxygenierten VOC, und GLV-Emissionen sind ein genereller Bestandteil der Stressantwort von Pflanzen (Heiden et al. 2003). Die einzelnen Reaktionsschritte, die zur Bildung der GLV führen, sind bekannt (Croft et al. 1993, Feussner & Wasternack 2002). In mehreren Schritten werden Fettsäuren aus der Membran freigesetzt, zu Hydroperoxiden katalysiert und diese anschließend zu flüchtigen C₆-Aldehyden und C₆-Alkoholen. Somit spiegeln GLV-Emissionen den enzymatischen

Abbau von Membranbestandteilen wider. Abhängig von der Fettsäurezusammensetzung, der Aktivität der beteiligten Enzyme und der Art und Stärke des einwirkenden Stresses, können unterschiedliche Mischungen verschiedener Aldehyde und Alkohole entstehen (Heiden et al. 2003). Vergleichbar zur Zusammensetzung in Tabak (Beauchamp et al. 2005) setzten sich in *Populus x canescens* 95% der gesamten GLV-Emission aus fünf einzelnen Komponenten zusammen: (Z)-3-Hexenal, (Z)-3-Hexenol, (Z)-3-Hexenylacetat, (E)-2-Hexenal und 1-Pentenol. Somit konnte die Summe der fünf als repräsentatives Maß für die GLV-Emission angenommen werden. Die WT-Pflanzen zeigten bis zu dreifach höhere Ozon-induzierte GLV-Emissionen im Vergleich zu den RA1-Pflanzen.

Nach dem Ozonpuls und den GLV-Emissionen folgten Emissionen verschiedener stressinduzierter Terpene. Das Monoterpen trans- β -Ocimen, das Homoterpen DMNT und der Sesquiterpenalkohol Farnesol zeigten einen eher transienten Verlauf mit Maxima zu verschiedenen Zeitpunkten, während die Emission des Homoterpens TMTT und des Sesquiterpens α -Farnesen einen kontinuierlich steigenden Verlauf nahm. Parallel zur Emission von TMTT und α -Farnesen verlief auch die Emission von Methylsalicylat (MeSA), einem chemischen Abkömmling des Pflanzenhormons Salicylsäure und selbst Signalmolekül. Dieses Emissionsmuster umfasste die typischen BVOC in Folge von Stress (Arimura et al. 2005, Heiden et al. 2003)

Auf Basis der Kohlenstoffatome entsprach die Summe der stressinduzierten BVOC den Isoprenemissionsraten im WT. *Populus x canescens* ist somit nicht nur ein starker Isopren-Emitter, sondern emittiert unter bestimmten Bedingungen auch eine Vielzahl anderer BVOC in nennenswerten Konzentrationen. Das Muster und der Zeitverlauf der einzelnen BVOC wiesen bis auf die GLV-Emissionen keinen deutlichen Unterschied zwischen WT- und RA1-Pflanzen auf. Somit hat die Repression der Isoprenemission keinen negativen Einfluss auf die Emission anderer BVOC.

Zur Kontrolle der Pflanzen wurden während und nach der Ozongabe auch Assimilation und Transpiration aufgezeichnet. In WT- und RA1-Pflanzen setzte ein deutlicher Rückgang beider Photosyntheseparameter mit nur kurzer Verzögerung zum Start der Ozonbehandlung ein und setzte sich die folgenden 7 h fort. Während der 40 h Beobachtungszeit erholten sich beide Pflanzentypen nicht mehr von der Ozonbehandlung, womit sich ein bleibender Schaden verdeutlichte. In den WT-Pflanzen verursachte die applizierte Menge Ozon eine deutliche stärkere Beeinträchtigung der Assimilations- und Transpirationsraten verglichen zu den nicht Isopren emittierenden Pflanzen.

40 h nach der Ozonapplikation wurden die sichtbaren Schäden – die nekrotische Blattfläche – bonitiert. Abbildung 8 zeigt exemplarisch Blätter mit ozoninduzierten Nekrosen von verschiedenem Ausmaß. Die Bonitur bestätigte die Messungen der

Photosynthese. Die gleiche Ozondosis verursachte im WT deutlich mehr Schäden als in den RA1-Pflanzen. Es zeigte sich, dass die GLV-Emissionen als frühzeitiger quantitativer Indikator der Ozonschäden geeignet sind. Die Stärke der GLV-Emissionen korrelierte gut mit den bonitierten Schäden.

Verschiedene Parameter – GLV-Emission, Photosynthese und Bonitur der Nekrosen – demonstrierten in diesem Versuch eindeutig eine höhere Ozontoleranz der nicht Isopren emittierenden Pappeln. Ausgehend von der Annahme, dass Isopren vor oxidativem Stress schützt, war dieses Ergebnis sehr unerwartet bzw. konträr zur in der Literatur diskutierten Funktion von Isopren (z.B. Loreto & Velikova 2001). Eine Erklärung hierfür lieferte die Analyse verschiedener Komponenten des antioxidativen Systems. Nicht Isopren emittierende Pflanzen (RA1-Linie und eine weitere *Pc/SPS*-RNAi-Linie (RA22)) wiesen höhere Konzentrationen an reduziertem und oxidiertem Ascorbat auf, sowie an α -Tocopherol und Zeaxanthin. Ascorbat ist wasserlöslich, liegt in höheren Konzentrationen auch im apoplastischen Wasserfilm vor und stellt einen sehr effektiven Schutz gegen Ozon dar (Luwe et al. 1993). Wenn schon im Apoplasten Ozon und ROS von Ascorbat abgefangen werden können, sind nachfolgend weniger Zellen geschädigt (Luwe et al. 1993). Im Gegensatz zu Ascorbat sind α -Tocopherol und Zeaxanthin membranlokalisierte Antioxidantien und schützen vor Lipidperoxidation. Eine höhere Konzentration dieser beiden Komponenten stellt somit einen Schutz speziell für Membranen dar. Die Steigerung des antioxidativen Systems in den *Pc/SPS*-RNAi-Pflanzen scheint eine effizientere Entgiftung von Ozon und nachfolgender ROS im Vergleich zum WT zu ermöglichen. Dass die geringere Akkumulation von ROS Schäden direkt durch verringerte Oxidation von Zellbestandteilen und indirekt durch eine verminderte Induktion des programmierten Zelltods verhindern kann, wurde in Langebartels et al. (2002) gezeigt.



Abbildung 8: Ozoninduzierte Nekrosen in *Populus x canescens*. Die Aufnahmen zeigen Blätter mit verschiedenem Ausmaß an Ozonschäden 40 h nach der Applikation eines Ozonpulses (\emptyset 374 $\mu\text{mol O}_3 \text{ m}^{-2}$).

4.3 Wachstum und Pflanzenfitness der transgenen Linien unter Freilandbedingungen

Mit der Kultur nicht Isopren emittierender Pappeln (Linien RA1 und RA2) sowie Isopren emittierender Pappeln (Linie K14) unter Freilandbedingungen in einem Großversuch sollte überprüft werden, ob die mit Modellstudien demonstrierte veränderte Thermo- und Ozontoleranz für die Kultur unter natürlichen Bedingungen relevant ist. Unter natürlichen Wachstumsbedingungen wirkt eine Vielzahl verschiedener abiotischer und biotischer Umweltfaktoren parallel auf die Pflanzen ein, welche im Zusammenspiel eine ganz andere Relevanz haben können.

Zu den jeweils physiologisch interessanten Zeitpunkten Austrieb (Mai 2008), Hochsommer (Juli 2008) und Ende der Vegetationsperiode (September 2007 und 2008) wurden die Messungen der Photosynthese und der Isoprenemissionsraten durchgeführt. Anschließend an die Messkampagnen wurden jeweils fünf Bäume pro Linie (RA1, RA2 und K14) geerntet. Abbildung 9 zeigt die CO₂-Assimilationsraten (Abbildung 9, A) als Parameter für die Photosynthese und die Holz-Trockenbiomasse (Abbildung 9, B) als Parameter für Wachstum und Biomasseproduktion. Die Assimilationsraten sind bezogen auf g Trockengewicht, da die spezifische Blattfläche zu den vier Messzeitpunkten September 2007, Mai 2008, Juli 2008 und September 2008 sehr unterschiedlich war ($\approx 190 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$, $\approx 310 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$, $\approx 210 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$ und $\approx 120 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$). Die Holz-Trockenbiomasse ist die Summe von Hauptspross und Nebensprossen bzw. aller holzigen Bestandteile der Pflanze (Stamm, Äste).

Die Messung der Photosynthese zeigte vergleichbare Assimilationsraten für die ersten drei Zeitpunkte ($\approx 2\text{-}3 \mu\text{mol CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ s}^{-1}$), während im September 2008 die photosynthetische Aktivität sehr gering war ($\approx 0.7 \mu\text{mol CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Die zweite Herbstmessung wurde im Vergleich zum Vorjahr etwas später durchgeführt, so dass in den Pflanzen vermutlich schon Seneszenz eingesetzt hatte. Dieser genetisch gesteuerte Alterungsprozess umfasst eine geordnete Folge von cytologischen und biochemischen Schritten, bei denen es zum Abbau der Zellorganellen und schließlich zum Tod kommt. Einer der frühen Prozesse ist der Abbau der Chloroplasten und der daraus resultierende Rückgang der Photosynthese (Keskitalo et al. 2005, Andersson et al. 2004). Der Auslöser für die Seneszenz-Prozesse ist wahrscheinlich allein die Photoperiode, also das Unterschreiten eines kritischen Wertes der Tageslänge (Keskitalo et al. 2005). Der Zeitpunkt des Seneszenz-Beginns und somit der kritische Wert der Tageslänge kann somit vermutlich anhand des Unterschieds der Assimilation zwischen erster und zweiter Herbst-Messung auf den dazwischenliegenden Zeitraum eingrenzt werden.

Die Assimilationsdaten zeigten einen Unterschied zwischen den drei verschiedenen Linien bzw. genauer gesagt zwischen Isopren emittierenden Vektorkontrollpflanzen (K14) und nicht Isopren emittierenden Pflanzen (RA1 und RA2). Im September 2007, Mai 2008 und September 2008 wiesen die K14-Pflanzen höhere Photosyntheseraten auf im Vergleich zu RA1- und RA2-Pflanzen. September 2007 war der Unterschied am deutlichsten und signifikant beim Vergleich der Linien für jeden Messzeitpunkt unabhängig ($P < 0.05$, einfaktorielle ANOVA mit je drei Gruppen, SPSS). Mit einer mehrfaktoriellen Varianzanalyse wurden alle Assimilationsdaten zusammen auf den signifikanten Einfluss der zwei Haupteffekte – Emittertyp und Messzeitpunkt – getestet (GLM – allgemein mehrfaktoriell, SPSS). Die Statistik bestätigte, dass die geringeren Assimilationsraten der nicht Isopren emittierenden Pflanzen (Linien RA1 und RA2) einen allgemeinen Effekt darstellten ($P < 0.05$).

Die Vektorkontrollpflanzen (K14) emittierten zu den vier Messzeitpunkten durchschnittlich $3,3 \pm 0,3 \text{ nmol g}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $12,0 \pm 2,1 \text{ nmol g}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $13,0 \pm 2,0 \text{ nmol g}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und $4,3 \pm 0,3 \text{ nmol g}^{-1} \text{ s}^{-1}$ Isopren. Die Isoprenemissionsraten der *Pc/SPS*-RNAi-Linien (RA1 und RA2) betragen jeweils ca. 3% der Emissionsraten von K14.

Als Parameter für das Wachstum bzw. für die Biomasse-Produktion sollen an dieser Stelle hier die Ernteergebnisse für die Holz-Trockenbiomasse gezeigt werden. Tendenziell zeigte sich für alle vier Ernten eine gesteigerte höhere Biomasseproduktion für die RA1- und RA2-Pflanzen im Vergleich zu K14-Pflanzen. Für September 2007 und Mai 2008 war der Unterschied zwischen den Linien RA2 und K14 signifikant ($P < 0.05$, einfaktorielle ANOVA, SPSS). Die mehrfaktorielle Varianzanalyse ($P < 0.05$, GLM – allgemein mehrfaktoriell, SPSS) bestätigte einen allgemeinen Effekt des Emittertyps auf die Holz-Trockenbiomasse. Innerhalb von zwei Vegetationsperioden produzierten K14-Pflanzen 229 g Holz-Trockenbiomasse, RA1-Pflanzen 281 g (entspricht +23% im Vergleich zu K14) und RA2-Pflanzen 319 g (+39%). Zusammenfassend zeigte sich, dass beide nicht Isopren emittierenden Linien (RA1 und RA2) über die zwei Vegetationsperioden trotz geringerer CO_2 -Fixierungsraten mehr Biomasse produzierten.

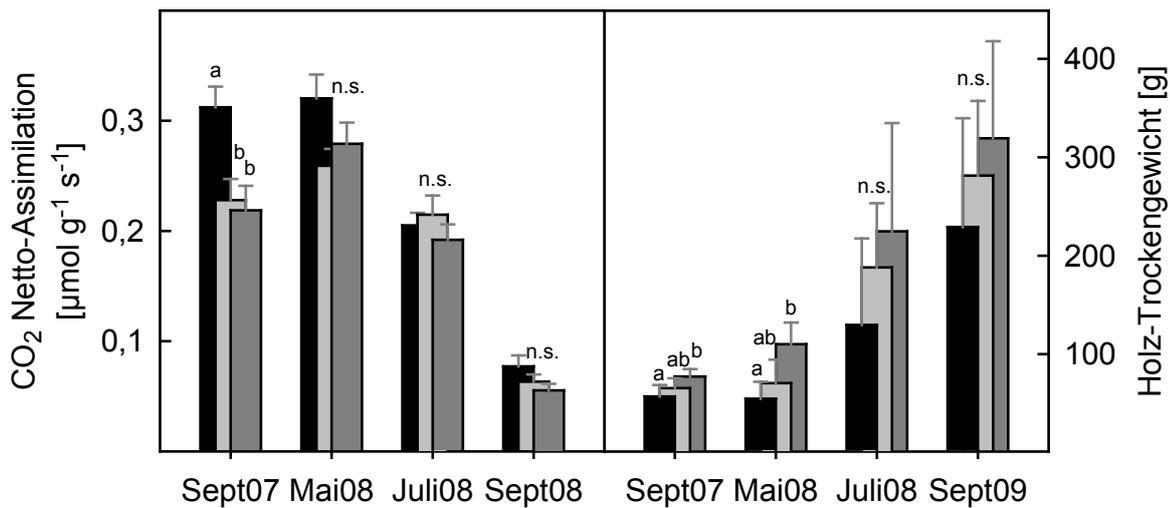


Abbildung 9: CO₂-Assimilationsraten und Holz-Trockenbiomasse von transgenen *Populus x canescens*-Pflanzen mit reprimierter Isoprenemission. Die Pflanzen wurden für zwei Vegetationsperioden (Mai 2007 bis September 2008) im S1-Käfiggewächshaus unter Freilandbedingungen kultiviert. Photosynthese-Messungen und sich anschließende Ernten sind zu vier Zeitpunkten (September 2007, Mai 2008, Juli 2008 und September 2008) durchgeführt worden. Vektorkontrollpflanzen K14, ■, n≥11 ±SE für Gaswechsellmessungen, *Pc/SPS*-RNAi-Linie RA1, □, n≥9 ±SE, *Pc/SPS*-RNAi-Linie RA2, ▒, n≥11 ±SE. Replikationen für Biomasseparameter immer n=5. Einfaktorielle ANOVA wurde für jeden Zeitpunkt separat durchgeführt, P<0.05 (SPSS).

In der ersten Vegetationsperiode (2007) kam es zur Infektion mit einem phytopathogenen Pilz. Nach vorläufiger Bestimmung anhand der Schadsymptome und in Frage kommenden Arten handelte es sich um eine Infektion der Pappel mit *Pollacia radiosa*. *Pollacia radiosa* (Lib.) Bald. Et Cif. (teleomorph: *Venturia tremulae* Aderh.) kann gebietspezifisch in drei Varietäten/Sorten untergliedert werden. Die Varietät *Pollacia radiosa* var. *radiosa* (teleomorph: *V. tremulae* Aderh. var. *tremulae*) kommt nur in Europa auf *Populus tremula* und deren Hybriden vor (Newcombe 1996). Die Infektion verursacht das Absterben von Blättern und jungen Trieben. Zunächst bilden sich unregelmäßig große schwarze Flecken auf den Blättern. Im weiteren Verlauf färben sich Blätter und Triebe schwarz und vertrocknen. Die abgestorbenen Triebe krümmen sich hakenförmig ein (Newcombe 1996). Die beschriebenen Schadsymptome stimmten mit den Beobachtungen überein (Abbildung 10). Die Schadsymptome (hauptsächlich die Nekrosen der Blätter) nahmen ab Juli 2007 ein verstärktes Ausmaß an und wurden von diesem Zeitpunkt an bis Ende August regelmäßig bonitiert. Es zeigte sich, dass der Pilzbefall in den zwei nicht Isopren emittierenden Linien (RA1 und RA2) bis auf den ersten und letzten Boniturzeitpunkt deutlich geringer war (Abbildung 11A, P<0.05, einfaktorielle ANOVA, SPSS). In der zweiten Vegetationsperiode (2008) zeigte sich bedingt durch

andere klimatische Verhältnisse nur noch ein sehr geringes Ausmaß der Pilzinfektion (Daten nicht gezeigt), ohne dass ein Unterschied zwischen den Linien deutlich wurde.



Abbildung 10: Schadsymptome an *Populus x canescens*, verursacht durch die Infektion mit einem phytopathogenen Pilz. Nach vorläufiger systematischer Einordnung handelt es sich bei dem Pilz um eine Varietät von *Pollacia radiosia*. *P. radiosia* löst die sogenannte Tribspitzenkrankheit aus, welche durch Absterben von jungen Blättern und Trieben gekennzeichnet ist.

In der Vegetationsperiode 2008 wurde der Pappelbestand in den Beetkästen von *Phratora vitellinae*, dem Kleinen Weidenblattkäfer, befallen. Vorkommen, Entwicklung und ökonomische Bedeutung von *Phratora vitellinae* sind umfassend beschrieben in Urban (2006). *P. vitellinae* gehört zu der Familie der Blattkäfer (*Chrysomelidae*) und ist eine der am weitesten verbreiteten Arten der Gattung bzw. der Familie (Urban 2006). *P. vitellinae* lebt auf verschiedenen Weiden- und Pappelarten. Es werden vor allem junge intensiv wachsende Bäume befallen, und die Imagines (erwachsene Tiere) bevorzugen die neuen, noch nicht entfaltenen Blätter an der Spitze des Sprosses. *P. vitellinae* lebt über mehrere Generationen (ca. drei) die ganze Vegetationsperiode von Mai bis Oktober auf der Wirtspflanze. Unter begünstigenden Bedingungen (moderater und trockener Winter, sehr trockener und warmer Frühling) kommt es häufig zu einem massenhaften Auftreten. Auf Weiden- und Pappelplantagen kann *P. vitellinae* immensen Schaden verursachen und gehört somit zu den bedeutendsten Schädlingen für Weiden und Pappeln (Urban 2006). Das Ausmaß des Befalls der Beetkastenpflanzen wurde jeweils zu den drei Messkampagnen (Mai, Juli und September) bestimmt, indem die Käfer von jedem Baum abgelesen und gezählt wurden. Die Zählungen ergaben, dass *P. vitellinae* zu jedem Zeitpunkt die zwei nicht Isopren emittierenden Linien (RA1 und RA2) bevorzugt hatte (Abbildung 11B). Im Juli war der Effekt am deutlichsten ($P < 0.05$, einfaktorielle ANOVA,

SPSS). Mit der mehrfaktoriellen Varianzanalyse (GLM – allgemein mehrfaktoriell, SPSS) bestätigte sich, dass *P. vitellinae* die nicht Isopren emittierenden Pappeln den Isopren emittierenden vorzog. Die Käfer fraßen, wie in Urban (2006) beschrieben, hauptsächlich an den neuen Blättern im oberen Bereich der Triebe und verursachten relativ umfangreiche Blattschäden (Abbildung 12). Die Ursache für diese Differenz ist unklar, jedoch zeigt eine aktuelle Arbeit mit transgenen Isopren emittierenden Tabakpflanzen, dass Isopren direkte Effekte auf das Fraßverhalten bzw. das Wachstum von herbivoren Insekten haben kann (Laothawornkitkul et al. 2008). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Larve des Tabakschwärmers die nicht Isopren emittierenden Futterpflanzen den transgenen Isopren emittierenden Pflanzen vorzieht. Es scheint also, dass Isopren die Wahl von herbivoren Insekten für ihre Futterpflanzen beeinflussen kann. Inwieweit die hier beobachtete Differenz direkt auf Isopren zurückzuführen ist, muss detailliert untersucht werden. Die Daten in den Publikationen II (Behnke et al. 2009a) und III (Behnke et al. 2009b) zeigen ja klar, dass der Wegfall der Isoprenemission zu einer Veränderung des Chemotyps führen kann. Somit ist nicht auszuschließen, dass das Verhalten der Blattkäfer auf weitreichenderen Veränderungen im Stoffwechsel beruht.

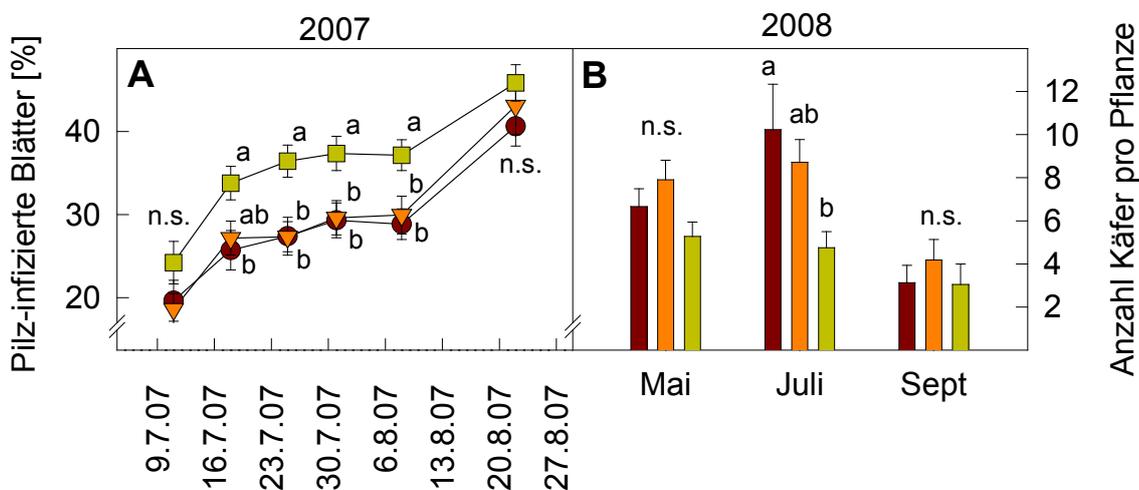


Abbildung 11: Resistenz gegenüber *Pollacia radiososa* (phytopathogener Pilz) und *Phratora vitellinae* (Kleiner Weidenblattkäfer) von transgenen *Populus x canescens*-Pflanzen mit veränderter Isoprenemission. Vektorkontrollpflanzen (K14, ■) und zwei *PclSPS*-RNAi-Linien (RA1, ■ und RA2, ■) sind für zwei Vegetationsperioden unter Freilandbedingungen (S1-Käfiggewächshaus) kultiviert worden.

Mit der Kultur von Isopren emittierenden Pflanzen und nicht Isopren emittierenden Linien über zwei Vegetationsperioden unter Freilandbedingungen zeigte sich unterschiedliches

Verhalten auf mehreren Ebenen. Die nicht Isopren emittierenden Pflanzen assimilierten weniger CO₂, wuchsen andererseits aber besser und produzierten mehr Biomasse. Die Resistenz gegenüber dem phytopathogenen Pilz *Pollacia radiosa* war bei nicht Isopren emittierenden Pflanzen höher, während sie anfälliger für den Befall durch den Schädling *Phratora vitellinae* (Kleiner Weidenblattkäfer) waren. Die Ursachen der einzelnen Phänomene und mögliche bestehende Zusammenhänge sind noch offen. Zur Klärung sind verschiedene biochemische Analysen des Holz- und Blattmaterials in Arbeit, konnten jedoch bis zum Zeitpunkt der Fertigstellung der vorliegenden Dissertation noch nicht abgeschlossen werden. Der Gehalt an Lignin, Cellulose und Hemicellulose im Holz gibt Aufschluss über die Holzzusammensetzung und wird zeigen, ob die höhere Produktivität der nicht Isopren emittierenden Pflanzen eventuell Auswirkungen auf die Holzqualität hat. Die chemische Zusammensetzung der Blätter, insbesondere der Gehalt und die Zusammensetzung phenolischer Substanzen, könnte die Ursache für die unterschiedlichen Resistenzen gegen Pilz- (Bailey et al. 2005) und Käferbefall (Gruppe et al. 1999) klären.



Abbildung 12: *Phratora vitellinae* (Kleiner Weidenblattkäfer) auf *Populus x canescens* (Graupappel). Das erste Bild zeigt Käfer und Lochfraßspuren im Mai 2007. Im zweiten Bild wird deutlich, dass die jungen Blätter im oberen Bereich der Triebe bevorzugt werden (Aufnahme im Mai 2007). Bild drei zeigt ein männliches (braun-grüne Färbung) und ein weibliches (blau-grüne Färbung) Tier, sowie die netzartigen Fraßspuren der Larven, welche sich auf der Blattunterseite befinden (Aufnahme im Juli 2007).

5 ZUSAMMENFASSENDE SCHLUSSFOLGERUNG & AUSBLICK

In den bisherigen Arbeiten wurde die Funktion der Isoprenemission studiert, indem entweder nicht Isopren emittierende Pflanzen exogen mit Isopren begast wurden (e.g. Singaas et al. 1997), oder indem die Isoprenemission enzymatisch gehemmt wurde (e.g. Sharkey et al. 2001). Beide Methoden sind nicht unproblematisch und die damit gewonnenen Rückschlüsse aus diesen Studien kritisch zu betrachten. In der Publikation I (Behnke et al. 2007) ist ein neuer Ansatz beschrieben worden. Mit der RNAi-Technik ist es erfolgreich gelungen, die Isoprenbiosynthese in *Populus x canescens* effektiv und stabil zu unterdrücken. Mit den gentechnisch veränderten Pappeln gelang zum ersten Mal der molekularbiologische Beweis für die von Isopren vermittelte Thermotoleranz während fluktuierender Blatttemperatur (Publikation I, Behnke et al. 2007). Der Mechanismus für die erhöhte Thermotoleranz stand nicht primär im Fokus dieses Versuchs. Es wurde aber deutlich, dass Isopren speziell die Chloroplastenmembran schützt. Loivamäki (2009) konnte weiterführend zeigen, dass die Temperatursensitivität der nicht Isopren emittierenden Pappeln noch verstärkt ist, wenn Lichtflecken (parallel fluktuierende Blatttemperatur und Lichtintensität) appliziert werden. In der gleichen Arbeit konnte aber auch gezeigt werden, dass nicht alle Pflanzen während Lichtflecken von Isopren profitieren. Transgene Isopren emittierende *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen, natürlicherweise nicht Isopren emittierend, sind auch ohne Isopren ausreichend thermotolerant und zeigten keine Beeinträchtigung der Photosynthese während der Lichtfleckensimulation. Im Gegensatz hierzu demonstrierten Sasaki et al. (2007) eine durch Isopren vermittelte Thermotoleranz in *A. thaliana*, jedoch bei viel höheren Temperaturen (60°C im Vergleich zu 45°C in Loivamäki 2009), so dass ein direkter Vergleich nicht möglich ist. Um die Ursachen für die konträren Beobachtungen zu klären, bedarf es weiterer Versuche. Dennoch ist klar, dass nicht Isopren emittierende Pflanzen vermutlich andere Mechanismen zur Thermotoleranz entwickelt haben und nur bedingt von Isopren profitieren.

Mit einem zweiten Versuch wurde die Ozontoleranz von Isopren emittierenden und nicht Isopren emittierenden Pappeln getestet (Publikation II, Behnke et al. 2009a). Der Versuch lieferte zunächst sehr unerwartete Ergebnisse. Es stellte sich heraus, dass die nicht Isopren emittierenden Pappeln ozontoleranter waren im Vergleich zum WT. Analysen von verschiedenen Komponenten des antioxidativen Systems ergaben, dass die Herunterregulation der Isoprenbiosynthese die Hochregulation von mehreren Antioxidantien (Ascorbat, α -Tocopherol und Zeaxanthin) zur Folge hatte. Vermutlich war die Hochregulation des antioxidativen Systems eine Art Kompensation für das Fehlen von

Isopren und stellte einen optimierten Schutz gegen erhöhte Ozonkonzentrationen dar. Dieser Versuch konnte indirekt die antioxidativen Eigenschaften von Isopren bestätigen. Gleichzeitig wurde aber auch deutlich, dass das gentechnische Abschalten der Isoprenemission umfassende Veränderungen in den Pflanzen bewirkte. Vickers et al. (2009) untersuchten die Rolle von Isopren in der Ozontoleranz mit dem gegenteiligen experimentellen Ansatz, indem sie Isoprenemission in Tabakpflanzen induzierten. Im Gegensatz zu transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen (Loivamäki et al. 2007, Loivamäki 2009, Sasaki et al. 2007) sind die Isoprenemissionsraten der transgenen Tabakpflanzen vergleichbar zu natürlichen Isoprenemittern. Mit diesen transgenen Tabakpflanzen konnten Vickers et al. (2009) zeigen, dass Isopren Ozon-induzierten oxidativen Stress abmildert. Die antioxidativen Eigenschaften von Isopren konnten in der Publikation III (Behnke et al. 2009b) noch etwas genauer beschrieben werden. Es zeigte sich, dass Isopren speziell unter Bedingungen, welche hohe Isoprenemissionsraten hervorrufen (hohe Temperatur in Kombination mit hoher Lichtintensität), die Akkumulation von ROS verhindert. Die Kombination von hoher Temperatur mit hoher Lichtintensität spiegelt die Eigenschaften von Lichtflecken wider, für welche Isopren einen spezialisierten Schutzmechanismus darstellt (Sharkey et al. 2001, Loivamäki 2009). Auch in der Arbeit von Vickers et al. (2009) akkumulierte stressinduziert weniger H₂O₂ in Isopren emittierenden Pflanzen.

Zusammenfassend konnten die Publikationen I und II (Behnke et al. 2007, 2009a) sowie die Arbeiten von Loivamäki (2009) und Vickers et al. (2009) zeigen, dass transgene Ansätze bzw. Methoden – genetische Repression oder Induktion der Isoprenemission – erfolgreich die diskutierten Funktionen der Isoprenemission nachweisen konnten. Dennoch zeigten sich auch mögliche Probleme der Arbeit mit transgenen Pflanzen. Die Ergebnisse der Ozonversuche deuteten schon an, dass die genetische Manipulation nicht nur die Isoprenbiosynthese unterdrückt, sondern weitreichendere Auswirkungen auf die Physiologie der Pflanzen hat. Mit der umfassenden Charakterisierung der *Pc/SPS-RNAi*-Pflanzen stellte sich heraus, dass das dauerhafte Abschalten der Isoprenemission eine Umstellung des Stoffwechsels und damit einen neuen Chemotyp bewirkte (Publikation III, Behnke et al. 2009b). Diese umfassenden Konsequenzen konnten nur mit den systembiologischen Methoden der Transkriptom- und Metabolomanalyse erfasst werden. Auf diesem Weg ließen sich auch vorher nicht in Betracht gezogene Aspekte im Zusammenhang mit Isopren aufdecken. So hatte Isopren als ROS-Fänger einen Einfluss auf die Regulation des Aromatenstoffwechsels, welcher über ROS-abhängige Signalkaskaden reguliert wird (Vanderauwera et al. 2005). Ob der veränderte Chemotyp Konsequenzen auf den Phänotyp hat, soll mit weiterführenden Experimenten (z.B. UV-Behandlung) untersucht werden. Mit den systembiologischen Analysen wurde deutlich,

dass Isopren, wie andere Antioxidantien, auch an der Kontrolle des Redoxzustandes der Zelle beteiligt ist, welcher verschiedenste physiologische Prozesse reguliert (Foyer & Noctor 2005). Die detaillierten Zusammenhänge bzw. die genaue Rolle von Isopren in diesem sehr komplexen Netzwerk ist eine spannende Frage, die es zukünftig zu klären gilt.

Mit der abschließenden Studie in Göttingen wurde die Relevanz der mit Laborversuchen nachgewiesenen Funktionen der Isoprenemission (Publikation I und II) unter Freilandbedingungen getestet und die Auswirkungen der beobachteten Stoffwechselverschiebungen (Publikation II und III) auf das Verhalten der Pflanzen analysiert. Die Photosynthesemessungen zeigten, dass die nicht Isopren emittierenden Pflanzen weniger CO₂ assimilierten. Die Isoprenemission bedeutet für die Pflanze Verluste des photosynthetisch fixierten Kohlenstoffs von bis zu 15-20% (Sharkey et al. 1996, Brüggemann & Schnitzler 2002). Diese Ausgaben fallen in den nicht Isopren emittierenden Pappeln weg. Die Verringerung der Assimilation könnte zeigen, dass die Photosynthese an den Bedarf der Pflanze an fixiertem Kohlenstoff für den Verbrauch in verschiedenen Prozessen angepasst wird. In der Tat konnten verschiedene Studien zeigen, dass die Genexpression von Photosyntheseenzymen/-proteinen (Pego et al. 2000) und auch die Photosyntheseaktivität (Goldschmidt & Huber 1992, McCormick et al. 2008) negativ mit der Konzentration an Kohlenhydraten korreliert. Andererseits könnte es sein, dass der für Isopren vorgesehene Kohlenstoff anderweitig investiert wird in z.B. erhöhtes Wachstum, wie es auch in der Freilandstudie beobachtet wurde. Natürlich haben auch phytopathogene Pilze und herbivore Insekten einen wesentlichen Einfluss auf das Wachstum der Pflanzen. Deshalb ist es wichtig, dass zukünftig die beobachteten unterschiedlichen Pflanze-Pilz/Insekt-Interaktionen genauer charakterisiert werden und die Rolle von Isopren in diesem Zusammenspiel aufgeklärt wird.

Obwohl noch einige wichtige Details ungeklärt sind, lässt sich dennoch zusammenfassend sagen, dass während der zweijährigen Studie der Wegfall der Isoprenemission allgemein gesehen keine negativen Konsequenzen auf Pflanzenfitness und Wachstum hatte. Die Möglichkeit, nicht Isopren emittierende Pappeln zur Produktion von Biomasse nutzen zu können, ist ein sehr lohnendes Ziel, wenn man bedenkt, dass der zukünftig verstärkte Anbau von Pappelplantagen regionale Isopren-Flussdichten und damit Ozonbelastung und Klima beeinflusst.

6 LITERATUR

- Adam P, Hecht S, Eisenreich W, Kaiser J, Gräwert T, Arigoni D, Bacher A, Rohdich F** (2002) Biosynthesis of terpenes: Studies on 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphate reductase. *PNAS* **99**: 12108-12113
- Affek HP, Yakir D** (2002) Protection by isoprene against singlet oxygen in leaves. *Plant Physiol* **129**: 269-277
- Affek HP, Yakir D** (2003) Natural abundance carbon isotope composition of isoprene reflects incomplete coupling between isoprene synthesis and photosynthetic carbon flow. *Plant Physiol* **131**: 1727-1736
- Andersson A, Keskitalo J, Sjödin A, Bhalerao R, Sterky F, Wissel K, Tandre K, Aspeborg H, Moyle R, Ohmiya Y, Bhalerao R, Brunner A, Gustafsson P, Karlsson J, Lundeberg J, Nilsson O, Sandberg G, Strauss S, Sundberg B, Uhlen M, Jansson S, Nilsson P** (2004) A transcriptional timetable of autumn senescence. *Genome Biol* **5**: R24
- Arimura G, Kost C, Boland W** (2005) Herbivore-induced, indirect plant defences. *Biochim Biophys Acta* **1734**: 91-111
- Atkinson R** (1997) Gas-phase tropospheric chemistry of volatile organic compounds: 1. Alkanes and alkenes. *J Phys Chem Ref Data* **26**: 215- 290
- Azaiez A, Boyle B, Levée V, Séquin A** (2009) Transcriptome profiling in hybrid poplar following interactions with *Melampsora* rust fungi. *Mol Plant Microbe Interact* **22**: 190-200.
- Bailey JK, Deckert R, Schweitzer JA, Rehill BJ, Lindroth RL, Keim P, Whitham TG** (2005) Host-plant genetics affect hidden ecological players: linking among *Populus*, condensed tannins and fungal endophyte infection. *Can J Bot* **83**: 356-362
- Barta C, Loreto F** (2006) The relationship between the methyl-erythritol phosphate pathway leading to emission of volatile isoprenoids and abscisic acid content in leaves. *Plant Physiol* **141**: 1676-83

- Beauchamp J, Wisthaler A, Hansel A, Kleist E, Miebach M, Niinemets U, Schurr U, Wildt J** (2005) Ozone induced emissions of biogenic VOC from tobacco: relationships between ozone uptake and emission of LOX products. *Plant Cell Environ* **28**: 1334-1343
- Behnke K, Ehling B, Teuber M, Bauerfeind M, Louis S, Hänsch R, Polle A, Bohlmann J, Schnitzler J-P** (2007) Transgenic, non-isoprene emitting poplars don't like it hot. *Plant J* **51**: 485-499
- Behnke K, Kaiser A, Zimmer I, Brüggemann N, Janz D, Polle A, Hampp R, Hänsch R, Popko J, Schmitt-Kopplin P, Ehling B, Rennenberg H, Barta C, Loreto F, Schnitzler J-P** (2009b) Metabolome and transcriptome analyses of *Populus x canescens* knocked-down in isoprene emission identifies a new phenol(l)type. *submitted*
- Behnke K, Kleist E, Uerlings R, Wildt J, Rennenberg H, Schnitzler J-P** (2009a) RNAi mediated suppression of isoprene biosynthesis impacts ozone tolerance. *Tree Physiol* **29**: 725-736
- Bevan M** (1984) Binary *Agrobacterium* vectors for plants transformation. *Nucleic Acid Res* **12**: 8711-8721
- Bilger W, Rolland M, Nybakken L** (2007) UV screening in higher plants induced by low temperature in the absence of UV-B radiation. *Photochem Photobiol Sci* **6**: 190-195
- Bohlmann J, Meyer-Gauen G, Croteau R** (1998) Plant terpenoid synthases: Molecular biology and phylogenetic analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 4126-4133
- Brilli F, Barta C, Fortunati A, Lerdau M, Loreto F, Centritto M** (2007) Response of isoprene emission and carbon metabolism to drought in white poplar (*Populus alba*) saplings. *New Phytol* **175**: 244-254
- Brüggemann N, Schnitzler J-P** (2002) Comparison of isoprene emission, intercellular isoprene concentration and photosynthetic performance in water-limited oak (*Quercus pubescens* Willd. and *Quercus robur* L.) saplings. *Plant Biol* **4**: 456-463
- Carretero-Paulet L, Ahumada I, Cunillera N, Rodríguez-Concepción M, Ferrer A, Boronat A, Campos N** (2002) Expression and molecular analysis of the *Arabidopsis* DXR gene encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate

reductoisomerase, the first committed enzyme of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway. *Plant Physiol* **129**: 1581-1591

Carretero-Paulet L, Cairó A, Botella-Pavía P, Besumbes O, Campos N, Boronat A, Rodríguez-Concepción M (2006) Enhanced flux through the methylerythritol 4-phosphate pathway in *Arabidopsis* plants overexpressing deoxyxylulose 5-phosphate reductoisomerase. *Plant Mol Biol* **62**: 683-695

Christie PJ, Alfenito MR, Walbot V (1994) Impact of low-temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways: Enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings. *Planta* **194**: 541-549

Claeys M, Graham B, Vas G, Wang W, Vermeylen R, Pashynska V, Cafmeyer J, Guyon P, Andreae MO, Artaxo P, Maenhaut W (2004) Formation of secondary organic aerosols through photooxidation of isoprene. *Science* **303**: 1173-1176

Croft KPC, Jüttner F, Slusarenko AJ (1993) Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. *Plant Physiol* **101**: 13-24

Croteau R (1987) Biosynthesis and catabolism of monoterpenoids. *Chem Rev* **87**: 929-954

Dela G, Or E, Ovadia R, Nissim-Levi A, Weiss D, Oren-Shamir M (2003) Changes in anthocyanin concentration and composition in 'Jaguar' rose flower due to transient high-temperature conditions. *Plant Sci* **164**: 333-340

Depicker A, van Montagu M (1997) Post-transcriptional gene silencing in plants. *Curr Opin Cell Biol* **9**: 373-382

Estévez JM, Cantero A, Reindl A, Reichler S, Leon P (2001) 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphatase, a rate limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants. *J Biol Chem* **276**: 22901-22909

Fares S, Loreto F, Kleist E, Wildt J (2008) Stomatal uptake and stomatal deposition of ozone in isoprene and monoterpene emitting plants. *Plant Biol* **10**: 44-54

Feussner I, Wasternack C (2002) The lipoxygenase pathway. *Annu Rev Plant Biol* **53**: 275-297

Flügge U-I, Gao W (2004) Transport of isoprenoid intermediates across chloroplast envelope membranes. *Plant Biol* **7**: 91-97

- Foyer CH, Noctor G** (2005) Redox homeostasis and antioxidant signalling: A metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* **17**: 1866-1875
- Goldschmidt EE, Huber SC** (1992) Regulation of photosynthesis by end-product accumulation in leaves of plants storing starch, sucrose, and hexose sugars. *Plant Physiol* **99**: 1443-1448
- Gruppe A, Fußeder M, Schopf R** (1999) Short rotation plantations of aspen and balsam poplar on former arable land in germany: Defoliating insects and leaf constituents. *Forest Ecol Manag* **121**: 113-122
- Havaux M, Eymery F, Svetlana P, Rey P, Dörmann P** (2005) Vitamin E protects against photoinhibition and photooxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **17**: 3451-3469
- Havaux M, Niyogi KK** (1999) The violaxanthin cycle protects plants from photooxidative damage by more than one mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 8762-8767
- Heiden AC, Kobel K, Langebartels C, Schuh-Thomas G, Wildt J** (2003) Emissions of volatile organic compounds from plants. Part I: Emissions from lipoxygenase activity. *J Atmos Chem* **45**: 143-172
- Hohmann S, Bell W, Neves AMJ, Valckx D, Thevelein JM** (1996) Evidence for trehalose-6-phosphate-dependent and -independent mechanism in the control of sugar influx into yeast glycolysis. *Mol Microbiol* **20**: 981-991
- Karl T, Fall R, Rosenstiel TN, Prazeller P, Larsen B, Seufert G, Lindinger W** (2002) On-line analysis of the ¹³CO₂ labeling of leaf isoprene suggests multiple subcellular origins of isoprene precursors. *Planta* **215**: 894-905
- Keskitalo J, Bergquist G, Gardeström P, Jansson S** (2005) A cellular timetable of autumn senescence. *Plant Physiol* **139**: 1635-1648
- Kesselmeier J, Staudt M** (1999) Biogenic volatile organic compounds: An overview on emission, physiology and ecology. *J Atmos Chem* **33**: 23-88
- Kotak S, Larkindale J, Lee U, von Koskull-Döring P, Vierling E, Scharf KD** (2007) Complexity of the heat stress responses in plants. *Curr Opin Plant Biol* **10**: 310-316

- Kreuzwieser J, Hauberg J, Howell KA, Carroll A, Rennenberg H, Millar AH, Whelan J** (2009) Differential response of gray poplar leaves and roots underpins stress adaptation during hypoxia. *Plant Physiol* **149**: 461-473
- Kuzma J, Fall R** (1993) Leaf isoprene emission rate is dependent on leaf development and the level of isoprene synthase. *Plant Physiol* **101**: 435-440
- Lalitha R, Ramasarma T** (1987) Role of mevalonate-metabolizing enzymes in the biosynthesis of isoprenoid compounds in plants. *J Sci Ind Res* **46**: 386-404
- Langebartels C, Wohlgemuth H, Kschieschan S, Grün S, Sandermann H** (2002) Oxidative burst and cell death in ozone-exposed plants. *Plant Physiol Biochem* **40**: 567-575.
- Laothawornkitkul J, Paul ND, Vickers CE, Possell M, Taylor JE, Mullineaux PM, Hewitt CN** (2008) Isoprene emissions influence herbivore feeding decisions. *Plant Cell Environ* **31**: 1410–1415
- Lehning A, Zimmer I, Steinbrecher R, Brüggemann N, Schnitzler J-P** (1999) Isoprene synthase activity and its relation to isoprene emission in *Quercus robur* L. leaves. *Plant Cell Environ* **22**: 495-504
- Leplé JC, Brasileiro ACM, Michel MF, Delmotte F, Jouanin L** (1992) Transgenic poplars: Expression of chimeric genes using four different constructs. *Plant Cell Rep* **11**: 137-141
- Lerdau M** (2007) Ecology. A positive feedback with negative consequences. *Science* **316**: 212-213
- Leyva A, Jarillo JA, Salinas J, Martinez-Zapater JM** (1995) Low temperature induces the accumulation of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNAs of *Arabidopsis thaliana* in a light-dependent manner. *Plant Physiol* **108**: 39-46
- Lichtenthaler HK** (1999) The 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**: 47-65
- Lichtenthaler HK, Schwender J, Disch A, Rohmer M** (1997) Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. *FEBS Lett* **400**: 271-274

- Lillo C, Lea US, Ruoff P** (2008) Nutrient depletion as a key factor for manipulating gene expression and product formation in different branches of the flavonoid pathway. *Plant Cell Environ* **31**: 587-601
- Lois LM, Rodríguez-Concepción M, Gallego F, Campos N, Boronat A** (2000) Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: regulatory role of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase. *Plant J* **22**: 503-513
- Loivamäki M** (2009) Molecular biological and (eco)physiological studies on isoprene emission in *Arabidopsis* and grey poplar. Dissertation, Forschungszentrum Karlsruhe, 1-122
- Loivamäki M, Gilmer F, Fischbach RJ, Sörgel C, Bachl A, Walter A, Schnitzler J-P** (2007) *Arabidopsis*, a model to study biological functions of isoprene emission? *Plant Physiol* **144**: 1066-1078
- Loivamäki M, Mumm R, Dicke M, Schnitzler J-P** (2008) Isoprene interferes with the attraction of bodyguards by herbaceous plants. *PNAS* **105**: 17430-17435
- Loreto F, Mannozi M, Maris C, Nascetti P, Ferranti F, Pasqualini S** (2001) Ozone quenching properties of isoprene and its antioxidant role in leaves. *Plant Physiol* **126**: 993-1000
- Loreto F, Velikova V** (2001) Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. *Plant Physiol* **127**: 1781-1787
- Luwe MWF, Takahama U, Heber U** (1993) Role of ascorbate in detoxifying ozone in the apoplast of spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaves. *Plant Physiol* **101**: 969-976
- McCormick AJ, Cramer MD, Watt DA** (2008) Regulation of photosynthesis by sugars in sugarcane leaves. *J Plant Physiol* **165**: 1817-1829
- Miller B** (2001) Erstmalige Isolierung eines Isoprensynthase-Gens und heterologe Expression des aus der Pappel stammenden Gens sowie Charakterisierung der Eingangsgene des Mevalonat-unabhängigen Isoprenoidbiosyntheseweges aus dem Cyanobakterium *Synechococcus leopoliensis*. Dissertation, Schriftenreihe des Fraunhofer-Instituts Atmosphärische Umweltforschung **70**

- Monson RK, Jaeger CH, Adams WW, Driggers EM, Silver GM, Fall R** (1992) Relationships among isoprene emission rate, photosynthesis, and isoprene synthase activity as influenced by temperature. *Plant Physiol* **98**: 1175-1180
- Muñoz-Bertomeu J, Arrillaga I, Ros R, Segura J** (2006) Up-regulation of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase enhances production of essential oils in transgenic spike lavender. *Plant Physiol* **142**: 890-900
- Newcombe G** (1996) The specificity of fungal pathogens of *Populus*. In *Biology of Populus and its implications for management and conservation Part I*, Chap 10. Edited by Stettler RF, Bradshaw Jr. HD, Heilman PE, Hinckley TM. NRC Research Press, National Research Council of Canada, Ottawa, Ont., pp 223-246
- Owen SM, Peñuelas J** (2005) Opportunistic emissions of volatile isoprenoids. *Trends Plant Sci* **10**: 420-426
- Page JE, Hause G, Raschke M, Gao W, Schmidt J, Zenk MH, Kutchan TM** (2004) Functional analysis of the final steps of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP) pathway to isoprenoids in plants using virus-induced gene silencing. *Plant Physiol* **134**: 1401-1413
- Pego JV, Kortstee AJ, Huijser C, Smeekens SCM** (2000) Photosynthesis, sugars and the regulation of gene expression. *J Exp Bot* **51**: 407-416
- Peñuelas J, Llusà J, Asensio D, Munné-Bosch S** (2005) Linking isoprene with thermotolerance, antioxidants and monoterpene emissions. *Plant Cell Environ* **28**: 278-286
- Rasmussen RA, Jones CA** (1973) Emission isoprene from leaf discs of *Hamamelis*. *Phytochemistry* **12**: 15-19
- Rohmer M** (2008) From molecular fossils of bacterial hopanoids to the formation of isoprene units: discovery and elucidation of the methylerythritol phosphate pathway. *Lipids* **43**: 1095-1107
- Rohmer M, Knanin M, Simonin P, Sutter P, Sahn H** (1993) Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem J* **295**: 517-524

- Rosenstiel TN, Ebbets AL, Khatri WC, Fall R, Monson RK** (2004) Induction of poplar leaf nitrate reductase: a test of extrachloroplastic control of isoprene emission rate. *Plant Biol* **6**: 12-21
- Rowan DD, Cao M, Lin-Wang K, Cooney JM, Jensen DJ, Austin PT, Hunt MB, Norling C, Hellens RP, Schaffer RJ, Allan AC** (2009) Environmental regulation of leaf colour in red 35S:PAP1 *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* **182**: 102-115
- Sanadze GA** (1957) Emission of organic matters by leaves of *Robinia pseudoacacia* L.. *Sobsh Acad Nauk SSR* **19**: 83
- Sanadze GA** (1969) Light-dependent excretion of molecular isoprene. *Prog Photosyn Res* **2**: 701-706
- Sanadze GA** (1990) The principal scheme of photosynthetic carbon conversion in cells of isoprene releasing plants. *Curr Res Photosynth IV*: 231-237
- Sanadze GA** (2004) Biogenic isoprene (a review). *Russ J Plant Physiol* **51**: 729-741
- Sanadze GA, Dzhaini GI, Tevadze TM** (1972) Incorporation into the isoprene molecule from $^{13}\text{CO}_2$ assimilated during photosynthesis. *Sov Plant Physiol* **19**: 17-20
- Sanadze GA, Kalandaze AN** (1966) Light and temperature curves of the evolution of C_5H_8 . *Soviet Plant Physiol* **13**: 458-461
- Sanadze GA, Kursanov AL** (1966) On certain conditions of the evolution of the diene C_5H_8 from poplar leaves. *Sov Plant Physiol* **13**: 184-189
- Sandermann H** (2008) Ecotoxicology of ozone: Bioactivation of extracellular ascorbate. *Biochem Biophys Res Commun* **366**: 271-274
- Sasaki K, Saito T, Lämsä M, Oksman-Caldentey KM, Suzuki M, Ohyama K, Muranaka T, Ohara K, Yazaki K** (2007) Plants utilize isoprene emission as a thermotolerance mechanism. *Plant Cell Physiol* **48**: 1254-1262
- Schmitt-Kopplin P, Hertkorn N** (2007) Ultrahigh resolution mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* **389**: 1309-1310
- Schnitzler J-P, Arenz R, Steinbrecher R, Lehning A** (1996) Characterization of an isoprene synthase from leaves of *Quercus petraea* (Mattuschka) Liebl.. *Bot Acta* **109**: 216-221

- Schnitzler J-P, Gras M, Kreuzwieser J, Heizmann U, Rennenberg H, Wisthaler A, Hansel A** (2004) Contribution of different carbon sources to isoprene biosynthesis in poplar leaves. *Plant Physiol* **135**: 152-160
- Schnitzler J-P, Zimmer I, Bachl A, Arend M, Fromm J, Fischbach RJ** (2005) Biochemical properties of isoprene synthase from poplar (*Populus x canescens*). *Planta* **222**: 777-786
- Sharkey TD, Chen X, Yeh S** (2001) Isoprene increases thermotolerance of fosmidomycin-fed leaves. *Plant Physiol* **125**: 2001-2006
- Sharkey TD, Loreto F** (1993) Water stress, temperature and light effects on the capacity for isoprene emission and photosynthesis of kudzu leaves. *Oecologia* **95**: 328-333
- Sharkey TD, Singaas EL** (1995) Why plants emit isoprene. *Nature* **374**: 769
- Sharkey TD, Singaas EL, Vanderveer PJ, Geron C** (1996) Field measurements of isoprene emission from trees in response to temperature and light. *Tree Physiol* **16**: 649-654
- Sharkey TD, Wiberley AE, Donohue AR** (2008) Isoprene emission from plants: why and how. *Ann Bot (Lond)* **101**: 5-18
- Sharkey TD, Yeh S** (2001) Isoprene emission from plants. *Annu Rev Plant Phys Plant Mol Biol* **52**: 407-436
- Sharkey TD, Yeh S, Wiberley AE, Falber TG, Gong D, Fernandez DE** (2005) Evolution of the isoprene biosynthetic pathway in kudzu. *Plant Physiol* **137**: 700-712
- Sheen J** (1990) Metabolic repression of transcription in higher plants. *Plant Cell* **2**: 1027-1038
- Silver GM, Fall R** (1991) Enzymatic synthesis of isoprene from dimethylallyl diphosphate in aspen leaf extracts. *Plant Physiol* **97**: 1588-1591
- Silver GM, Fall R** (1995) Characterization of aspen isoprene synthase, an enzyme responsible for leaf isoprene emission to the atmosphere. *J Biol Chem* **270**: 13010-13016
- Singaas EL, Lerdau M, Winter K, Sharkey TD** (1997) Isoprene increases thermotolerance of isoprene-emitting species. *Plant Physiol* **115**: 1413-1420

- Siwko ME, Marrink SJ, de Vries AH, Kozubek A, Uiterkamp AJMS, Mark A** (2007) Does isoprene protect plant membranes from thermal shock? A molecular dynamics study. *Biochim Biophys Acta* **1768**: 198-206
- Terry GM, Stokes NJ, Hewitt CN, Mansfield TA** (1995) Exposure to isoprene promotes flowering in plants. *J Exp Bot* **46**: 1629-1631
- Teusink B, Walsh MC, van Dam K, Westerhoff HV** (1998) The danger of metabolic pathways with turbo design. *Trends Biochem Sci* **23**: 162-169
- Thompson AM** (1992) The oxidizing capacity of the Earth's atmosphere: probable past and future changes. *Science* **256**: 1157-1165
- Tohge T, Nishiyama Y, Hirai MY, Yano M, Nakajima J-I, Awazuhara M, Inoue E, Takahashi H, Goodenowe DB, Kitayama M, Noji M, Yamazaki M, Saito K** (2005) Functional genomics by integrated analysis of metabolome and transcriptome of Arabidopsis plants over-expressing an MYB transcription factor. *Plant J* **42**: 218-235
- Urban J** (2006) Occurrence, development and economic importance of *Phratora* (= *Phyllodecta*) *vitellinae* (L.) (Coleoptera, Chrysomelidae). *J Forest Sci* **52**: 357-385
- Vanderauwera S, Zimmermann P, Rombauts S, Vandenabeele S, Langebartels C, Gruitsem W, Inzé D, Van Breusegem F** (2005) Genome-wide analysis of hydrogen peroxide-regulated gene expression in Arabidopsis reveals a high light-induced transcriptional cluster involved in anthocyanin biosynthesis. *Plant Physiol* **139**: 806-821
- Velikova V, Loreto F** (2005) On the relationship between isoprene emission and thermotolerance in *Phragmites australis* leaves exposed to high temperatures and during the recovery from a heat stress. *Plant Cell Environ* **28**: 318-327
- Velikova V, Pinelli P, Loreto F** (2005) Consequences of inhibition of isoprene synthesis in *Phragmites australis* leaves exposed to elevated temperatures. *Agric Ecos Environ* **106**: 209-217
- Vickers CE, Possell M, Cojocariu CI, Velikova V, Laothawornkitkul J, Ryan A, Mullineaux PM, Hewitt CN** (2009) Isoprene synthesis protects transgenic tobacco plants from oxidative stress. *Plant Cell Environ* **32**: 520-531

- Wildermuth MC, Fall R** (1998) Biochemical characterization of stromal and thylakoid-bound isoforms of isoprene synthase in willow leaves. *Plant Physiol* **116**: 1111-1123.
- Williams J, Roberts JM, Fehsenfeld FC, Bertman SB, Buhr MP, Goldan PD, Hübler G, Kuster WC, Ryerson TB, Trainer M, Young V** (1997) Regional ozone from biogenic hydrocarbons deduced from airborne measurements of PAN, PPN and MPAN. *Geophys Res Lett* **24**: 1099-1102
- Wesley SV, Helliweill CA, Smith NA, Wang MB, Rouse DT, Liu Q, Gooding PS, Singh SP, Abbott D, Stoutjesdijk PA, Robinson SP, Gleave AP, Green AG, Waterhouse PM** (2001) Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J* **27**: 581-590
- Yu S-M** (1999) Cellular and genetic responses of plants to sugar starvation. *Plant Physiol* **121**: 687-693

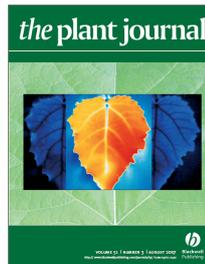
7 PUBLIKATIONEN

Publikation I

BEHNKE K, EHLTING B, TEUBER M, BAUERFEIND M, LOUIS S, HÄNSCH R, POLLE A, BOHLMANN J, SCHNITZLER JP (2007)

Transgenic, non-isoprene emitting poplars don't like it hot.

The Plant Journal **51**: 485-499



Publikation II

BEHNKE K, KLEIST E, UERLINGS R, WILDT J, RENNENBERG H, SCHNITZLER JP (2009)

RNAi-mediated suppression of isoprene biosynthesis in hybrid poplar impacts ozone tolerance.

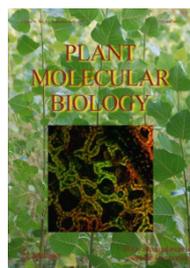
Tree Physiology **29**: 725-736

Publikation III

BEHNKE K, KAISER A, ZIMMER I, BRÜGGEMANN N, JANZ D, POLLE A, HAMPP R, HÄNSCH R, POPKO J, SCHMITT-KOPPLIN P, EHLTING B, RENNENBERG H, BARTA C, LORETO F, SCHNITZLER JP (2010)

RNAi-mediated suppression of isoprene emission in poplar transiently impacts phenolic metabolism under high temperature and high light intensities: a transcriptomic and metabolomic analysis.

Plant Molecular Biology **74**: 61-75



8 DANKSAGUNG

In erster Linie möchte ich der Person danken, welche die Durchführung dieser Arbeit erst ermöglichte, meinem Doktorvater Prof. Dr. Jörg-Peter Schnitzler. Mit seinen kreativen Ideen, wertvollen Ratschlägen und stets viel Freude an der Zusammenarbeit sorgte er für bleibende Motivation und das gute Gelingen.

Hauptsächlich habe ich die Arbeit durchgeführt am Institut für Meteorologie und Klimaforschung, Atmosphärische Umweltforschung des Forschungszentrums Karlsruhe in Garmisch-Partenkirchen. Ich danke Prof. Dr. Wolfgang Seiler und Prof. Dr. Hans-Peter Schmid für die persönliche, materielle und finanzielle Unterstützung am Institut. Mein Dank gilt aber vor allem der gesamten Arbeitsgruppe Schnitzler bzw. meinem nahen persönlichen Umfeld. Sandrine, Maaria, Andrea, Andreas, Astrid, Katja, ganz ganz lieben Dank! Für super Zusammenarbeit, jederzeit Unterstützung, wertvolle Kritik und natürlich auch die unentbehrlichen Kaffee- und Teepausen zwischen all der ganzen Arbeit! Entspannende Abende und gemeinsame Ausflüge machten auch die Zeit neben der Arbeit besonders! Ina und Martina, ohne euch wäre sehr vieles nicht möglich gewesen. Vielen Dank für eure Hilfe bei der Bewältigung von gefühlten Abermillionen Pappeln und Proben!

Mein Dank gilt auch Dr. Jürgen Wildt, Ricarda Uerlings, Dr. Einhard Kleist und weiteren lieben Kollegen am Forschungszentrum Jülich, Institut für Chemie und Dynamik der Geosphäre, ICG-III. Ich werde mich immer gern an meine Zeit bei euch und unsere herzliche Zusammenarbeit erinnern!

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Andrea Polle, Dennis Janz, Sabine Elend, Kristine Kettner, Gisbert Langer und vielen mehr am Institut für Forstbotanik der Universität Göttingen! So oft habt ihr Zeit und Geduld in meine Arbeit investiert! Herzlichen Dank!

Meine Doktorarbeit war Teil der DFG-Forschergruppe „Poplar – A model to address tree specific questions“. Deshalb auch an dieser Stelle vielen Dank an alle für die fruchtbare Zusammenarbeit und Hilfe!

Der größte Dank kommt meiner Familie zu, besonders meinen Eltern. FÜR ALLES!

Garmisch-Partenkirchen, Mai 2009

