

# Untersuchungen von Genexpression und physiologischen Abwehrreaktionen an gesunden und geschädigten Buchen (*Fagus sylvatica* L.)

Fiebelkorn, G., Ernst, D. und Polle, A.

## Zusammenfassung

Die Bildung und Zusammensetzung phenolischer Inhaltsstoffe und Veränderungen in der Genexpression sind Indikatoren für das Abwehrverhalten der Buche gegenüber Pathogenen und biotischem Stress.

Expressionsstudien auf Transkriptebene zeigten in untersuchten Rindenproben von geschädigten Buchen eine Heraufregulierung des pflanzlichen Stressgens *PR1*, wie auch des *ACS2* Gens, das für die Ethylenbildung verantwortlich ist. Enzyme des Shikimatweges wiesen keine deutlichen Veränderungen des Transkriptlevels auf.

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

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

**Schlüsselwörter:** Buche, *Fagus sylvatica*, Genexpression, phenolische Inhaltsstoffe, Sekundärstoffwechsel, Pathogenabwehr

## Analyses of gene expression and physiological defence reactions of healthy and damaged beech (*Fagus sylvatica* L.) trees

### Summary

The production and composition of phenolic compounds in beech bark and differences in gene expression have been used as indicator for the defence reaction of beech to pathogens and biotic stress.

Expression analyses at the transcript level showed an up-regulation of the *PR1* gene as well as of the *ACS2* gene, which is responsible for the production of ethylene. Enzymes of the shikimate pathway showed no significant differences in gene expression.

Analyses of phenolic compounds in bark using HPLC showed no differences in their total content but in the composition of individual phenolic metabolites such as an accumulation of catechine in affected trees.

Altogether, individual beech showed quite variable responses, probably depending on their individual fitness.

**Keywords:** European beech, *Fagus sylvatica*, gene expression, phenolic compounds, secondary metabolism, pathogen infestation

## Einleitung

Die Buche gehört seit vielen Jahrhunderten aufgrund ihrer guten Anpassungsfähigkeit an das kühlfeuchte Klima und ihrer hohen Konkurrenzkraft zu einer der potentiell dominierenden Baumarten Mitteleuropas (ROLOFF, 1996). Sie reagiert sensibel auf die Belastung durch biotische und abiotische Umwelteinflüsse (ROLOFF, 1996).

Unter natürlichen Bedingungen kann die Buche von den meisten potentiellen Pathogenen nicht befallen werden, da der Baum von Natur aus resistent ist und ein Krankheitsausbruch die Ausnahme darstellt (ELSTNER et al., 1996). Diese Resistenz ist genetisch determiniert und beruht darauf, dass das Pathogen die Buche aufgrund struktureller Eigenschaften nicht als potentiellen Wirt erkennt oder dass die Buche durch präformierte bzw. aktive Abwehrmechanismen, die durch unspezifische Erkennung induziert werden, keine Infektion zulässt (HEITEFUSS, 1997).

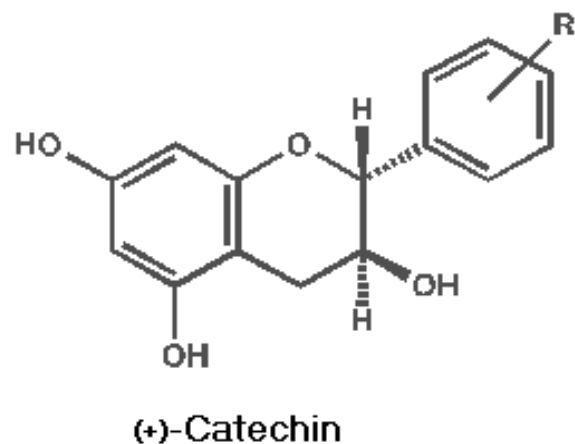
Einzelne Pathogene sind in der Lage die natürlichen Barrieren zu durchbrechen. Die Antwort des Baumes ist die Aktivierung komplexer Resistenzmechanismen. Zum einen reagiert die Buche sehr schnell, indem sie spezielle Signalmoleküle aussendet (PETTERS, 2001), die das Pathogen oder die Eintrittsstelle in der Zellwand erkennen. Zur Abwehr werden phenolische Verbindungen sowohl in der Zellwand als auch in der Vakuole eingelagert.

Phenolische Inhaltsstoffe gehören zu den wichtigsten Stoffgruppen, die an der biochemischen Abwehr von Pathogenen beteiligt sind (ISAAC, 1992) und stellen somit ein Maß für das Abwehrverhalten des Baumes dar. Pflanzenphenole besitzen eine gemeinsame Grundstruktur: ein aromatischer Ring mit Hydroxylgruppen oder abgeleiteten Derivaten (HARBORNE, 1980), die meist in Verbindung mit Zuckern, Säuren oder als Oligo- und Polymere vorliegen (FRIEND, 1985).

Zu den wichtigsten Vertretern der Catechine oder den monomeren Flavan-3-olen gehören das Diastereomerenpaar (+)-Catechin und (-)-Epicatechin sowie (+)Gallocatechin und (-)-Epigallocatechin. Sie kommen entweder in freier Form, an Gallussäure gebunden sowie als Glykoside vor. Die Synthese

der Anthocyane, der Flavan-3-ole und der Proanthocyanidine ist bisher im Detail noch nicht geklärt (FORKMANN, 1993). Nach Erkenntnissen von XIE et al. (2003) wird das Epicatechin durch das Enzym Anthocyanidinreduktase gebildet. Catechine besitzen eine astringierende Eigenschaft und besitzen eine hohe Affinität zur Komplexbildung von Proteinen (HAGERMANN & BUTLER, 1981). Dies stellt eine wichtige Funktion zum Schutz gegen eindringende Mikroorganismen dar. Des Weiteren postulieren MORNAU und TREUTTER (2003), dass oligomere Flavanole die Fähigkeit besitzen, Enzyme zu inhibieren (GOLDSTEIN & SWAIN, 1965) und eine Veränderung von pilzlichen Enzymen hervorzurufen (SALUNKHE et al., 1990).

Eine weitere Abwehrreaktion stellt die Veränderung in der Genaktivität dar, dabei werden z.B. sog. PR-Gene (**pathogenesis related genes**) induziert, die PR-Proteine synthetisieren. PR-Proteine werden erst unter Stresseinwirkung im Baum akkumuliert und hemmen u.a. Pilzwachstum. Des Weiteren werden Veränderungen des Stoffwechselweges des Shikimatwegs beobachtet (MARTIN, 2005). Der Shikimatweg ist ein in Pflanzen und Mikroorganismen vorkommender Biosyntheseweg für aromatische Verbindungen und stellt ein Bindeglied zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel dar. Die Regulierung der Genexpression dieses Synthesewe-



**Abb. 1: Chemische Struktur des Catechins.**  
Fig. 1: Chemical structure of catechine.

ges sagt, wie auch die Bildung von phenolischen Substanzen, etwas über das Abwehrverhalten der Buche gegenüber Pathogenen und biotischem Stress aus.

Um Einblicke in das individuelle Abwehrverhalten gegenüber Umweltfaktoren und Pathogeninfektion zu erhalten, wurden Buchen mit unterschiedlichen Schadsymptomen untersucht. Dabei sollten durch Bestimmung von Transkriptmengen mögliche Veränderungen im Shikimatweg erfasst werden. Phenolische Inhaltsstoffe wurden in der Buchenrinde mittels HPLC-Analytik näher untersucht. Zielsetzung dieser Analysen war es, über die Ermittlung der löslichen phenolischen Verbindungen einen detaillierten Einblick in die Verteilung der einzelnen Phenolsäuren in der Buchenrinde zu erlangen. Die befallenen Proben wurden mit Probenmaterial gesunder Buchen verglichen und Unterschiede der phenolischen Zusammensetzung aufgezeigt und weiter diskutiert, um die Rolle des Sekundärmetabolismus für das Pathogenabwehrverhalten der Buche besser zu verstehen.

## Methoden

In einem Paarversuch wurden *Trypodendron*-befallene und unbefallene Buchen Mitte Juli 2003 in Rheinland-Pfalz, Forstamt Saarburg (Abt. 147a, Revier Kling) für die Untersuchungen beprobt. Dazu wurde Rindenmaterial eines geschädigten Baumes entnommen und sofort auf Eis gelagert. In unmittelbarer Nachbarschaft wurde ein gesund erscheinender Baum als dazugehörige Kontrolle beprobt. Nach der Probennahme wurde das Material auf Trockeneis gelagert, nach Göttingen transportiert und unmittelbar bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Die Weiterbehandlung erfolgte unter flüssiger Stickstoffkühlung. Dazu wurde das Rindenmaterial zu einem feinen Pulver gemahlen.

Für Expressionsstudien auf Transkriptebene wurde mit extrahierter RNA aus Buchenrinde gearbeitet. Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von CHANG et al. (1993). Die Quantifizierung und Beurteilung der Reinheit der präparierten RNA erfolgte durch photometrische Messung. Weiter wurde die Qualität

der extrahierten RNA durch Darstellung in einem Agarosegel überprüft. Nach Synthese der cDNA konnte diese als Ausgangsprodukt in der real-time-PCR verwendet werden. Neun Transkripte wurden über real-time-PCR erfasst: *PRI* (Pathogenesis Related) – Gen (pflanzliches Stressgen), *DAHPS* (3-Deoxy-D-arabino-heptulosonat-7-phosphat-Synthase), *DQS* (Dehydroquinat-Synthase), *DQD* (Dehydroquinat-Dehydratase), *SK* (Shikimatkinase), *EPSPS* (5-Enolpyruvyl-shikimat-3-phosphat Synthase), *CS* (Chorismatsynthase), *CM* (Chorismatmutase) und *ACS2* (1-Aminocyclopropan-1-carboxylsäure Synthase). Die real-time-PCR-Analysen wurden mit dem Perkin Elmer TaqMan 7700 der Fa. AppliedBiosystems durchgeführt. Als Fluorophor kam SYBR-Green (Fa. ABgene, Epsom, UK) zum Einsatz. Alle real-time-Untersuchungen wurden in 96-well Platten in je 25  $\mu\text{l}$  Volumen durchgeführt, wobei 12,5  $\mu\text{l}$  auf SYBR Green Mix, je 0,5  $\mu\text{l}$  auf die Primer, 10,5  $\mu\text{l}$  auf nukleasefreies Wasser und 1  $\mu\text{l}$  auf die cDNA entfielen (nach ABgene Absolute SYBR Green Rox Mixes-Handbook, Epsom, UK).

Das Programm für die real-time-PCR war wie folgt:

Stage I:	Initiierung	2 min bei $50^{\circ}\text{C}$
Stage II:	Aktivierung der TaqPolymerase	15 min bei $95^{\circ}\text{C}$
Stage III:	Denaturierung	15 sec bei $95^{\circ}\text{C}$
	Annealing/Polymerisation	1 min bei $60^{\circ}\text{C}$
	(Stage III 40 Zyklen)	

Zur Verwendung der Proben in die HPLC-Analytik wurden die gefrorenen Rindenstücke unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver gemahlen und je 200 mg zur Methanolextraktion eingesetzt. Dazu wurden die Proben mit 5 ml 50 % aq Methanol 1 h bei  $40^{\circ}\text{C}$  im Ultraschallwasserbad inkubiert, anschließend 10 min (4.500 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$ ) zentrifugiert und erneut mit 2 ml 50 % aq Methanol für 10 min bei RT im Dunkeln extrahiert. Die Extrakte wurden vereinigt, filtriert (Fa. Schleicher & Schuell, Durchmesser 55 mm) und direkt für die HPLC-Analytik eingesetzt.

Zur Bestimmung der löslichen Phenolgehalte in Buchenrinde wurde ein Hochleistungsflüssig-

keitschromatograph, bestehend aus einem binären Pumpensystem, automatischem Probengeber, heizbarem Säulenraum, Dioden-Array-Detektor (DAD) und einem Auswertesystem (Gold Nouveau Chromatography Data System, Version 1.7) eingesetzt. Die Auftrennung der Sekundärmetabolite erfolgte über eine "reversed phase" 18-Säule (5 µm, 250 x 4,6 mm, Ultrasphere, Beckmann, München).

Die aufgearbeiteten Proben wurden in HPLC-Gefäße pipettiert. 20 µl der Probe wurden auf die Säule injiziert und mit einer Flussrate von 1 ml/min mittels Zweischrittgradienten eluiert (nach SCHÜTZENDÜBEL, 2000):

Laufmittelgradient:

Laufzeit (min): Laufmittel B (in %): Gradientenprofil:

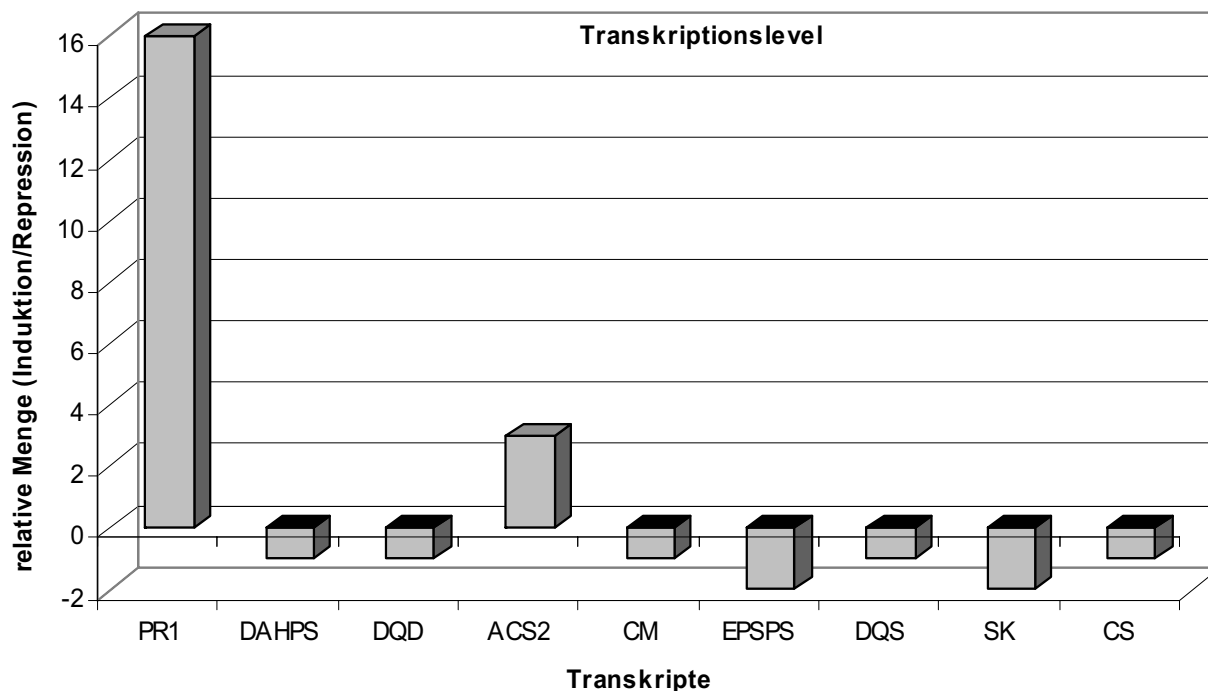
Laufzeit (min)	Laufmittel B (in %)	Gradientenprofil
0 – 1	10	isokratisch
1,0 – 46,0	10 → 60	linear
46,0 – 56,0	60 → 100	linear
56,0 – 59,0	100 → 10	linear
59,0 – 60,0	10	isokratisch

Die eingesetzten Laufmittel (A: H<sub>2</sub>O mit 1,5 %iger Phosphorsäure, pH 2,5 und B: H<sub>2</sub>O/Methanol/Acetonitril (1:1:1), pH 2,5) wurden zuvor filtriert

(Fa. Sartorius, Durchmesser 0,45 µm) und 30 min im Ultraschallbad (Fa. Bandelin, Sonorex Super RK) entgast.

Die Detektion erfolgte bei 280 nm. Es wurden folgende Substanzen als Standards verwendet: 4-Hydroxybenzoesäure, Ferulasäure, Zimtsäure, Chlorogensäure, Catechin, ρ-Cumarsäure und 3,4-Dihydroxybenzoesäure, von denen je 4 Referenz-Stammlösungen mit Konzentrationen von 0,01 mM, 0,05 mM, 0,08 mM und 0,1 mM eingesetzt wurden. Die Identifizierung der Einzelstoffe erfolgte durch den Vergleich der Retentionszeiten der zu analysierenden Substanzen in der Probe mit denjenigen der Referenzsubstanzen. Die quantitative Bestimmung erfolgte nach der Methode des externen Standards durch Integration der Peakflächen. Von jeder Probe wurden drei Messwiederholungen durchgeführt, wobei jeweils ein Durchgang mit internem Standardgemisch aller zu analysierenden Substanzen durchgeführt wurde.

Die Datenbe- und -verarbeitung erfolgte in dem Programm Excel. Zur weiteren Auswertung der Ergebnisse wurde mit den Mittelwerten gearbeitet. Zur Quantifizierung wurden anhand der Refe-



**Abb. 2: Veränderung der über real-time-PCR erfassten Transkriptmengen in Rindenproben aus geschädigten Bäumen gegenüber denen aus gesunden Bäumen von *Fagus sylvatica*.**

Fig. 2: Changes in transcript levels in bark of injured compared with healthy beech trees (*Fagus sylvatica* L.).

renzchromatogramme einfache lineare Regressionsgleichungen berechnet.

### Ergebnisse

Die real-time-PCR-Untersuchungen zeigten, dass das Transkript *PRI*, ein Marker für die Aktivierung der Pathogenabwehr, in Proben der geschädigten Bäume gegenüber gesunden Bäumen 16fach hochreguliert war (Abb. 2). In denselben Proben wurde eine dreifache Hochregulierung des *ACS2* Transkripts beobachtet (Abb. 2). Die übrigen sechs untersuchten Gene des Shikimatstoffwechselweges wiesen keine signifikante Veränderung auf.

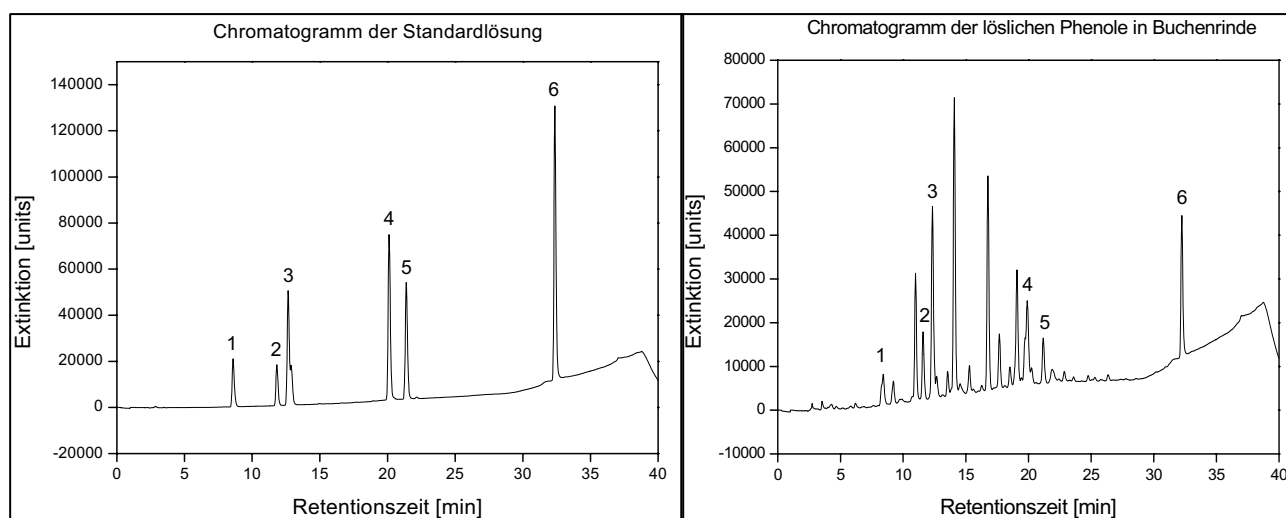
Um die phenolischen Inhaltsstoffe in Rindenproben zu quantifizieren, wurden die Absorptionsspektren der HPLC-Analysen ausgewertet. Abbildung 3 zeigt ein Spektrum der löslichen Phenole in der Rinde einer geschädigten Buche im Vergleich zu Referenzproben. 1= 3,4-Dihydroxybenzoesäure, 2= Catechin, 3= Chlorogensäure, 4= Cumarsäure, 5= Ferulasäure, 6= Zimtsäure

In den Buchenproben konnten fünf Peaks des Chromatogramms aufgrund der Übereinstimmung mit Referenzverbindungen identifiziert werden. Die phenolischen Hauptkomponenten in den untersuchten Rindenproben waren Catechin, Chlorogensäure und Cumarsäure (Tab. 1). Vereinzelt konnte auch

Ferulasäure (Tab. 1) und bei einer Kontrolle auch 3,4-Dihydroxybenzoesäure (nicht dargestellt) nachgewiesen werden. Zimtsäure und 4-Hydroxybenzoesäure wurden nicht gefunden. Aufgrund der starken Variabilität wurden weder für einzelne Komponenten noch für die Gesamtheit aller Peaks signifikante Unterschiede zwischen den geschädigten und gesunden Bäumen nachgewiesen. Wurde jedoch das Baumpaar 46/45, das auch für den scheinbar gesunden Baum sehr hohe Catechinwerte aufwies, aus der Analyse ausgeschlossen, zeigte Catechin mit  $p = 0,0014$  signifikant erhöhte Spiegel in kranken gegenüber gesunden Bäumen.

### Diskussion

Die real-time-PCR-Untersuchungen zeigten, dass der Marker für die Aktivierung der Pathogenabwehr, das *PRI* Transkript, 16fach hochreguliert wurde. Dies ist ein deutlicher Hinweis auf eine hohe Abwehrreaktion der Buche auf Insekten und Pilze. Ebenfalls wurde eine dreifache Hochregulierung der *ACS2* mRNA beobachtet. Dieses Gen spielt eine entscheidende Rolle bei der Synthese von Ethylen. Ethylen, ein Phytohormon, ist der zentrale Regulator von Zelltodprogrammen in Pflanzen, scheint bei Bäumen aber auch eine wachstumsstimulierende Wirkung zu haben (JUNGHANS et al., 2004). Schließlich führen sehr viele biotische und abiotische Stressfaktoren zur Ethylenbildung, wobei die physiologische Wirkung von Stressethylen



**Abb. 3: HPLC-Profil der phenolischen Inhaltsstoffe einer Referenzmischung und eines Extraktes, der aus der Rinde geschädigter Buchen gewonnen wurde.**

Fig. 3: HPLC profile of phenolic compounds of a reference sample and of a bark extract of injured beech trees.

**Tab. 1: Vergleich der normalisierten Peakflächen von phenolischen Inhaltsstoffen aus Rindenextrakten. B = befallen; F = frei von Krankheitssymptomen. Zusammengehörende Baumpaare stehen jeweils untereinander (z.B. 163/167; 10/9; etc.).**

Tab. 1: Comparison of normalised peak areas of phenolic compounds in bark extracts. B = injured beech trees, F = healthy beech trees. Numbers 163/167; 10/9; etc. refer to trees growing next to each other.

Probenname	Peak (Flächeneinheiten *1000/g)				
	Catechin	Cumarsäure	Ferulasäure	Chlorogensäure	Gesamtpeakfläche
163B	8.54	1.12	0.00	7.09	84.95
167F	3.57	0.68	0.00	7.24	36.88
10B	10.22	1.14	0.57	6.02	48.91
9F	1.42	0.00	0.00	2.09	22.83
156B	8.22	0.62	0.00	5.02	50.06
155F	7.22	0.50	0.00	5.31	39.00
200B	5.68	0.76	0.85	5.84	50.58
165F	5.77	0.74	0.71	7.11	47.92
219B	7.79	0.72	0.56	7.38	56.29
221F	4.16	0.94	0.63	7.98	45.22
18B	6.49	0.67	1.31	5.13	50.66
VB F	7.72	1.37	0.00	3.98	39.99
52B	4.99	2.76	0.00	3.46	35.62
44F	3.77	3.48	0.00	3.34	36.03
46B #	4.84 #	2.04	0.66	2.14	28.12
45F #	7.80 #	1.71	0.00	3.35	46.58
60B	6.95	3.59	0.00	2.32	34.42
59F	7.54	4.70	0.62	7.01	36.18
MW +/- SD (B)	7.08+/-1.79	1.49+/-1.07	0.44+/-0.47	4.93+/-1.92	48.85+/-16.50
MW +/- SD (F)	5.44+/-2.31	1.57+/-1.54	0.22+/-0.33	5.27+/-2.15	38.96+/-7.58
P (probability)	0.001	0.295	0.134	0.345	0.151

B - geschädigte Proben  
F - Kontrollen (nicht geschädigt)  
# - Analyse ohne 46B/45F

sehr unterschiedlich sein kann. Ethylen kann in einigen Fällen die Krankheitssymptome verstärken, in anderen abschwächen oder ohne Wirkung bleiben (BLEECKER & KENDE, 2000).

Die übrigen sechs untersuchten Gene wiesen eine schwache Herunterregulierung auf. Diese meist regulatorischen Gene führen zur Bildung von aromatischen Aminosäuren. Diese Aminosäuren nutzen die Pflanzen nicht nur für Proteinbildung, sondern auch als Vorläufer für eine große Anzahl von Sekundärmetaboliten, die wiederum eine Barrierefunktion gegen Pathogene darstellen. Bislang ist über den zeitlichen Verlauf der Abwehr bei der Buche wenig bekannt. Es ist möglich, dass Gene des Shikimatweges nur transient hochreguliert werden,

solange bis genügend Abwehrmetabolite gebildet sind und anschließend wieder auf ihr Basislevel zurückgehen. Eine andere Möglichkeit ist, dass die Neusynthese von diesen Stoffen bei der Buche keine oder nur eine untergeordnete Rolle spielt.

Um dieser Frage nachzugehen, wurden auch die Konzentrationen von Sekundärmetaboliten gemessen. Vergleicht man die Ergebnisse der HPLC Untersuchungen der befallenen Proben mit den Kontrollen (Tab. 1), kann festgestellt werden, dass die befallenen Bäume höhere Werte an Catechin aufweisen als die Kontrollen. Die Ferulasäurewerte lagen bei den befallenen Proben ebenfalls leicht höher als die Kontrollproben. Nicht so die Werte der Chlorogensäure und Cumarsäure, für die ein

höherer Anteil in den Kontrollen zu beobachten war (Tab. 1).

Werden alle Flächeneinheiten aller Peaks phenolischer Inhaltsstoffe der befallenen Proben mit denen der dazugehörigen Kontrollen verglichen, wird nur ein Trend in Richtung erhöhter Phenolgehalte in kranken Bäumen festgestellt. Demnach würde sich nicht der Gesamtphenolgehalt in der Pflanze ändern, sondern das individuelle Konzentrationsspektrum der einzelnen gebildeten Phenole als Reaktion auf Stresseinwirkung.

Die Untersuchungen ergaben, dass sich keine allgemeinen Aussagen bezüglich Veränderungen der phenolischer Inhaltsstoffe aufstellen lassen. Jedes Baumpaar verhielt sich unterschiedlich. Das unterstreicht die Beobachtung, dass die Buche sich individuell unterschiedlich auf Stresseinwirkung verhält. Jeder Pflanze steht ein unterschiedliches Maß an Ressourcen und Energie zur Verfügung, die in Wachstum und in die Pathogenabwehr investiert werden können. Es ist auch nicht auszuschließen, dass auch die scheinbar gesunden Buchen den Befall erfolgreich abgewehrt haben und daher eventuell noch erhöhte Konzentrationen von phenolischen Verbindungen enthalten, wie sich dies für Baumpaar 46/45 abzeichnet. Anatomische Untersuchungen stützen diese Vermutung (s. LANGENFELD-HEYSER et al., 2006a).

Es konnte eine signifikante Akkumulation an Catechin in den befallenen Proben gegenüber den Kontrollen festgestellt werden. Auch WEISS et al. (1997) beobachtete eine Erhöhung von (+)-Catechin- und (-)-Epicatechingehalten in Geweben mykorrhizierter Lärchen, die frei von Pilzhyphen waren, was zur Behauptung führte, dass die Akkumulation der Sekundärmetabolite das Pilzwachstum kontrolliert. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Catechinsynthese eine konstitutive Abwehrreaktion bei der Buche darstellt und so einen Schutz gegen Sekundärinfektion wie Pilzwachstum bietet (LAPLAZE et al., 1999).

## Literatur

- BLEECKER, A.B. und KENDE, H. (2000): Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16: 1-18.
- CHANG, S.; PURYEAR, J. und CAIRNEY, J. (1993): A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol. Biol. Rep.* 11: 113-116.
- ELSTNER, E.F.; OBWALD, W. und SCHNEIDER, I. (1996): *Phytopathologie: Allgemeine und Biochemische Grundlagen*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- FORKMANN, G. (1993): Genetics of flavonoids. In: Harborne J.B. (Hrsg.) *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*, Chapman and Hall, London, 537-564.
- FRIEND, J. (1985): Phenolic substances in plant disease. In: Van Sumere C.F. und Lea P.J. (Hrsg.) *Annu. Proc. Phytochem. Soc. Europe (Vol. 25)*, Calderon Press, Oxford, 367-393.
- GOLDSTEIN, J.L. und SWAIN, T. (1965): The inhibition of enzymes by tannins. *Phytochemistry* 4: 185 - 192.
- HAGERMANN, A.E. und BUTLER, L.G. (1981): The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *Journal of Biological Chemistry* 259 (9): 4494 - 4497.
- HARBORNE, J.B. (1980): Plant Phenolics. In: Bell E.A. und Charlwood B.V. (Hrsg.) *Secondary Plant Products (Vol. 8)*, Springer Verlag, Berlin, 329-402.
- HEITEFUSS, R. (1997): General principles of host-parasite interactions. In: Hartleb H., Heitefuss R., Hoppe H.-H. (Hrsg.) *resistance of crop plants against fungi*. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart, Lübeck, Ulm, 19-32.
- ISAAC, S. (1992): *Fungal-Plant Interactions*. Chapman & Hall, London.
- JUNGHANS, U.; LANGENFELD-HEYSER, R.; POLLE, A. und TEICHMANN, T. (2004): Effect of Auxin Transport Inhibitors and Ethylene on the Wood Anatomy of Poplar. *Plant Biology* 6: 22-29.
- LANGENFELD-HEYSER, R.; LANG, C.; FRITZ, E.; PETERCORD, R. und POLLE, A. (2006a): Stehenbefall von *Fagus sylvatica* L. mit *Trypodendron* – anatomische Untersuchungen. Mitteilungen aus der Forschungsanstalt für Waldökologie und Forstwirtschaft Rheinland-Pfalz, Nr. 59/06, S. 79 - 94
- LAPLAZE, L.; GHERBI, H.; FRUTZ, T.; PAWLOWSKI, K.; FRANCHE, C.; MACHEIX, J.-J.; AUGUY, F.; BOGUSZ, D. und DUHOUX, E. (1999): Flavan-Containing Cells Delimit *Frankia*-Infected Compartments in *Casuarina glauca* Nodules. *Plant Physiology* 121: 113 -122.
- MARTIN, S. (2005): Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen dem Kohlenstoffhaushalt und der Induktion von DAHP Synthesen in *Arabidopsis thaliana* und *Nicotiana tabacum*. Diplomarbeit, Jülich. In: [www.fz-juelich.de](http://www.fz-juelich.de).
- MORNAU, M. und TREUTTER, D. (2003): Veränderte Wundreaktion in der Apfelfrucht durch *Phytophthora*-Exsudate. *Gesunde Pflanzen* 55 (4): 98 -104.
- PETTERS J. (2001): Isolierung und Charakterisierung pathogen- und Stressinduzierter Gene von Kartoffel *Solanum tuberosum* L.. Dissertation, Halle (Saale).
- ROLOFF, A. (1996): Die Buche und ihre Gefährdung durch anthropogene Umwelteinflüsse. In: Abs C. (Hrsg.) *Stiftung*

Wald in Not (Band 8) Buchenwälder – Ihr Schutz und ihre Nutzung, Bonn, 31 – 43.

SALUNKHE, D.K.; CHAVAN, J.K. und KADAM, S.S. (1990): Dietary tannins: consequences and remedies. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida, 131.

SCHÜTZENDÜBEL, A. (2000): Physiologische Reaktionen auf Cd<sup>2+</sup> Stress in nicht mykorrhizierten und mykorrhizierten Wurzeln von Kiefern (*Pinus sylvestris* L.), sowie den mykorrhizabildenden Basidiomyceten *Paxillus involutus* und *Suillus bovinus*. Cuvillier Verlag, Göttingen.

WEISS, M.; MIKOLAJEWSKI, S.; PEIPP, H.; SCHMITT, U.; SCHMIDT, J.; WRAY, V. und STRACK, D. (1997): Tissue-specific and development-dependent accumulation of phenylpropanoids in larch mycorrhizas. *Plant Physiology* 114: 15 -27.

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

## Danksagung

Wir danken Dr. Ralf Petercord für die hervorragende Zusammenarbeit, Gunter Betz für die Überlassung der Primer für die real-time-PCR-Untersuchungen und Evi Bieber für die freundliche Hilfe bei den Expressionsstudien.

Die Untersuchungen wurden unterstützt durch das Interreg III A DeLux – Projekt des Landes Rheinland-Pfalz und Luxemburg.

## Autorenanschriften:

Gerlind Fiebelkorn, Prof. Dr. Andrea Polle  
Institut für Forstbotanik der Georg-August Universität  
Büsgenweg 2, D-37077 Göttingen  
Email: gfiebel1@gwdg.de  
apolle@uni-goettingen.de

Dr. Dieter Ernst  
Institut für Biochemische Pflanzenpathologie  
GSF - Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit  
Ingolstädter Landstrasse 1, D-85764 Neuherberg  
Email:  
ernst@gsf.de