



Bundesamt  
für Strahlenschutz

## **Ressortforschungsberichte zum Strahlenschutz**

Einfluss hochfrequenter elektromagnetischer Felder  
auf Pflanzengesundheit und Wachstum

**Vorhaben 3622EMF404**

Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Institut für Nutzpflanzenwissenschaften und Ressourcenschutz

Crop Functional Genomics - Boron Deficiency

Das Vorhaben wurde im Auftrag des Bundesamtes für Strahlenschutz (BfS) mit Mitteln des Bundesministeriums für Umwelt, Klimaschutz, Naturschutz und nukleare Sicherheit (BMUKN) für Maßnahmen zur Stärkung der Kohleregionen durchgeführt.

Dieser Band enthält einen Ergebnisbericht eines vom Bundesamt für Strahlenschutz im Rahmen der Ressortforschung des BMUKN in Auftrag gegebenen Untersuchungsvorhabens. Verantwortlich für den Inhalt sind allein die Autoren. Das BfS übernimmt keine Gewähr für die Richtigkeit, die Genauigkeit und Vollständigkeit der Angaben sowie die Beachtung privater Rechte Dritter. Der Auftraggeber behält sich alle Rechte vor. Insbesondere darf dieser Bericht nur mit seiner Zustimmung ganz oder teilweise vervielfältigt werden.

Der Bericht gibt die Auffassung und Meinung des Auftragnehmers wieder und muss nicht mit der des BfS übereinstimmen.

## **Impressum**

Bundesamt für Strahlenschutz  
Postfach 10 01 49  
38201 Salzgitter

Tel.: +49 30 18333-0

Fax: +49 30 18333-1885

E-Mail: [ePost@bfs.de](mailto:ePost@bfs.de)

De-Mail: [epost@bfs.de-mail.de](mailto:epost@bfs.de-mail.de)

[www.bfs.de](http://www.bfs.de)

BfS-RESFOR-261/26

Bitte beziehen Sie sich beim Zitieren dieses Dokumentes immer auf folgende URN:

urn:nbn:de:0221-2026060160272

Salzgitter, Juni 2026

## **Inhalt**

Abkürzungen .....	7
Zusammenfassung.....	11
Abstract .....	16
Einleitung und Zielsetzung .....	21
Arbeitspaket 1 Aufarbeitung des relevanten Standes von Wissenschaft und Technik .....	22
1.1. Allgemeines zu AP1 .....	22
1.2. Literaturrecherche .....	22
1.2.1. Literatursuche .....	22
1.2.2. Abgleich mit dem systematischen Review von Karipidis et al., 2023 .....	24
1.2.3. Studien, die in die Ausarbeitung mit aufgenommen wurden .....	25
1.3. Zusammenstellung verwendeter Expositionssysteme.....	30
1.3.1. Prinzipiell geeignete Expositionssysteme .....	30
1.3.1.1. Transversal elektromagnetische (TEM)-Zelle .....	30
1.3.1.2. Gigahertz TEM (GTEM)-Zelle .....	31
1.3.1.3. Modenverwirbelungskammer.....	31
1.3.1.4. Hornantenne im geschirmten Raum .....	32
1.3.1.5. EMF geschirmte Absorberkammer .....	33
1.3.1.6. Freilandversuche oder Freifeld-Versuchsbedingungen .....	33
1.3.2. Prinzipiell ungeeignete Expositionssysteme .....	34
1.4. Effekte von HF-EMF auf Pflanzenwachstum und -gesundheit .....	35
1.4.1. Kalzium und Reaktive Sauerstoffspezies .....	35
1.4.2. DNA-Schäden .....	39
1.4.3. Genexpressionsänderungen .....	40
1.4.4. Einfluss von EMF auf Pflanzenwachstumsparameter .....	43
1.4.5. Photosynthese .....	46
1.4.6. Sekundärmetabolismus .....	49

1.5. Literatursuche zum Abschluss des Projekts (August 2025) .....	50
1.6. Zusammenfassung.....	62
Arbeitspaket 2 Expositionsanlage - Verwirbelungskammer .....	64
2.1. Einleitung und Zielsetzung .....	64
2.1.1. Konzept der Modenverwirbelungskammer.....	64
2.2. Aufbau und Beschreibung der Expositionsanlage.....	66
2.2.1. Aufbau des Abschirmzertes .....	66
2.2.1.1. Material.....	66
2.2.1.2. Dimensionierung.....	67
2.2.2. Equipment zur Felderzeugung und -messung .....	69
2.2.2.1. Signalgenerator .....	69
2.2.2.2. HF-Leistungsverstärker .....	69
2.2.2.3. Sendeantenne .....	70
2.2.2.4. E-Feldsondensystem.....	70
2.2.3. Modenverwirbelung.....	71
2.2.4. Einstellung der Expositionsfeldstärke .....	72
2.2.4.1. Definition der Expositionsfeldstärke.....	72
2.2.4.2. <i>Closed-Loop</i> -Regelung.....	73
2.3. Steuerungssoftware und Bedienkonzept.....	75
2.3.1. Steuerungssoftware .....	75
2.3.1.1. GUI und Funktionsbeschreibung .....	76
2.3.1.2. Fehlerfall.....	77
2.3.1.3. Aufzeichnung und Überwachung relevanter Parameter .....	78
2.4. In-situ Installation und Inbetriebnahme .....	79
2.4.1. Installation in der Pflanzenanzuchtkammer .....	79
2.4.2. Charakterisierung betriebsrelevanter Parameter .....	80
2.4.2.1. Wärmeerzeugung der Geräte innerhalb der Pflanzenanzuchtkammer .	80

2.4.2.2. Schirmdämpfung .....	81
2.4.2.3. Gleichförmigkeit des Feldes .....	83
Arbeitspaket 3 Genexpression in Tomaten .....	85
3.1. Einleitung und Zielsetzung .....	85
3.2. Versuchsdurchführung, Methodik und Ergebnisse .....	86
3.2.1. Modenverwirbelungskammer .....	86
3.2.2. Exposition, Verblindung, und Szenarien .....	86
3.2.3. Tomatenaufzucht .....	87
3.2.4. Durchführung/Probennahme .....	88
3.2.4.1. Akklimatisierung der Pflanzen in der Expositions-kammer .....	88
3.2.4.2. Übersicht über die Beprobung allgemein .....	88
3.2.4.3. Beprobung der unexponierten Kontrolle am Versuchstag .....	89
3.2.4.4. Beprobung nach Exposition oder mechanischem Stress am Versuchstag .....	89
3.2.4.5. Aufbewahrung exponierter und mechanisch gestresster Pflanzen zur weiteren Phänotypisierung .....	90
3.2.4.6. Ausfall Verstärker, Versuchstag = Szenario IV, und Wiederholung von Szenario IV = R_IV .....	90
3.2.5. Transkriptom-Analyse .....	91
3.2.5.1. RNA-Isolation und Qualitätssicherung .....	91
3.2.5.2. Sequenzierung mittels Illumina-Technologie .....	93
3.2.5.3. Bioinformatische Auswertung .....	94
3.2.5.3.1. Mapping auf das Tomaten-Genom .....	97
3.2.5.3.2. Differenzielle Genexpressionsanalyse und Wiederholung Tag IV ...	102
3.2.5.3.3. Zeitverlaufsanalyse mit dem R-Paket MultiRNAFlow .....	111
3.2.5.3.4. Auflösung der Verblindung .....	119
3.2.5.3.5. Darstellung von Schnittmengen mit <i>Upset Plots</i> .....	123

3.2.5.3.6. Gen-Ontologie-Analyse- Differenziell exprimierte Gene aus 3.2.5.3.2 ..	128
3.2.5.3.7. Gen-Ontologie-Analyse für die Zeitverlaufsanalyse (3.2.5.3.3).....	138
3.2.5.3.8. <i>Weighted gene co-expression network analysis</i> (WGCNA) .....	152
3.2.5.4. Biologische Verifizierung über quantitative-Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR).....	164
3.2.6. ATP-Quantifizierung.....	176
3.2.7. Phänotypische Analyse.....	179
Arbeitspaket 4 Systemische Reaktion.....	181
4.1. Einleitung und Zielsetzung .....	181
4.2. Versuchsdurchführung, Methodik, und Ergebnisse.....	181
4.2.1. Versuchsaufbau in AP4 allgemein .....	182
4.2.1.1. Expositions- und Stressszenarien .....	182
4.2.1.2. Chemikalienbehandlung allgemein.....	182
4.2.1.3. Beprobung allgemein.....	183
4.2.2. Modifizierung der Modenverwirbelungskammer.....	184
4.2.2.1. Abtrennung, Exposition, und Schirmung durch <i>MeshArt Soft Silver</i> ...	184
4.2.2.2. Fenster zur Exposition des ersten Blattes .....	186
4.2.2.3. Motorbox und Bewegung der Hinterwand.....	189
4.2.3. Verblindung, und Szenarien.....	189
4.2.4. Tomatenaufzucht .....	190
4.2.5. Chemikalienbehandlung .....	190
4.2.6. Hormonanalysen.....	193
4.2.7. Durchführung und Probennahme.....	194
4.2.7.1. Gesamtexpositions- und Stressszenarien (Szenario 1, 2, 3, 4, 8, 9, 11) ..	194
4.2.7.1.1. Naproxen-Behandlung (ABA-Block).....	194
4.2.7.1.2. LaCl <sub>3</sub> + EGTA-Behandlung (Kalzium-Blocker) .....	195

4.2.7.2.	Einzelblattexpositions- und Stressszenarien (Szenario 5, 6, 7, 10) ....	195
4.2.7.2.1.	Naproxen-Behandlung (ABA-Block).....	196
4.2.7.2.2.	LaCl <sub>3</sub> + EGTA-Behandlung (Kalzium-Blocker) .....	197
4.2.8.	Quantitative Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR).....	197
4.2.9.	Kurzzusammenfassungen der RT-qPCR-Ergebnisse.....	227
4.2.10.	Wiederholung der Transkriptomanalyse .....	234
4.2.11.	Auflösung der Verblindung .....	245
Arbeitspaket 5 Wachstum von Rosen .....		251
5.1.	Einleitung und Zielsetzung .....	251
5.2.	Versuchsdurchführung, Methodik, und Ergebnisse.....	251
5.2.1.	Modenverwirbelungskammer.....	251
5.2.2.	Exposition, Verblindung, und Expositionsszenarien.....	251
5.2.3.	Rosenaufzucht.....	252
5.2.4.	Bewurzelung und Austrieb Hauptspross.....	256
5.2.5.	Temperaturmessung in Erde während verschiedener Expositionen .....	257
5.2.6.	Phänotypisierung und Auswertung des Hauptsprosswachstums.....	258
5.2.7.	Phänotypisierung und Auswertung des Seitenspross-Wachstums .....	262
5.2.8.	Auflösung der Verblindung.....	267
5.3.	Zusammenfassung.....	272
Allgemeine Diskussion .....		275
I.	Konzeptionierung einer Modenverwirbelungskammer innerhalb einer Pflanzenanzuchtkammer .....	275
II.	Auswirkungen von HF-EMF auf das Transkriptom von Tomaten und das Wachstum von Rosen.....	277
Referenzen.....		281

## Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung der Abkürzung
1-ACC	1-Aminocyclopropancarbonsäure
12-OHJA	12-Hydroxy-Jasmonsäure
ABA	Abszisionsäure
ABA-Block	1 mM Naproxen
Abb.	Abbildung
ANOVA	Varianzanalyse („Analysis of variance“)
AP	Arbeitspaket
APX	Ascorbate Peroxidase
ATP	Adenosintriphosphat
BES	<i>N,N</i> -Bis-(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure
bp	Basenpaare
<i>bZIP1</i>	<i>BASIC LEUCINE ZIPPER1</i>
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
ca.	zirka, ungefähr
CAC	<i>Clathrin adaptor complexes medium subunit/Endocytic pathway</i>
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CAT	Katalase
CDPK1	CALCIUM-DEPENDENT PROTEIN KINASE1
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CE EIRP	Effektive isotrope abgestrahlte Leistung, wie durch „The Centers of Excellence“ spezifiziert
CFG	<i>Crop Functional Genomics</i>
CHI	Chalcone Isomerase
CI	<i>Computer Interface</i>
CMBP	CHLOROPLAST mRNA-BINDING PROTEIN
CPM	<i>counts per million</i>
cv	Cultivar
CW	<i>continuous wave</i>
DAC	Tage nach Stecklingsschnitt
DAEE	Tage nach Ende der Exposition
dB	Dezibel
dBm	dB Milliwatt
DC	<i>Direct current</i>
ddNTP	Didesoxynukleotid
DECT	<i>Digital Enhanced Cordless Communication</i>
DEG	differenziell exprimiertes Gen/differenziell exprimierte Gene
DHA	Dehydroascorbinsäure
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
dVG/dto	Anregungsenergie zwischen den Reaktionszentren (Photosynthese-Parameter)

Abkürzung	Bedeutung der Abkürzung
EF1 $\alpha$	<i>Elongation Factor 1<math>\alpha</math></i>
EGTA	Ethylenglycolbis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EMF	elektromagnetische Felder
EMF-r	elektromagnetische Felder Radiofrequenz
EMV	elektromagnetische Verträglichkeit
<i>ERAD</i>	<i>Endoplasmatic reticulum-associated protein degradation</i>
<i>et al.</i>	und andere
etc.	Et cetera
FCC	"Federal Communications Commission" (amerikanische Behörde)
FDR	<i>False discovery rate</i>
FG	Frischgewicht
FLS	Flavonol Synthetase
FTIR	<i>Fourier-Transform Infrared Spectroscopy</i>
FV/FM	Maximale Quantenausbeute des Photosystems II (Photosynthese-Parameter)
Fv/F <sub>o</sub>	Maximale Variabilität der Fluoreszenz von Chlorophyll a / minimale Fluoreszenz von Chlorophyll a (Photosynthese-Parameter)
g	Gramm
GHz	Gigahertz
GO	Genontologie
GPIB	<i>General Purpose Interface Bus</i>
GR	Glutathion Reduktase
GSM	"Global system for mobile communication"
GST	Glutathion-S-Transferase
GTEM	Gigahertz TEM Zelle
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HCPC	Hierarchisches <i>Clustering</i> basierend auf Hauptkomponenten ( <i>Principal Components</i> )
HF	Hochfrequenz
HF-EMF	hochfrequente elektromagnetische Felder
IAA	Indol-3-Essigsäure; Auxin
ICNIRP	<i>International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection</i>
JA	Jasmonsäure
kg	Kilogramm
kHz	Kilohertz
Kalzium-Blocker	1 mM LaCl <sub>3</sub> + 1 mM EGTA
KOH	Kaliumhydroxid
KOM	Kommentar
l	Liter
LaCl <sub>3</sub>	Lanthan(III)-chlorid
L1	Ältestes Tomatenblatt = Blatt 1

Abkürzung	Bedeutung der Abkürzung
L4	Jüngstes Tomatenblatt = Blatt 4
m	Meter
mg	Milligramm
mG	Milligauss
MHz	Megahertz
min	Minuten
ml	Milliliter
mW	Milliwatt
MDA	Malondialdehyd
MDS	multidimensionale Skalierung
ME	Modul-Eigenen
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MSRC	Modenverwirbelungskammer
MVK	Modenverwirbelungskammer
MW	Mikrowellen
n	Probenanzahl
nmol	Nanomol
NaOH	Natriumhydroxid
NERF	<i>nanometric elongation rate fluctuation</i>
NIR	nicht-ionisierende Strahlung
NPQ	Nicht-photochemische Löschung ( <i>non-photochemical quenching</i> )
NSA	<i>normalized site attenuation</i>
PAL	Phenylalanin-Ammoniak-Lyase
PAR	Strahlung im 400 – 700 nm Bereich ( <i>photosynthetic active radiation</i> )
PCA	Hauptkomponentenanalyse ( <i>Principal Component Analysis</i> )
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Zeitpunkt am Tag vor der Exposition
PI	PROTEINASE INHIBITOR II
POD	(Guaiacol) Peroxidase
POX	Peroxidase
PPO	Polyphenol Oxidase
PPX	Pyrogallol
PROC	<i>Proceedings</i>
PSI	<i>photochemical stress index</i>
PWM	<i>Pulse-width modulation</i>
RA	Originalarbeit ( <i>research article</i> )
RBOHF	RESPIRATORY BUSRT OXIDASE HOMOLOG, ISOFORM F
RC/ABS	<i>effective antenna size</i> (Photosynthese-Parameter)
RC/CSO	<i>reaction center density</i> (Photosynthese-Parameter)
REV	Übersichtsarbeit ( <i>Review</i> )
RF	Radiofrequenz
RFID	Funkfrequenz- Identifikation ( <i>Radio frequency identification</i> )
RIN	<i>RNA integrity number</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNA-Seq	RNA-Sequenzierung

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung der Abkürzung</b>
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion
RT-qPCR	Reverse Transkription-quantitative Polymerasekettenreaktion
RWC	Relativer Wassergehalt
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
S/sek	Messergebnisse ( <i>Samples</i> ) pro Sekunde
SA	Salizylsäure
SAR	spezifische Absorptionsrate
SOD	Superoxide Dismutase
SPAD	<i>Soil Plant Analysis Development</i> (Chlorophyllmessgerät; die willkürliche Einheit der Messwerte, wird als SPAD-Einheit bezeichnet)
Sz.	Szenario
t	Zeitpunkt
<i>TB1</i>	<i>teosinte branched 1</i>
<i>TCH1</i>	<i>TOUCH1</i>
TCP	<i>Transmission Control Protocol</i>
TEM	transversal elektromagnetische Zelle
TFIID	Transkriptionsfaktor II D
TG	Trockengewicht
TMM	<i>trimmed mean of M-values</i>
TOM	<i>topological overlap matrices</i>
UMTS	<i>Universal Mobile Telecommunications Service</i>
USB	<i>Universal Serial Bus</i>
V	Volt
VCO	spannungsgesteuerter Oszillator ( <i>Voltage-controlled oscillator</i> )
VDE	<i>VIOLAXANTHIN DE-EPOXIDASE</i>
VIRC	<i>Vibrating intrinsic reverberation chamber</i>
VST	varianzstabilisierende Transformation
VSWR	Stehwellenverhältnis ( <i>voltage standing wave ratio</i> )
W	Watt
WGCNA	<i>weighted gene co-expression network analysis</i>
WiFi	<i>Wireless Fidelity</i>
WLAN	Drahtloses Lokalnnetzwerk ( <i>Wireless Local Area Network</i> )
WT	Wildtyp
ZAT12	<i>ZINK FINGER OF ARABIDOPSIS 12</i>
ZEP	<i>ZEAXANTHIN EPOXIDASE</i>
ΨEO	Quantenausbeute des Elektronentransports in der Elektronenkette (Photosynthese-Parameter)
δRO	Quantenausbeute der Reduktion der Endakzeptoren im Photosystem I (Photosynthese-Parameter)
μW	Mikrowatt

## Zusammenfassung

Eine mögliche Schädigung von Pflanzen durch hochfrequente elektromagnetische Felder (HF-EMF) wird häufig postuliert, allerdings fehlen kontrollierte wissenschaftliche Nachweise. Experimentelle, wissenschaftlich belastbare Laborstudien zu Wirkungen von HF-EMF auf Pflanzen stammen fast ausschließlich von der Arbeitsgruppe Prof. Alain Vian aus Frankreich (Université d'Angers), von denen mehrere im vorliegenden Forschungsvorhaben verifiziert und analysiert werden sollten. Im Speziellen hatte die Arbeitsgruppe Vian bei der Exposition von Tomaten eine erhöhte Expression bestimmter Botenstoffe, sowie Veränderungen im Energiemetabolismus und in der Genexpression von *PROTEINASE INHIBITOR II (PI)* und *BASIC LEUCINE ZIPPER1 (bZIP)* gefunden, die als Stressreaktion gewertet werden können. Im Speziellen erschienen diese Reaktionen durch das Phytohormon Abszisinäure (ABA) und durch Kalzium vermittelt zu sein. Die Reaktionen sind zudem systemisch, was bedeutet, dass die gesamte Pflanze reagiert, auch wenn zum Beispiel nur ein Blatt exponiert wurde. Um längerfristige Wirkungen zu beobachten hat dieselbe Arbeitsgruppe Rosen untersucht. Bereits bestehende Triebe wurden durch HF-EMF nicht beeinflusst. Eine Exposition von sich entwickelnden Knospen führte allerdings zu einer Wachstumsreduktion.

Das durchgeführte Forschungsvorhaben wurde als Replikationsstudie durchgeführt und war in insgesamt fünf Arbeitspakete (AP) unterteilt.

In AP1 wurde der vorliegende Stand von Wissenschaft und Technik in Bezug auf molekulare Wirkungen von HF-EMF auf Pflanzen aufbereitet. Es fiel auf, dass ein Großteil der publizierten Studien von HF-EMF-Effekten auf Pflanzen den Ansprüchen guter Labor- beziehungsweise Publikationspraxis nicht gerecht werden. So waren häufig die Methoden nicht ausreichend beschrieben, die Probenzahl sehr gering, die durchgeführte Statistik nicht eindeutig nachvollziehbar oder die Expositionsanlagen zu beanstanden, weswegen viele der publizierten Ergebnisse und Schlussfolgerungen zu hinterfragen sind. Zudem werden in thematisch ähnlichen Publikationen häufig widersprüchliche Ergebnisse berichtet. Tendenziell wird eine Zunahme von reaktiven Sauerstoffspezies und eine Zunahme pflanzlicher Erbgutschäden nach HF-EMF-Exposition in der Literatur beschrieben. Auf Genexpressionsebene fällt auf, dass nur einzelne Gene genannt werden, deren Expression sich nach einer HF-EMF-Exposition ändert. Darunter fallen die Gene *bZIP*, *CALMODULIN*, *CALCIUM-DEPENDENT PROTEIN KINASE*, *CHLOROPLAST mRNA BINDING PROTEIN* und

*PI* oder auch stress-relevante Gene und Gene, die an der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies beteiligt sind. Von diesen Genen wurde berichtet, dass sie innerhalb kürzester Zeit nach HF-EMF-Exposition hochreguliert werden.

Zudem werden in der verfügbaren Literatur widersprüchliche Ergebnisse von HF-EMF-Expositionen auf verschiedene Pflanzenparameter, auf die Photosynthese, oder auch den Sekundärmetabolismus beschrieben.

In AP2 wurde erstmals eine mobile Modenverwirbelungskammer verwirklicht, die direkt in einer Pflanzenanzuchtkammer installiert wurde. Im Arbeitsvolumen innerhalb der Modenverwirbelungskammer (mindestens eine Viertelwellenlänge von allen Berandungen entfernt) kann ein statistisch homogenes, isotropes Feld angenommen werden, sodass mit diesem Konzept sowohl kontrollierte HF-EMF-Expositionen als auch kontrollierte Pflanzenwachstumsbedingungen realisiert werden konnten. Die automatische Steuerung der Modenverwirbelungskammer lief über die hier implementierte Software *Fields'N'Roses*, wodurch es möglich war, Studien verblindet durchzuführen. Durch die Einbindung eines modernen Feldsondensystem, das aus acht lasergespeisten Sondenköpfen besteht, in denen sich jeweils ein dreiachsiger, isotrop messender Feldsensor befindet, war es möglich die tatsächliche Expositionsfeldstärke während der laufenden Pflanzenversuche innerhalb des Arbeitsvolumens der Modenverwirbelungskammer, in dem sich auch die zu untersuchenden Pflanzen befanden, zu überwachen und zu messen. Aufgrund der hohen Samplingrate des verwendeten Feldsondensystems war eine aktive *Closed-Loop*-Regelung der Expositionsfeldstärke möglich. Eine solche Aktivregelung wird aktuell in die technischen EMV-Normen zu Störfestigkeitsmessungen in Modenverwirbelungskammern eingepflegt, fand aber bislang keine Anwendung in veröffentlichten Studien an Pflanzen.

In AP3 wurde mittels globaler Transkriptomanalysen der Effekt einer 15-minütigen HF-EMF-Exposition (900 MHz, Feldstärken 40 V/m oder 5 V/m und Scheinexposition = 0 V/m) auf das Transkriptom von Tomaten (*Solanum lycopersicum* cv. Sweet-100) untersucht. Als Positivkontrolle diente ein leichter mechanischer Stress durch Anschneiden des 4. Blattes. Die Studie wurde verblindet durchgeführt. Als Replikationsstudie waren der Versuchsaufbau und die Versuchsdurchführung eng an bereits veröffentlichte Studien der Arbeitsgruppe Vian angelehnt (Roux *et al.*, 2006,

2008; Vian *et al.*, 2006). Für kontrollierte HF-EMF-Expositionen wurde die in AP2 konstruierte Modenverwirbelungskammer verwendet.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass eine HF-EMF-Exposition von Tomatenpflanzen (900 MHz, 40 V/m) oder ein mechanisches Stressen durch Anschneiden zu einer eher geringen Änderung der Genexpression im Vergleich zur Scheinexposition (900 MHz, 0 V/m) führt. Im Gegensatz dazu war die Anzahl an differenziell exprimierten Genen bei 5 V/m im Vergleich zur unexponierten Kontrolle deutlich höher als bei 40 V/m. Dies lässt den Schluss zu, dass eine HF-EMF Exposition mit 5 V/m, zumindest kurzzeitig, stärkere Auswirkungen auf das Transkriptom von Tomaten hat, als eine HF-EMF Exposition der Feldstärke 40 V/m. Nachgeschaltete Genontologie-Analysen der Gene, die bei 5 V/m differenziell exprimiert werden, zeigten angereicherte Prozesse, die auch von den zu replizierenden Studien berichtet werden. Hierunter fallen beispielsweise ATP-abhängige Prozesse, oxidativer Stress, und Kalzium-Homöostase. Ein Anstieg der Expression der Gene *bZIP* und *PI*, der in den zu replizierenden Studien unter HF-EMF-Exposition beobachtet wurde, konnte von uns weder durch globale Transkriptomanalysen noch mittels quantitativer Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR) bestätigt werden. Dasselbe traf auf die berichteten ATP-Änderungen nach HF-EMF Exposition zu (Roux *et al.*, 2008a), die in unseren Analysen auch nicht bestätigt werden konnten. Bei den von uns bioinformatisch ermittelten differenziell exprimierten Genen konnte eine differenzielle Expression nach HF-EMF-Exposition der Feldstärke 5 V/m vereinzelt mittels RT-qPCR bestätigt werden.

In AP4 wurde mittels RT-qPCR eine systemische Antwort einer 15-minütigen HF-EMF Exposition (900 MHz, Feldstärken 40 V/m oder 5 V/m und Scheinexposition = 0 V/m) auf die Genexpression von *bZIP* und *PI* untersucht. Dazu wurden Tomatenpflanzen entweder komplett exponiert und das jüngste Blatt beprobt, die Tomatenpflanzen komplett geschirmt und das jüngste Blatt beprobt, oder nur das älteste Blatt exponiert und sowohl das älteste als auch das jüngste Blatt (geschirmt) beprobt. Für die HF-EMF-Exposition wurde auch hier die in AP2 entwickelte Modenverwirbelungskammer verwendet, allerdings dahingehend modifiziert, dass auch Einzelblattexpositionen möglich waren. Dabei muss angemerkt werden, dass in den Szenarien, in denen Einzelblätter exponiert wurden, diese keinem statistisch homogenen und isotropen Feld ausgesetzt waren, da sie sich aufgrund des Versuchsaufbaus, außerhalb des definierten Arbeitsvolumens befanden. Als Replikationsstudie waren der

Versuchsaufbau und die Versuchsdurchführung auch in AP4 eng an bereits veröffentlichte Studien der Arbeitsgruppe Vian angelehnt (Beaubois et al., 2007). Als Positivkontrolle diente in AP4 ein mechanischer Stress durch Quetschen eines Blattes. Zusätzlich wurde durch Zugabe von Chemikalien getestet, ob mögliche Einflüsse Kalzium- und/oder ABA-vermittelt sind, wie von der Arbeitsgruppe Vian postuliert. Mittels globaler Transkriptomanalysen wurde erneut der Effekt einer 15-minütigen HF-EMF-Exposition (900 MHz, Feldstärken 40 V/m oder 5 V/m und Scheinexposition = 0 V/m) auf das Transkriptom von Tomaten (*Solanum lycopersicum* cv. Sweet-100) untersucht (als Replikation von AP3).

Auch in der Transkriptomanalyse der AP4 Daten, die wie in AP3 verblindet durchgeführt wurde, zeichnete sich das Expositionsszenario mit der Feldstärke 5 V/m durch eine hohe Anzahl an differenziell exprimierten Genen im Vergleich zur unexponierten Kontrolle aus. Das Expositionsszenario der Feldstärke 40 V/m hingegen zeigte erneut kaum eine Veränderung des Transkriptoms im Vergleich zur unexponierten Kontrolle. Abweichend zu AP3 wurde in AP4 ein mechanischer Stress durch Quetschen des 4. Blattes induziert. Auch dieses Stressszenario führte zu einer hohen Anzahl an differenziell exprimierten Genen im Vergleich zur ungestressten Kontrolle. Diese Ergebnisse zeigen, dass es deutliche Unterschiede macht, ob ein Blatt durch Anschneiden oder durch Quetschen mechanisch gestresst wird.

Anhand der RT-qPCR Daten aus AP4 zeigte sich, dass in den Gesamtexpositionsszenarien weder *bZIP* noch *PI* drastische Änderungen in ihren Genexpressionen zeigten, was auch bereits in AP3 geschlussfolgert wurde. Im Fall von *PI* fiel allerdings auf, dass es zu teilweise sehr starken Schwankungen zwischen den einzelnen biologischen Replikaten kam.

Auch in den Einzelblattexpositionsszenarien schwankte die Genexpression von *PI* stark zwischen den biologischen Replikaten, und in keinem Szenario ließen sich auffällige Änderungen der *PI*-Genexpression detektieren. Somit war auch eine systemische Antwort nicht nachweisbar. Auffällig erschien allerdings, dass gerade die chemische Blockade der ABA-Biosynthese mit Naproxen in allen Einzelblattexpositionsszenarien, sowie in der Sham-Gesamtexposition (0 V/m) ohne Abschirmung zu teilweise starken Anstiegen der *PI*-Genexpression führte.

Zusätzlich liefern die erhobenen Daten keine signifikanten Hinweise, dass mögliche HF-EMF-Effekte auf Genexpressionsänderungen von *bZIP* oder *PI* ABA oder Kalzium-vermittelt sind.

In AP5 sollte das Haupt- und Seitensprosswachstum von Rosenstecklingen nach HF-EMF-Exposition (900 MHz; 5 V/m; 3 x 30 Minuten) und nach Scheinexposition über einen Zeitraum bis 40 Tage nach Exposition (Hauptspross) bzw. bis 72 Tage nach Exposition (Seitenspross) analysiert werden. Auch diese Experimente wurde verblindet und in der in AP2 entwickelten Modenverwirbelungskammer durchgeführt. Die erhobenen Daten zeigten keine Veränderung des Sprosswachstums von Rosenstecklingen aufgrund einer HF-EMF-Exposition. Dies trifft sowohl auf das Hauptsprosswachstum über einen Zeitraum bis 40 Tage nach Exposition, als auch auf das Seitensprosswachstum aus unterschiedlichen Blattachsen über einen Zeitraum bis 72 Tage nach Exposition zu. Die Ergebnisse für das Hauptsprosswachstum wurden auch in Grémiaux *et al.*, 2016 beschrieben und konnten somit repliziert werden. In Bezug auf das Seitensprosswachstum hatten Grémiaux *et al.*, 2016 für die Blattachsen 4 und 5 statistisch signifikante Unterschiede zwischen Scheinexposition und HF-EMF-Exposition (900 MHz, 5 V/m) gezeigt. Diese Ergebnisse konnten in unserer Studie nicht repliziert werden.

## Abstract

Potential damage to plants caused by radio-frequency electromagnetic fields (RF-EMF) is often postulated, but there is a lack of controlled scientific evidence. Experimental, scientifically reliable laboratory studies on the effects of RF-EMF on plants originate almost exclusively from the working group of Prof. Alain Vian from France (Université d'Angers), several of which were to be verified and analyzed in this research project. In particular, the Vian working group found increased expression of certain messenger substances in tomatoes exposed to RF-EMF, as well as changes in energy metabolism and in the gene expression of *PROTEINASE INHIBITOR II (PI)* and *BASIC LEUCINE ZIPPER1 (bZIP)*, which can be interpreted as a stress response. In particular, these reactions appeared to be mediated by the phytohormone abscisic acid (ABA) and calcium. The reactions are also systemic, which means that the entire plant reacts, even if, for example, only one leaf was exposed. To observe longer-term effects, the same research group studied roses. Existing shoots were not affected by RF-EMF. However, exposure of developing buds led to reduced growth.

The commissioned research project was conducted as a replication study and was divided into a total of five work packages (WP).

In WP1, the current state of science and technology regarding the molecular effects of RF-EMF on plants was reviewed. It was noted that the majority of published studies on RF-EMF effects on plants do not meet the standards of good laboratory practice or good publication practice. In many cases, the methods were not described in sufficient detail, the sample size was very small, the statistics used were not clearly comprehensible, or the exposure facilities were objectionable, which is why many of the published results and conclusions must be questioned. In addition, contradictory results are often reported in publications on similar topics. The literature tends to describe an increase in reactive oxygen species and an increase in DNA damage in plants after RF-EMF exposure. At the gene expression level, it is noticeable that only expression changes of individual genes after RF-EMF exposure are mentioned. These include the genes *bZIP*, *CALMODULIN*, *CALCIUM-DEPENDENT PROTEIN KINASE*, *CHLOROPLAST mRNA BINDING PROTEIN*, and *PI*, as well as stress-related genes and genes involved in the formation of reactive oxygen species. These genes have been reported to be upregulated shortly after RF-EMF exposure.

In addition, the available literature reports contradictory results of RF-EMF exposure on various plant parameters, photosynthesis, and secondary metabolism.

In WP2, a mobile mode-stirred reverberation chamber was implemented, which was for the first time directly installed in a plant cultivation chamber. Within the working volume of a mode-stirred reverberation chamber (at least a quarter wavelength away from all boundaries), a statistically homogeneous, isotropic field can be assumed. Our setup, therefore, enabled both controlled RF-EMF exposure and controlled plant growth conditions. The automatic control of the mode-stirred reverberation chamber was carried out using the implemented *Fields'N'Roses* software, which made it possible to conduct blinded studies. By integrating a modern field probe system consisting of eight individual triaxial field sensors, it was possible to monitor and measure the actual electric field strength during ongoing plant experiments within the working volume of the mode-stirred reverberation chamber, which also contained the plants under investigation. Due to the high sampling rate of the field probe system used, active closed-loop control of the exposure field strength was possible. Such active closed-loop control is currently being incorporated into the technical EMC standards for immunity measurements in mode-stirred reverberation chambers, but had not been implemented in published studies on plants.

In WP3, global transcriptome analyses were used to investigate the effects of short-term RF-EMF exposure (900 MHz, field strengths 40 V/m or 5 V/m and control at 0 V/m; 15 minutes) on the transcriptome of tomatoes (*Solanum lycopersicum* cv. Sweet-100). A weak mechanical stress caused by cutting into the fourth leaf was used as a positive control. The study was conducted blinded. As a replication study, the experimental design and procedure were closely aligned with previously published studies by the Vian research group (Roux et al., 2006, 2008; Vian et al., 2006). The mode-stirred reverberation chamber constructed in WP2 was used for controlled RF-EMF exposures.

Our results showed that RF-EMF exposure of tomato plants (900 MHz, 40 V/m) or mechanical stress caused by cutting leads to a rather small change in gene expression compared to sham exposure (900 MHz, 0 V/m). In contrast, the number of differentially expressed genes at 5 V/m was significantly higher than at 40 V/m compared to the unexposed control. This suggests that RF-EMF exposure at 5 V/m has a stronger

effect on the transcriptome of tomatoes, at least in the short term, compared to RF-EMF exposure at a field strength of 40 V/m. Downstream gene ontology analyses of the differentially expressed genes at 5 V/m showed enriched processes that are also reported in the replicated studies. These include, for example, ATP-dependent processes, oxidative stress, and calcium homeostasis. We, however, could not confirm the reported increase in the expression of the genes *bZIP* and *PI* after RF-EMF exposure, neither through global transcriptome analyses nor by quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). The same was true for the reported ATP changes after RF-EMF exposure (Roux et al., 2008a), which could not be confirmed by our analyses. From the detected differentially expressed genes, differential expression after RF-EMF exposure at a field strength of 5 V/m could be confirmed for individual genes using RT-qPCR.

In WP4, RT-qPCR was used to investigate the systemic response of a 15-minute RF-EMF exposure (900 MHz, field strengths 40 V/m or 5 V/m and control at 0 V/m) on the gene expression of *bZIP* and *PI*. For this purpose, tomato plants were either completely exposed and the youngest leaf sampled, the tomato plants completely shielded and the youngest leaf sampled, or only the oldest leaf exposed and both the oldest and youngest leaves (shielded) sampled. The mode-stirred reverberation chamber developed in WP2 was also used for RF-EMF exposure, but it was slightly modified to allow single leaf exposure. It should be noted that in the scenarios in which individual leaves were exposed, these leaves were not exposed to a statistically homogeneous and isotropic field, as they were outside the defined working volume due to the experimental setup. As a replication study, the experimental setup and procedure in WP4 were also closely aligned with previously published studies by the Vian research group (Roux et al., 2006; Vian et al., 2006; Beaubois et al., 2007; Roux et al., 2008a). In WP4, mechanical stress caused by squeezing a leaf using an artery clamp served as a positive control. In addition, chemicals were added to test whether possible impacts of RF-EMF on gene expression are mediated by calcium and/or ABA, as postulated by the Vian research group. As a replication of WP3, global transcriptome analyses were used to re-examine the effect of short-term RF-EMF exposure (900 MHz, field strengths 40 V/m or 5 V/m and control at 0 V/m; 15 minutes) on the transcriptome of tomatoes (*Solanum lycopersicum* cv. Sweet-100).

In the transcriptome analysis of WP4, which was conducted blinded as in WP3, the exposure scenario with a field strength of 5 V/m was also characterized by a high number of differentially expressed genes compared to the unexposed control. The exposure scenario with a field strength of 40 V/m, on the other hand, again showed little change in the transcriptome compared to the unexposed control. The squeezing stress also led to a high number of differentially expressed genes compared to the unstressed control, which shows that there are significant differences between mechanical stressing a leaf by cutting or squeezing it.

Based on the RT-qPCR data from WP4, it was found that neither *bZIP* nor *PI* showed drastic changes in their gene expressions in the scenarios where the entire plants were exposed to RF-EMF, which had already been concluded in WP3. In the case of *PI*, however, significant variations between the individual biological replicates were observed.

In the scenarios, where individual leaves were exposed to RF-EMF, the *PI* gene expression also varied greatly between biological replicates, and no noticeable changes in *PI* gene expression could be detected in any of the tested scenarios. Thus, no systemic response was detectable either. It was striking that chemically blocking ABA biosynthesis with naproxen in particular led to sometimes strong increases in *PI* gene expression in all single-leaf exposure scenarios, as well as in the sham full-plant exposure (without shielding).

In addition, the data collected do not provide any significant evidence that possible RF-EMF effects on *bZIP* or *PI* gene expression could be mediated by ABA or calcium.

In WP5, growth of the main and side shoots developing from rose cuttings was analyzed after RF-EMF exposure (900 MHz; 5 V/m; 3 x 30 minutes) and after sham exposure over a period of up to 40 days after exposure (main shoot) and up to 72 days after exposure (side shoot). These experiments were also blinded and conducted in the mode-stirred reverberation chamber developed in WP2. The data collected showed no change in shoot growth of rose cuttings due to RF-EMF exposure. This applies both to the main shoot growth over a period of up to 40 days after exposure and to side shoot growth from different leaf axes over a period of up to 72 days after exposure. The results for main shoot growth were also described in Grémiaux et al., 2016, and could thus be replicated.

With regard to lateral shoot growth, Grémiaux et al., 2016 showed statistically significant differences between sham exposure and RF-EMF exposure (900 MHz, 5 V/m) for leaf axes 4 and 5. These results could not be verified in our study.

## **Einleitung und Zielsetzung**

Die Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn (Division: *Crop Functional Genomics*) führte im Auftrag des Bundesamtes für Strahlenschutz eine experimentelle Replikationsstudie zur Frage möglicher Einflüsse von hochfrequenten elektromagnetischen Feldern (HF-EMF; 900 MHz, 5 V/m bzw. 40 V/m) auf Pflanzenwachstum und -gesundheit an Tomaten und Rosen durch (Vorhaben 3622EMF404). Dabei sollten Ergebnisse der Arbeitsgruppe Alain Vian (Université d'Angers) reproduziert werden (Vian et al., 2006; Beaubois et al., 2007; Roux et al., 2008b; Roux et al., 2008a; Grémiaux et al., 2016).

Zur Durchführung der Experimente sollte laut Leistungsbeschreibung eine Modenverwirbelungskammer verwirklicht werden. Dies geschah in Zusammenarbeit mit der Technischen Universität Braunschweig (Institut für elektromagnetische Verträglichkeit).

Das Forschungsvorhaben war in fünf Arbeitspakete (AP) unterteilt. In AP1 wurde der vorliegende Stand der Wissenschaft und Technik aufbereitet. In AP2 wurde eine Modenverwirbelungskammer in einer begehbaren Pflanzenanzuchtkammer realisiert. In AP3 und AP4 wurde untersucht, ob HF-EMF Auswirkungen auf die Genexpression in Tomaten haben und ob es sich bei der Reaktion von Tomaten auf HF-EMF um eine systemische Reaktion handelt. In AP5 wurde das Sprosswachstum von Rosen bis 72 Tage nach HF-EMF-Exposition untersucht.

## **Arbeitspaket 1 Aufarbeitung des relevanten Standes von Wissenschaft und Technik**

### 1.1. Allgemeines zu AP1

Für eine Aufarbeitung zum derzeitigen Stand der Wissenschaft zu den Auswirkungen von HF-EMF auf Pflanzenwachstum und Pflanzengesundheit wurde die Übersichtsarbeit zu den Effekten von HF-EMF auf Pflanzen, die 2021 unter der Federführung von Shalinder Kaur (Panjab University, India) und Alain Vian (Université d'Angers, France) veröffentlicht wurde, als Ausgangspunkt genommen (Kaur et al., 2021). Dieser wird im Folgenden als Kaur-Review bezeichnet.

### 1.2. Literaturrecherche

Zur Ergänzung des Kaur-Reviews wurden unterschiedliche Literatursuchen durchgeführt mit dem Ziel, relevante Publikationen ab 2021, aber auch ältere, die nicht im Kaur-Review angesprochen wurden, zu ermitteln. Folgende Kriterien waren für die Literatursuche entscheidend:

- 1) HF-EMF im Frequenzbereich 300 MHz bis 3 GHz.
- 2) Studien, die unter Laborbedingungen (Labor oder Gewächshaus) durchgeführt wurden. Alle Feldstudien, d.h. sowohl Beobachtungsstudien um Basisstationen, als auch experimentelle Studien im Freien, wurden ausgeschlossen. Ausnahmen bildeten Czerwiński *et al.*, 2023 und Tran *et al.*, 2023.
- 3) Molekulare und/oder phänotypische Studien. Dies beinhaltete grundsätzlich auch die Exposition von Samen oder Saatgut. Solche Studien wurden nur ausgeschlossen, falls sie den anderen Kriterien nicht genügten.
- 4) Keine Studien an Bäumen oder Sträuchern

#### 1.2.1. Literatursuche

Basierend auf diesen Kriterien ergab eine anfängliche Literatursuche in der Datenbank *Web of Science* (Tabelle 1.1, Suche 1) insgesamt 4808 Treffer, die auf 3971 Treffer eingegrenzt wurden, indem nur englische Studien im Zeitraum 2005 – 2023 berücksichtigt wurden. Diese Liste wurde händisch durchgegangen und die, laut Titel, relevanten Studien wurden in eine Arbeits-Tabelle aufgenommen. Falls der Titel nicht passend war, wurde zusätzlich die Zusammenfassung (*Abstract*) auf Relevanz überprüft und die Studie dann gegebenenfalls in eine Arbeits-Tabelle mit

aufgenommen. Nach Rücksprache mit der Universitäts- und Landesbibliothek Bonn wurde die Suche weiter spezifiziert (Tabelle 1.1, Suche 2). Diese Suche ergab, nach Filterung bezüglich Zeitraums (2005 – 2023) und Sprache (Englisch), 319 Treffer. Auch diese Liste wurde händisch nach geeigneten Studien durchsucht (Titel und Zusammenfassung) und diese in die Arbeits-Tabelle aufgenommen. Ein Vergleich der so gefundenen Studien mit dem Literaturverzeichnis des Kaur-Reviews zeigte, dass Studien, die in ihren Titeln „*microwave*“ enthielten, von unseren Suchen nicht gefunden wurden. Deswegen wurde die Suchanfrage ein weiteres Mal angepasst (Tabelle 1.1, Suche 3) und lieferte 229 Treffer. Diese wurden erneut händisch überprüft (Titel und Zusammenfassung) und relevante Studien in die zu bearbeitende Tabelle aufgenommen. Zusätzlich wurde die Datenbank [Connected Papers](#) nach Studien durchsucht, die thematisch mit dem Kaur-Review in Verbindung gebracht werden können. Diese Suche ergab 41 Treffer, die alle auch in unserer Arbeits-Tabelle gefunden wurden. Zusammenfassend wurden aufgrund dieser Suchen insgesamt 77 Studien in unserer Arbeits-Tabelle gelistet.

**Tabelle 1.1:** Suchanfragen und Ergebnisse der Literatursuche bei *Web of Science* und *ConnectedPapers*.

Suche Nr.	Suchterm	Anzahl der gefundenen Studien
1	(high?frequen* electromagnetic radiation OR radio?frequency radiation OR phone radiation OR electromagnetic field* OR GSM OR 4G OR 5G ) AND (plant response OR effect on plants OR gene expression OR tomato OR sunflower OR wheat OR bean OR rose* OR seedling* OR flowering plants OR barley OR rice OR allium OR arabidopsis OR maize OR potato) NOT algae NOT tree* NOT yeast NOT bacteria	3971
2	(tomato OR sunflower OR wheat OR bean OR rose* OR seedling* OR flowering plants OR barley OR rice OR allium OR arabidopsis OR maize OR potato OR plant* OR crop* OR cutting* OR flower* OR pollen OR roots OR leaf OR leaves) AND (germinat* OR "gene expression" OR "mechanism of action" OR plant response OR "effect on plant*" ) AND ("high?frequen* electromagnetic radiation" OR "radio?frequency radiation" OR "phone radiation" OR "electromagnetic field*" OR "GSM" OR "4G" OR "5G" OR "HF-EMF" OR "RF-EMF" ) NOT (tree* OR oak OR spruce OR birch)	319
3	(tomato OR sunflower OR wheat OR bean OR rose* OR seedling* OR flowering plants OR barley OR rice OR allium OR	229

Suche Nr.	Suchterm	Anzahl der gefundenen Studien
	arabidopsis OR maize OR potato OR plant* OR crop* OR cutting* OR flower* OR pollen OR roots OR leaf OR leaves) AND (germinat* OR "gene expression" OR "mechanism of action" OR "plant response" OR "effect on plant*" OR "plant development") AND ("high?frequen* electromagnetic radiation" OR "radio?frequency radiation" OR "phone radiation" OR "electromagnetic field*" OR "GSM" OR "4G" OR "5G" OR "HF-EMF" OR "RF-EMF" OR "microwave?radiation" OR "radiofrequency electromagnetic field radiation" OR "EMF-r" ) NOT (tree* OR oak OR spruce OR birch)	
4	Kaur <i>et al.</i> , 2021, ( <a href="#">Link zum Kaur Review von 2021</a> )	41

### 1.2.2. Abgleich mit dem systematischen Review von Karipidis et al., 2023

Ein systematischer Review zu den Effekten von EMF auf Flora und Fauna wurde 2023 unter der Federführung von Ken Karipidis veröffentlicht (Karipidis et al., 2023). Dieser Review listete 97 Pflanzenstudien. Ein Vergleich dieser Studien mit den ursprünglich 77 gefundenen Studien zeigte, dass in unserer Liste 49 der gelisteten Karipidis-Studien gefunden wurden. Von den nicht gefundenen, verbleibenden 48 Studien fielen 19 durch unsere Literatursuche oder wurden händisch aussortiert wegen dem Veröffentlichungsjahr (vor 2005) und/oder dem Frequenzbereich (Harte, 1975; Bigu-Del-Blanco et al., 1977; Ellingsrud and Johnsson, 1993; Haider et al., 1994; Balodis et al., 1996; Magone, 1996; Schmutz et al., 1996; Selga and Selga, 1996; Mironova and Romanovskii, 2001; Scialabba and Tamburello, 2002; Tafforeau et al., 2002; Tafforeau et al., 2004; Ragha et al., 2011; Hussein and El-Maghraby, 2014; Rusakova et al., 2017; Upadhyaya, 2017; Albaqami et al., 2020; Ozel et al., 2021; Bag et al., 2022). Weitere 3 wurden von unserer Suche zwar gefunden, allerdings händisch ausgeschlossen, da sie über Freilandexpositionen oder Beobachtungsstudien um Basisstationen berichteten (Oluwajobi et al., 2014; Waldmann-Selsam et al., 2016; Stefi et al., 2018). Von den verbleibenden 26 Studien wären 14 weitere ausgeschlossen worden, da das Zitat entweder nur auf einen *Conference Abstract* verweist (Răcuciu et al., 2008; Dragolova et al., 2009; Singh and Sharma, 2011; Al-Kathiri et al., 2016), ein Preprint zitiert wurde (Gustavino et al., 2014), das dann auch veröffentlicht wurde (Gustavino *et al.*, 2016), sich mit Bäumen beschäftigte (Sandu et al., 2005; Haggerty, 2010; Halmagyi et al., 2017; Stefi et al., 2017),

Freilandexpositionen durchführte (Kafi et al., 2014), keine molekularen Parameter bespricht (Upadhyaya et al., 2022a), keine Pflanzen exponiert werden (Alattar and Radwan, 2020), oder über *Google/Pubmed/Web of Science* nicht gefunden werden konnte (Rana and Parihar, 2014). Von den verbleibenden 12 wurden 7 bereits im Karipidis-Review als ‚*poor*‘ bewertet (Khalafallah and Sallam, 2009; Sharma et al., 2009a; Krishnan et al., 2010; Monselise et al., 2011; Parihar and Mawal, 2015; Zare et al., 2015; Havas and Symington, 2016; Alattar et al., 2017). Deswegen werden diese für eine Ausarbeitung ausgeschlossen. Die 5 verbleibenden Studien (Radic et al., 2007; Ursache et al., 2009; Surducan et al., 2013; Răcuciu et al., 2018; Upadhyaya et al., 2021a) wurden in unsere Arbeits-Tabelle mit aufgenommen. Zusammenfassend werden nun insgesamt 82 Arbeiten in unserer Tabelle gelistet.

Gegenkontrollen zeigten, dass von den 26 Studien des Karipidis-Reviews, die von uns nicht gefunden wurden, auch nur 3 im Kaur-Review zitiert wurden (Sandu et al., 2005; Radic et al., 2007; Dragolova et al., 2009) und dass im Karipidis-Review 27 von unseren ursprünglich 77 Arbeiten nicht gefunden wurden. Darunter fallen 14 Übersichtsarbeiten oder Kommentare und 6 Originalarbeiten aus 2023, aber auch 7 Arbeiten von vor 2023 (Engelmann et al., 2008; Chen et al., 2009; Jinapang et al., 2010; Tang et al., 2018; Roche et al., 2020; Ma et al., 2021; Johal et al., 2022).

### 1.2.3. Studien, die in die Ausarbeitung mit aufgenommen wurden

Die Originalarbeiten unserer Arbeits-Tabelle wurden alle kurz bewertet (bezüglich Verblindung/Randomisierung, Biologie/Statistik und Dosimetrie) und deren Ergebnisse kurz zusammengefasst. Zusätzlich wurde die Liste nach Studien durchsucht, die bereits im Kaur-Review zitiert wurden. Diese fallen in der folgenden detaillierten Übersicht weg. Gleichzeitig werden Reviews, die in der Tabelle auftauchen, ebenfalls nicht weiter berücksichtigt. Studien, bei denen das Expositionssystem eine Mikrowelle war oder die Exposition fraglich war, da sie nicht nachvollzogen werden konnte, wurden ebenfalls nicht für die Ausarbeitung berücksichtigt (Roche et al., 2020; Ma et al., 2021). Zusätzlich wurden Studien zum elektrischen Potential von Pflanzen für die Ausarbeitung ausgeschlossen (Roux et al., 2015). Dies lieferte 12 Studien, seit der Veröffentlichung des Kaur-Reviews, die in die nachfolgende Ausarbeitung aufgenommen wurden und 6 ältere Studien, die im Kaur-Review nicht berücksichtigt wurden (Tabelle 1.2).

**Tabelle 1.2:** Literaturübersicht über die in dieser Ausarbeitung zusammengefassten Studien.

Quelle	Titel	EMF	Art der Expositionskammer	Ergebnis
Czerwinski et al., 2023	Do electromagnetic fields used in telecommunication affect wild plant species? A control impact study conducted in the field	866-868 MHz über 4 Monate, 12,4 mW/m <sup>2</sup> (20 cm über dem Boden) und 16,7 mW/m <sup>2</sup> (40 cm über dem Boden)	Freilandexposition: gerichtete Antenne auf einer Stange in der Mitte des Versuchsgebiets. Ungewollte Strahlung von Nebenkeulen („Side lobes“) wurde durch einen Metallschirm limitiert. Antenne und RFID- Leser (Sender). FSH8 Spektrumanalysator und isotrope Messsonde (TSEMF-B2; Rohde und Schwarz GmbH & Co., Deutschland)	6 von 10 Spezies zeigten keinen Effekt, bei den anderen schwacher Effekt in nur einem Merkmal. Nur in <i>Trifolium arvense</i> frühere Seneszenz. Schädliche Effekte von EMF speziesspezifisch.
Handa et al., 2023	Effect of 2850 MHz electromagnetic field radiation on the early growth, antioxidant activity, and secondary metabolite profile of red and green cabbage ( <i>Brassica oleracea</i> L.)	2850 MHz für 1 h, 2 h, oder 4 h/ Tag über 7 Tage; 632,1 ± 39,07 mW/m <sup>2</sup>	Vektorsignalgenerator (SMBV; Rohde and Schwarz, Deutschland) mit Verstärker ZHL-2500+ ( <i>Minicircuits</i> , USA) in geschirmter Kammer, Überprüfung mittels NMB 550 (Strahlungsmessgerät)	EMF führte zu reduzierter Spross- und Wurzellänge, Biomasse, weniger Chlorophyll und Karotinoidgehalt, Erhöhung von Phenolgehalt, Flavonoidgehalt und Anthocyangehalt. Zunahme der antioxidativen Gesamtkativität, Zunahme der Aktivität von DPPH, SOD, CAT und POD, Zunahme H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , MDA, Alkaloidgehalt, Abnahme Polyphenolgehalt
Johal et al., 2022	Investigating the effects of 2850 MHz electromagnetic field radiations on the growth, germination and antioxidative defense system of chickpea ( <i>Cicer arietinum</i> L.) seedlings	2850 MHz für 1, 2, 4 h bei 0,522 W/m <sup>2</sup> (gemessen)	Vektorsignalgenerator (SMBV; Rohde and Schwarz, Deutschland) mit Verstärker ZHL-2500+ ( <i>Minicircuits</i> , USA) in geschirmter Kammer, Überprüfung mittels NMB 550 (Strahlungsmessgerät)	4 h Exposition hatte den größten Effekt mit deutlicher Minderung der Wurzel und Sprosslänge. Frisch- und Trockengewicht, sowie Chlorophyllgehalt waren nach 4 h auch signifikant verringert. Höherer Gehalt an MDA, SOD und POD.
Kundu et al., 2021a	Electromagnetic irradiation evokes physiological and molecular alterations in rice	1837,5 MHz; 2,75 mW/m <sup>2</sup> über 6 h pro Tag (4, 12 oder 32 Tage) oder 2,5h Kurzzeit Bestrahlung	Modenverwirbelungskammer ohne "Stirrer", Signalgenerator (BPSG4; Aaronia, Deutschland), Überprüfung mittels tragbarem Spektrumanalysator (N9343C, Keysight technologies, USA)	niedrigere Keimungsrate, in 12 Tage alten Keimlingen: <i>Phytochrome B</i> und <i>C</i> hoch reguliert, in 32 Tage alten Pflanzen: <i>Calmodulin</i> und <i>Cytochrome C</i> hoch und <i>bZIP</i> runter reguliert. Kurzzeitexposition: alle 3 Gene hochreguliert. <i>PI</i> (Inhibitor) zeigte keine Veränderung
Kundu et al., 2021b	One-time electromagnetic irradiation modifies stress-sensitive gene expressions in rice plant	1837,5 MHz bei 2,75 mW/m <sup>2</sup> für 2,5 h	Modenverwirbelungskammer ohne "Stirrer", Expositionspunkte wurden vorher gemessen und bestimmt	<i>Calmodulin</i> und <i>Phytochrome B</i> Expression hochreguliert

Quelle	Titel	EMF	Art der Expositions-kammer	Ergebnis
Porcher et al., 2023a	Non-thermal 2.45 GHz electromagnetic exposure causes rapid changes in <i>Arabidopsis thaliana</i> metabolism.	2450 MHz für 30 min bei 100 V/m	Horn Antenne in geschirmten Raum; Mikrowellensignalgenerator (SMB100A, Rohde und Schwarz, Deutschland), Funktionsgenerator (AFG3021B, Tektronix, USA), und Hochfrequenz-Verstärker (ASO104-30/17, Milmega, Vereintes Königreich); Überprüfung mittels dreiachsiger Sonde („triaxial probe“; EP-601, Narda, Italien)	Erhöhung des DHA- und H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Gehalts, Steigerung der Expression von <i>APX1</i> , <i>CALMODULIN</i> , <i>CAT2</i> , <i>RBOHF</i> und <i>ZAT12</i> . Keine Temperaturänderung
Răcuciu et al., 2015	Inhibitory effects of low thermal radiofrequency radiation on physiological parameters of <i>Zea mays</i> seedlings growth	1 GHz bei 0,47 W/kg für 1-8 h	TEM-Zelle, keine weitere Überprüfung des EMF, nur computergestützte Simulation von SAR	SAR-Verteilung nicht uniform, manche Körner sind höherer Hitzebelastung ausgesetzt, EMF verringert das Wachstum und den Gehalt an Chlorophyll und Karotinoiden abhängig von der Expositionsdauer.
Răcuciu et al., 2018	Influence of 1 GHz radiation at low specific absorption rate of energy deposition on plant mitotic division process	1 GHz für 5 min, 15 min, 30 min, 60 min, 120 min oder 180 min. Eingangsleistung ( $P_{in}$ = 9,6 W). Mittlere Leistungsdichte (gemittelt über alle Proben) = 22,78 W/m <sup>2</sup> , was (laut Autoren) einer elektrischen Feldstärke von 92,67 V/m entspricht. Diese ist wohl nicht homogen und schwankt zwischen 15 V/m und 50 V/m (Positionsabhängig)	TEM-Zelle. Signalgenerator (Hameg HM 3184-3) mit kontinuierlicher Welle, Spektrumanalysator (FSH3; Rohde & Schwarz, Deutschland), Leistungssensor (FSH-Z44; Rohde & Schwarz, Deutschland)	Mitotischer Index und Chromosomenstörungen nehmen in Abhängigkeit der Expositionsdauer zu
Răcuciu, 2009	Effects of radiofrequency radiation on root tip cells of <i>Zea mays</i>	900 MHz bei 20 mW für 1-36 h	TEM-Zelle, Signalgenerator (Hameg HM3184-3), absorbierte Energie wurde mit einem optischen Thermometer (" <i>Luxtron One probe</i> ") gemessen	Mitotischer Index und Chromosomenstörungen nehmen dosisabhängig zu
Senavirathna et al., 2014b	Short-duration exposure to radiofrequency electromagnetic radiation alters the chlorophyll fluorescence of duckweeds ( <i>Lemna minor</i> )	2 GHz, 2,5 GHz, 3,5 GHz, 5,5 GHz und 8 GHz für 0,5 h, 1 h und 24 h bei 45-50 V/m	EMF-geschirmte Absorberkammer, mit Schaumstoff (PFP F und PFP 30, Riken, Japan) und Metallnetz für Anzucht, EMF-Erzeugung mit Transmissions-Antenne, Messung mit Empfängerantenne, RF-Transmitter und Verstärker, Leistungsmessgerät und Sensor (" <i>power sensor</i> ", " <i>power meter</i> ") für Messung des EMF	Keine thermischen Effekte gefunden, EMF zeigte in Abhängigkeit von Dosis und Dauer Effekte auf Parameter der nicht-photochemischen Löschung (NPQ)
Sharma et al., 2023a	Evaluation of oxidative stress and genotoxicity of 900 MHz electromagnetic radiations using <i>Trigonella foenum-graecum</i> test system	1800 MHz für 0 h (Kontrolle), 0,5h, 1 h, 2 h, 4 h, and 8 h wiederholt über 7 Tage	Signal-Generator (Agilent, N9310A) in einem geschirmten Raum, Messung des Outputs mittels einer Sonde (keine weitere Angabe), die mit einem RF-Leistungsmessgerät verbunden wurde (auch hier keine weiteren Angaben)	EMF vermindert Keimungsrate bereits bei 1 h Exposition, bzw. verlangsamt Keimung, da 12 h später die Rate wieder erhöht ist, auch Wurzel und Sprosslänge ist geringer ab 1 h Exposition, Wurzel besonders kurz nach 8 h täglicher Exposition,

Quelle	Titel	EMF	Art der Expositions-kammer	Ergebnis
				Proteingehalt verringert, Anstieg antioxidierender Enzymaktivität (APX, GR, GST, POD, SOD), vermehrt chromosomale Fehler bei Zellteilung
Sharma et al., 2023b	Comprehensive analysis of genotoxic effects and antioxidative defence mechanisms in plant test system exposed to 1800 MHz electromagnetic radiations: a root chromosomal aberration and FTIR spectroscopy approach	900 MHz für 0 h (Kontrolle), 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h, and 8 h wiederholt über 7 Tage	Signal-Generator (Agilent, N9310A) in einem geschirmten Raum, Messung des Outputs mittels einer Sonde (keine weitere Angabe), die mit einem RF-Leistungsmessgerät verbunden wurde (auch hier keine weiteren Angaben).	EMF verringert Keimungsrate, Spross und Wurzellänge, außerdem geringerer Proteingehalt aber dafür erhöhter MDA-Gehalt
Surducun et al., 2013	Microwaves irradiation experiments on biological samples	2,452 GHz für 14 Tage (Gartenbohne) bzw. 25 Tage (Mais). Leistungsdichte auf Höhe des Pflanzgefäßes = $P_d \sim 0,005 \text{ mW/cm}^2$	Absorberkammer, <i>Wireless Router</i> 802,11a+g (TEW-511BRP) als Mikrowellengenerator: 2,40 – 2,48 GHz. Mikrowellenantenne, die über ein Koaxialkabel mit dem Mikrowellengenerator verbunden wurde. „ <i>Vector Network Analyzer</i> “ (Agilent, N5230A)	Exposition stimuliert Keimung, Wurzel- und Sprosswachstum in Mais und Bohne. Der Gesamt-Proteingehalt war nach Exposition in Mais und in der Bohne erhöht. Chlorophyll a+b-Gehalt war in der Bohne nach Exposition erhöht, aber nicht in Mais. In Mais wurde kein verändertes Proteinstmuster von Stressenzymen nach Exposition beobachtet
Tran et al., 2023	Impacts of radio-frequency electromagnetic field (RF-EMF) on lettuce ( <i>Lactuca sativa</i> )—Evidence for RF-EMF interference with plant stress responses	1890 MHz-1900 MHz ( $8000 \mu\text{W/m}^2$ ); 2,4 Ghz und 5 GHz ( $2000 \mu\text{W/m}^2$ ) für 48 h bzw 2 bis 6 Wochen	EMF-Quelle: DECT und WiFi über Fritzbox Router und DECT Telefon in Feld und Gewächshaus, Messung mit Breitband-RF-Analysatoren (Gigahertz Solution, Deutschland): HF59B (700 MHz – 2.7 GHz) und HFW35C (2.4 GHz – 6 GHz)	Gewächshaus: minimaler Effekt auf Chlorophyll, kein Effekt auf Blüte; Feld: verringerte photosynthetische Effizienz und verfrühte Blüte, <i>VDE</i> und <i>ZEP</i> (ABA Gene) waren runter reguliert, da nur Effekt auf Feld sichtbar ist, wird ein Zusammenhang zwischen EMF und Widerstandskraft vermutet
Upadhyaya et al., 2021a	Exposure effect of 900 MHz electromagnetic field radiation on antioxidant potential of medicinal plant <i>Withania somnifera</i>	900 MHz für 12 h, 24 h, 36 h, 48 h, 60 h und 72 h, magnetische Feldstärke = 1,9 mG	Dipolantennenwandler („ <i>dipole antenna transducer</i> “). Einheitliche magnetische Feldstärke von 1,9 mG. Keine weiteren Angaben.	DPPH-Test (antioxidative Aktivität) zeigte einen Anstieg nach 24 h Exposition, spätere Zeitpunkte waren unter dem 0 h Wert, Gehalt von Flavonoiden und phenolischen Verbindungen sank nach HF-EMF-Exposition

Quelle	Titel	EMF	Art der Expositions-kammer	Ergebnis
Upadhyaya et al., 2021b	Investigation of mobile communication radio frequency exposure on the medicinal property of <i>Jasminum grandiflorum</i> L.	1800 MHz; 2 mG für 12 h, 24 h, 36 h, 48 h, 60 h, oder 72 h	Dipolantennenwandler, keine Angaben zu einer Expositions-kammer, Messung mit Gauss-Meter	Zunahme der antimykotischen Eigenschaften des Pflanzenextrakts bei 12 oder 24-stündiger Exposition. Längere Exposition führte zur Abnahme der antimykotischen Eigenschaften
Upadhyaya et al., 2022b	Attributes of non-ionizing radiation of 1800 MHz frequency on plant health and antioxidant content of Tomato ( <i>Solanum lycopersicum</i> ) plants	1800 MHz bei 8 V/m; 2 mG für 12, 60 und 120 h	Wendelantenne, Messung mit Gauss-Meter (Waco 195, Aykay, Indien), Exposition im Labor ohne Angabe, ob eine Expositions-kammer verwendet wurde. Verwendung eines Vektornetzwerkanalysators (keine nähere Angabe) und einem Leistungsmessgerät (auch keine nähere Angabe).	Höhe, Blattgröße, Wurzellänge, Keimungsrate und Chlorophyllgehalt waren nach Exposition reduziert; höhere H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Werte in Blättern. Längere Exposition führte zu stärkeren Beeinträchtigungen (Blattrollen, Verfärbung), auch sekundäre Pflanzenstoffe zeigten negativen Effekt, Akkumulation von Lycopenen (schlecht für Qualität der Früchte)
Ursache et al., 2009	The effects of high frequency electromagnetic waves on the vegetal organisms	Radiofrequenz: 418 MHz für 1 h, 2 h, 4 h, oder 12 h; 0,6 mW/cm <sup>2</sup> , kontinuierliche Wellenexposition	TEM-Zelle, der Mikrowellengenerator war „designed“ auf der Basis einer IMPATT Diode mit einer Leistungsdichte von 10 mW/ cm <sup>2</sup> auf der Höhe der Hornantenne. Die Leistungsdichte wurde mittels eines Sondendetektors bestimmt (1 mW/cm <sup>2</sup> auf Höhe des Saatguts).	Höherer Chlorophyll a -, Chlorophyll b- und Karotinoidgehalt, sowie erhöhtes Verhältnis von Chlorophyll a zu Chlorophyll b nach kurzzeitiger Exposition (Statistik fraglich). Keine statistisch signifikante Änderung von Frisch- und Trockengewicht.

### 1.3. Zusammenstellung verwendeter Expositionssysteme

In den recherchierten Pflanzenstudien wurden unterschiedliche Expositionssysteme verwendet, die sich in prinzipiell geeignete und prinzipiell ungeeignete Expositionssysteme unterteilen lassen. Für eine Einschätzung über die Verlässlichkeit der veröffentlichten Daten werden die verwendeten Expositionssysteme kurz dargestellt.

#### 1.3.1. Prinzipiell geeignete Expositionssysteme

Bei Beachtung bzw. Kontrolle aller relevanten Parameter gehören zu den prinzipiell geeigneten Expositionssystemen u.a. die in den zitierten Arbeiten verwendeten Systeme mit transversal-elektromagnetischen (TEM)-Zellen, GTEM-Zellen, Absorber- und Modenverwirbelungskammern, sowie wohl definierte und spezifizierte Feldexpositionen (siehe unten).

##### 1.3.1.1. Transversal elektromagnetische (TEM)-Zelle

Die TEM-Zelle ist eine etablierte Expositionsmethodik im Rahmen der elektromagnetischen Verträglichkeit (EMV). Die TEM-Zelle kann je nach geometrischer Auslegung und damit verknüpfter, maximal nutzbarer Frequenz zur Exposition von Saatgut oder Keimlingen verwendet werden. Jede TEM-Zelle ist für gewisse Frequenzbereiche spezifiziert, wobei eine gleichmäßige TEM-Feldverteilung für einen Arbeitseinsatz am oberen spezifizierten Frequenzbereich nicht zwangsläufig gewährleistet ist, da jede Befüllung mit Proben und ggf. Messsonden das „elektromagnetische Volumen“ vergrößert und damit die maximal nutzbare Frequenz absenkt (beispielsweise bei der Verwendung einer TEM-Zelle, die bis 1000 MHz spezifiziert ist und die Exposition bei 900 MHz abläuft, wie verwendet in (Răcuciu and Miclăus, 2007)). Für eine Sicherstellung der gewünschten TEM-Feldverteilung muss diese experimentell unter Anwesenheit der Proben verifiziert werden, ansonsten ist nicht sichergestellt, dass es keine Ausbreitung/Schwingungsfähigkeit von sogenannten „höheren Moden“ gibt, d.h. Hohlraumresonanzen in der Zelle. Diese führen in der Regel zu völlig unbekanntem Feldverhältnissen. Auch die Anwendung von „full-wave“-Simulatoren kann diese Problematik nicht durch Simulation beheben (wie beispielsweise angewandt in Jinapang *et al.*, 2010), weil eine Anregung höherer Moden durch geometrische Inhomogenitäten nie so genau modelliert werden kann, dass deren Amplituden auch nur halbwegs genau bestimmbar sind.

#### 1.3.1.2. Gigahertz TEM (GTEM)-Zelle

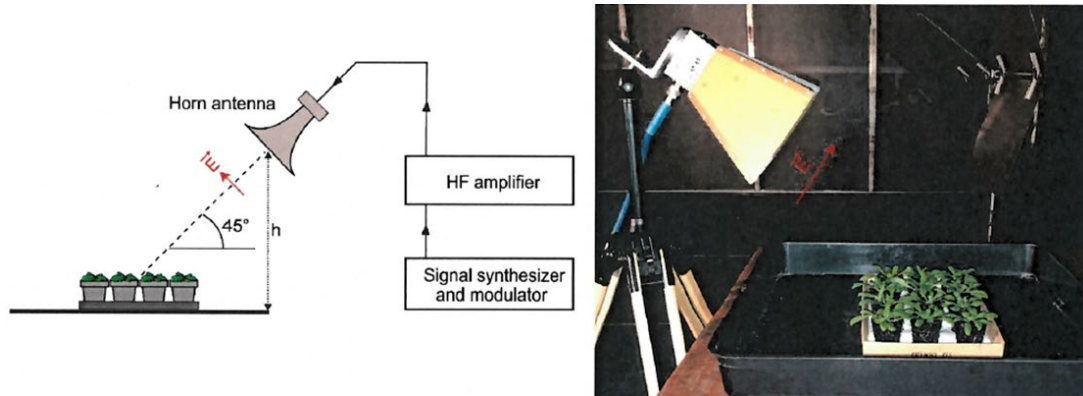
GTEM-Zellen sind eine Modifikation der klassischen TEM-Zellen und erlauben im Gegensatz zu TEM-Zellen den Betrieb im Gigahertz Frequenzbereich. GTEM-Zellen vermeiden durch ihre Konstruktion in hohem Maße die für TEM besprochenen Nachteile von der Schwingungsfähigkeit höherer Moden (d.h. Resonanzen), solange die Abmessungen der exponierten Proben klein gegen die Querabmessungen an der Platzierungsstelle in der GTEM-Zelle bleiben. Unter diesen Voraussetzungen kann auch über die eingespeiste Leistung die Feldstärke am Probenort bestimmt werden.

#### 1.3.1.3. Modenverwirbelungskammer

Eine weitere Mess- und Prüfumgebung im Bereich der EMV stellen Modenverwirbelungskammern dar. Im Gegensatz zu TEM- oder GTEM-Zellen sind diese wesentlich größer im Verhältnis zur Wellenlänge der Expositionsstrahlung auslegbar, so dass sie auch ganze Pflanzenanzuchtschränke beherbergen können (Roux et al., 2006; Beaubois et al., 2007; Roux et al., 2008b; Grémiaux et al., 2016). Elektromagnetische Felder werden mittels Antennen in der Prüfkammer angeregt und an deren metallischen Wänden möglichst vollständig reflektiert, so dass es zu in diesem Fall beabsichtigten Resonanzeffekten bei der Feldverteilung kommt, nämlich einer Vielfalt ausbreitungsfähiger „höherer Moden“. Die Modenverwirbelungskammern verfügen über einen meist mechanisch realisierten „Modenrührer“ (*Stirrer*), um die elektromagnetischen Randbedingungen innerhalb der Messumgebung und damit die Feldverteilung der höheren Moden zeitvariant zu erzeugen, so dass bei geeigneter Messtechnik und geeigneten Auswerteverfahren statistisch aussagefähige Mittelwerte zur Exposition gewonnen werden können. Der in Beaubois *et al.*, 2007 und Grémiaux *et al.*, 2016 beschriebene Versuchsaufbau könnte deswegen prinzipiell für eine definierte Exposition geeignet sein, hierzu fehlen in den Publikationen aber viele notwendige Detailangaben. Für die Gewissheit über die Expositionsbedingungen wäre z.B. die Angabe eines mittleren Feldstärke-Expositionswertes am Ort der Probe wichtig, den man nur über eine online-Messung der Signale an einer Empfangsantenne über längere Expositionszeiten und eine sich daraus ergebende statistische Analyse erhält. Dies gilt noch einschränkender für einen Expositionsaufbau wie beschrieben in Roux *et al.*, 2006, 2008a, da in diesen Studien keine Kontrolle des Feldverhaltens in der Kammer online vorgesehen wird.

#### 1.3.1.4. Hornantenne im geschirmten Raum

Dieses Expositionssystem wurde in Porcher *et al.*, 2023 verwendet und ist in Abbildung 1.1 dargestellt.



**Abbildung 1.1:** Übersicht über das verwendete Expositionssystem von Porcher *et al.*, 2023. Hier wurde eine Kammer mit Metallwänden ausgekleidet und folgende Ausstattung benutzt: Hornantenne (Modell 3115, ETS Lindgren, Cedar Park, USA), Signal-Synthesizer (SMB100A, Rhode und Schwarz, München, Deutschland), Modulator (AFG3021B, Tektronix, Beaverton, USA), Hochfrequenzverstärker (ASO104-30/17, Milimega, Ryde, Vereintes Königreich), tri-axial Sonde (EP-601, Narda, Cisano sul Neva, Italien) platziert in der Mitte und an jeder Ecke.

Hier wurde eine implizite „*frequency stirring*“ Technik verwendet, nämlich durch Anwendung einer 100 kHz Rechteck-Frequenzmodulation bei 2,45 GHz Trägerfrequenz, so dass dieser Aufbau der Funktionsweise der Messumgebung einer Modenverwirbelungskammer entspricht. Man unterscheidet bei den Modenverwirbelungskammern verschiedene Methoden zur Verschiebung von Minima/Maxima der Feldverteilung im Volumen. Am anschaulichsten, wie auch am naheliegendsten, ist die mechanische Änderung der Randbedingungen in Form der *Stirrer* ("Modenrührer"), während man die Frequenz konstant hält. Man kann aber auch einfach, ohne mechanische Änderungen, die Frequenz um eine Zentralfrequenz in einem engen Intervall variieren, was man dann "*Frequency stirring*" nennt. Bei richtiger Auslegung ist der Effekt der gleiche, nämlich dass in diesem Intervall viele verschiedene Feldverteilungen durch die unterschiedlichen Frequenzen angeregt werden, deren Minima/Maxima dann frequenzabhängig verschoben und im besten Fall dann über das Intervall statistisch verteilt sind. Es gilt zu bedenken, dass die in der Studie gemachten Angaben nicht vollständig nachvollzogen werden können: eine wie in der Publikation angegebene 100 kHz-Frequenzmodulation erzeugt einen „Hub“, d.h. eine Bandbreite um die Trägerfrequenz derselben Größenordnung. In der

Publikation ist aber eine um den Faktor 300 größere spektrale Signalbandbreite gezeigt, nämlich von 30 MHz. Letzteres könnte unter den gegebenen Umständen zu einer homogenen und reproduzierbaren Feldexposition im Bereich der Pflanzen führen, müsste aber anhand einer längeren Messwerterfassung nachgewiesen werden. Die gegebenen Feldstärkewerte in einem sehr engen Bereich von 99 bis 125 V/m sind so jedenfalls nicht nachvollziehbar.

#### 1.3.1.5. EMF geschirmte Absorberkammer

Eine Absorberkammer ist in der EMV-Prüftechnik eine definierte Umgebung, an deren metallischen, elektrisch leitfähigen Wänden innen Absorber für elektromagnetische Wellen angebracht sind. Eine solche wurde beispielsweise in der Studie von Senavirathna and Asaeda, 2014 verwendet. Der dort beschriebene Expositionsaufbau ist im Prinzip wohldefiniert und nachvollziehbar und deshalb für die Untersuchung der Effekte von HF-EMF auf Pflanzen prinzipiell geeignet. Allerdings ist die Beschreibung unvollständig. Die Exposition ist zwar selber am Ort der Pflanzen sowohl berechnet wie auch gemessen worden, allerdings sind die dabei zum Einsatz kommenden Antennen „Patch“-Antennen (für jede verwendete Frequenz ein anderes Paar) und müssen hierfür entweder messtechnisch und/oder durch Simulationsrechnungen kalibriert werden. Dazu ist in der Publikation nichts zu finden und kann mit Unsicherheiten bei der Expositionsangabe im Bereich einer Größenordnung oder mehr verknüpft sein.

#### 1.3.1.6. Freilandversuche oder Freifeld-Versuchsbedingungen

Freilandversuch bzw. Freifeld-Versuchsbedingungen für definierte Feldverhältnisse sind in der Praxis selten gut zu realisieren, da die gesamte Umgebung um die Messtrecke herum frei von Reflexionen sein muss. In der technischen EMV verwendet man deshalb dafür lieber Absorberkammern genügender Größe, wo dieses Verhalten dann nachgebildet wird, wobei auch die Absorberkammern entsprechende Qualitäten aufweisen müssen. Die Qualität sowohl einer Absorberkammer wie auch eines dann sogenannten "Freifeld-Messgeländes" weist man nach, indem man die sogenannte "*normalized site attenuation (NSA)*" der gestrahlten Feldfortpflanzung, d.h. der Übertragungsstrecke zwischen Feldgenerator bzw. der Sendeantenne und den exponierten Objekten überprüft. Die NSA ist ein wohldefinierter, berechenbarer Übertragungswert zwischen zwei kalibrierten Antennen. Alle Abweichungen bzw. Fehler im NSA-Frequenzgang sind der Messumgebung zuzuschreiben. Im Bereich

der Mobilfunkfrequenzen reichen wegen des Lambda-Kriteriums Abstände von 1 Meter schon sehr gut für die Kriterien einer Fernfeldübertragung aus. Man sollte hieraus aber nicht den Trugschluss ziehen, dass dann eine wohldefinierte, annähernd ebene Wellenausbreitung auf den 1 Meter Abstand gegeben sei, wenn z.B. die ersten reflektierenden Gegenstände in der Umgebung mindestens 5 Meter von der Übertragungsstrecke entfernt sind - das ist häufig nicht der Fall und muss deshalb über die NSA-Vermessung validiert werden.

### 1.3.2. Prinzipiell ungeeignete Expositionssysteme

Zu den prinzipiell ungeeigneten Expositionen zählen Systeme, die die definierte und reproduzierbare Kontrolle relevanter Parameter erst gar nicht erlauben. So sind bei dem Expositionssystem mit spannungsgesteuerten Oszillatoren ohne explizite Feldstärkemessungen an mehreren Stellen der Pflanzenpositionen vor und hinter dem „shield“, keine quantitativen Expositionsaussagen möglich (Skiles, 2006). In Modenverwirbelungskammern ohne Modenrührer (*Stirrer*), wie verwendet in (Kundu et al., 2021a; Kundu et al., 2021b), ist die Exposition völlig undefiniert. Die Feldstärke wird in diesen Studien an nur einer Position gemessen und ist somit zufällig, d.h. nicht aussagekräftig. Durch den Faraday'schen Käfig stellt sich eine Hohlraumresonanz-Feldverteilung höherer Ordnung ein, die von vielen Randbedingungen nicht vorhersehbar abhängt und die Feldanzeige an einem Ort zu einer Zufallsanzeige macht zwischen nahe bei Null und Resonanz-Maximalwert. Weitere Expositionssysteme, wie Handy oder Laptop in einer Fiberglasbox (Akbal et al., 2012), WiFi Repeater in zweifach Alu-gedeckter Kammer mit Schaum (Chen and Chen, 2014), Handy in geschirmtem Raum (Sharma et al., 2009b), Handy in geschirmter Kammer (Singh et al., 2012), Handy oder Laptop ohne Kammer oder Box (Pesnya and Romanovsky, 2013; Qureshi et al., 2017), Handy oder Router ohne Schirmung (Tran et al., 2023), RF-Signalgenerator in YSHIELD gestrichenem Raum oder einer geschirmten Kammer (Sharma et al., 2023a) oder ohne Expositionskammer (Johal et al., 2022) liefern generell völlig undefinierte Rand- und Erregungsbedingungen für einen Rückschluss auf die Expositionen und sind deswegen prinzipiell ungeeignet (die Erregungsangabe ist auch bei Spezifikation des Handytyps zunächst unbekannt, da sie wesentlich von der Steuerung durch die Basisstation abhängt oder im Handy intern durch entsprechende Software-Beeinflussung definiert werden muss, wozu in keiner der Publikationen etwas zu finden war). Bei der Verwendung mit YSHIELD-Wandfarbe

zur HF-Absorption gilt folgendes zu bedenken: Nach Herstellfirma bzw. Vertrieb ([Link zur Abschirmfarbe der Firma YSHIELD](#)) soll die Schirmwirkung sehr hohe Werte aufweisen, was nur mit einer quasi-metallischen Leitfähigkeit zu erreichen wäre. Dies wird zwar in der Praxis wohl nicht der Fall sein, aber selbst bei Werten von "nur" 30 oder 40 dB ginge das nur über einen höher leitfähigen Anteil, so dass eine hauptsächlich absorptive Wirkung nicht zu erwarten ist. Eine gut absorptive Wirkung, die Stehwellenverhältnisse so weit unterdrückt, dass von relativ homogenen und gut definierten Feldexpositionen ausgegangen werden kann, wird nur mit einer entsprechenden Absorberausstattung erreicht. Es gibt zwar Lambda-Viertel-Resonanzabsorber durch eine leitfähige Schicht in Lambda-Viertel-Abstand vor einer dahinterliegenden Metallwand, dazu muss die leitfähige Schicht aber einen reproduzierbaren Flächenwiderstand im Bereich von 377 Ohm aufweisen. Das ist mit der benötigten kleinen Toleranz mit leitenden Lacken aber nur mit extremem Aufwand, wenn überhaupt, erreichbar und ist in den vorliegenden Publikationen weder beschrieben noch verifiziert.

#### 1.4. Effekte von HF-EMF auf Pflanzenwachstum und -gesundheit

Der Fokus des Kaur-Reviews lag auf biologischen Effekten, insbesondere zelluläre, molekulare und Wachstums-Parameter, die durch EMF beeinflusst oder modifiziert wurden. Auffällig ist, dass der Kaur-Review keine Bewertung der zitierten Studien liefert, obwohl viele der zitierten Studien den Ansprüchen guter Laborpraxis beziehungsweise Publikationspraxis nicht gerecht werden. So waren häufig die Methoden nicht ausreichend beschrieben, die Probenzahl sehr gering, die durchgeführte Statistik nicht eindeutig nachvollziehbar oder die Expositionsanlagen zu beanstanden (siehe auch Absatz 1.3). Interessanterweise waren diese Kriterien bereits in einem früheren Review von der Gruppe um Alain Vian angemerkt, fanden jedoch keine Beachtung (Vian et al., 2016; Kaur et al., 2021). Die folgende Ausarbeitung gliedert sich analog zu den Beobachtungen im Kaur-Review und ergänzt diesen mit Erkenntnissen basierend auf unserer Literaturrecherche (Tabelle 1.2).

##### 1.4.1. Kalzium und Reaktive Sauerstoffspezies

Umweltfaktoren wie nicht optimale Lichtintensität, Wasserverfügbarkeit, Temperatur oder Belastung durch Pathogene führen in Pflanzen zu Stressreaktionen. Stellt sich dadurch ein Ungleichgewicht zwischen der Produktion und Neutralisierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) ein, wird dies als oxidativer Stress bezeichnet (Xie

et al., 2019). Viele ROS-Spezies haben eine kurze Lebensdauer, sind aber hoch reaktiv. In Pflanzen sind die wichtigsten ROS-Spezies Superoxid, Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), das Hydroxidradikal, und der Singulett-Sauerstoff (Akter et al., 2021), welche alle mit verschiedenen Methoden verlässlich nachgewiesen werden können. Von diesen Spezies ist  $\text{H}_2\text{O}_2$  das stabilste und wird deswegen oft als Stressmarker verwendet. Wenn ROS weitere Biomoleküle oxidieren, spiegeln diese Modifizierungen den Redox-Status der Zelle wider. Diese Modifizierungen werden als Redox-Marker bezeichnet. Auch diese werden als Stressmarker für oxidativen Stress verwendet. Hier wird häufig der Malondialdehyd-(MDA) Gehalt betrachtet. In Pflanzen gibt es bislang keine Kategorisierung über eine besondere Eignung der unterschiedlichen Stressmarker, da es zahlreiche, verlässliche Nachweismethoden gibt (Akter et al., 2021).  $\text{H}_2\text{O}_2$  gehört zur Gruppe der ROS und wird vermehrt unter oxidativen Stressbedingungen produziert, so dass auf Grund des Gehalts ein Rückschluss auf das Stresslevel der Pflanze möglich ist (Cheeseman, 2007). Ein Anstieg von ROS führt zu Schäden in Zellmembranen durch verstärkte Lipidperoxidation, deren Endprodukt MDA so ebenfalls einen Hinweis auf das Stresslevel geben kann (Zhang et al., 2021).

Im Kaur-Review wird eine erhöhte ROS-Produktion zusammen mit einem Anstieg des zellulären Kalziumlevels als Reaktion von Pflanzen auf HF-EMF beschrieben. Gleichzeitig wird auch ein Anstieg von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und die Veränderung einiger damit in Zusammenhang stehender Enzyme, wie beispielsweise Katalasen, Peroxidasen oder Dehydrogenasen erwähnt. Diese zelluläre Reaktion wird als universell, also Frequenz- und Pflanzenart unspezifisch, eingeschätzt. Eine erhöhte ROS-Stressmarkerproduktion, am Beispiel von MDA, wird allerdings laut Kaur-Review nur in vereinzelt Studien berichtet.

Auch in neueren Studien nach 2021 wurde geprüft, ob eine Exposition mit HF-EMF zu oxidativen Stressreaktionen in Pflanzen führt (Tabelle 1.3), indem verschiedene antioxidative Enzyme bezüglich ihrer Proteinaktivität untersucht wurden (Kundu et al., 2021b; Kundu et al., 2021a; Upadhyaya et al., 2021b; Johal et al., 2022; Upadhyaya et al., 2022b; Handa et al., 2023; Porcher et al., 2023; Sharma et al., 2023a; Sharma et al., 2023b). Die Enzymaktivitäten von Superoxid Dismutase (SOD), Peroxidase (POD), Katalase (CAT) und Ascorbatperoxidase (APX), die für den Abbau von Superoxid bzw.  $\text{H}_2\text{O}_2$  verantwortlich sind, waren im Vergleich zu nicht exponierten

Proben deutlich erhöht, was auf eine erhöhte Aktivität des antioxidativen Abwehrmechanismus und damit auf oxidativen Stress hindeutet (Huseynova et al., 2013; Szollosi, 2014; Johal et al., 2022; Upadhyaya et al., 2022b; Handa et al., 2023; Porcher et al., 2023; Sharma et al., 2023b; Sharma et al., 2023a). In Kichererbsen und Kohl konnte eine zeitabhängige Zunahme der Enzymaktivität von SOD und POD beobachtet werden (Johal et al., 2022; Handa et al., 2023). Allerdings wurde in der Kichererbsenstudie die biochemische Analyse mit nur jeweils einer Probe durchgeführt. Das von Johal et al. verwendete Expositionssystem, Signalgenerator im „offenen“ Raum (2850 MHz, 1 h, 2 h, oder 4 h), kann als ungeeignet eingeschätzt werden (siehe 1.3.2). Somit sind diese Ergebnisse nicht verlässlich. Das von Handa et al. verwendete Expositionssystem, Signalgenerator im geschirmten Raum (2850 MHz, 1 h, 2 h, oder 4 h pro Tag über 7 Tage), bedarf genauerer Beschreibung, um die Expositionsumgebung zweifelsfrei charakterisieren zu können. Da gleichzeitig die Handhabung der Kontrolle nicht beschrieben ist, sollten die Ergebnisse auch hier kritisch betrachtet werden. Eine ähnliche Bewertung hinsichtlich des Expositionssystems gilt zur Einschätzung für die beobachtete Steigerung der Enzymaktivitäten von POD, SOD, CAT und APX in Bockshornklee nach siebentägiger Exposition (900 MHz und 1800 MHz). Die gleichen Studien zeigten auch eine Zunahme der Aktivitäten von Glutathion Reduktase und Glutathion-S-Transferase, beides wichtige Akteure im Redoxsystem (Sharma et al., 2023a; Sharma et al., 2023b). In Tomatenpflanzen wurde zunächst eine erhöhte Aktivität von POD beobachtet, die jedoch nach 48 h unter den Wert der Kontrolle fiel (Upadhyaya et al., 2022b). Auch hier ist das Expositionssystem zu beanstanden (Wendelantenne im „offenen“ Raum, 1.3.2). Zusätzlich ist anzumerken, dass keine Scheinbehandlung als Kontrolle verwendet wurde, da die Behandlungsgruppe zur Exposition in ein Labor überführt wurde, während Kontrollpflanzen im Gewächshaus verblieben, was bereits zu Unterschieden hinsichtlich des Stresslevels führen kann.

In Arabidopsis (2450 MHz, 100 V/m, 30 min), Kohl (2850 MHz, 1 h, 2 h oder 4 h pro Tag über 7 Tage) und Tomaten (1800 MHz, 8 V/m, 12 h, 60 h, 120 h) konnte ein Anstieg des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Gehalts (abhängig von der Expositionsdauer) festgestellt werden, dies traf jedoch nicht auf Kichererbsen zu (2850 MHz, 0,522 W/m<sup>2</sup>, 1 h, 2 h, 3 h oder 4 h Johal et al., 2022; Upadhyaya et al., 2022b; Handa et al., 2023; Porcher et al., 2023). Stattdessen verzeichneten die Forschenden einen Anstieg des MDA-Gehalts

in Kichererbsen in Abhängigkeit von der Expositionsdauer, der wiederum nicht in Arabidopsis zu messen war (Johal et al., 2022; Porcher et al., 2023). Auch in Bockshornklee wurde ein ca. 14-fach erhöhter MDA-Gehalt als Reaktion auf HF-EMF (1800 MHz, 4 h oder 8 h pro Tag über 7 Tage) festgestellt (Sharma et al., 2023b). Überraschenderweise zeigten Bockshornkleepflanzen, die mit 900 MHz behandelt wurden, einen 87-fachen Anstieg des MDA-Gehalts bei ansonsten gleicher Methodik (Sharma et al., 2023a). In Kohl wurde ein kurzfristiger Anstieg des MDA-Gehalts in Abhängigkeit der Expositionsdauer gemessen (Handa et al., 2023). Von diesen Studien ist bezüglich des Expositionssystems nur die Arabidopsis-Studie (Hornantenne im geschirmten Raum, 1.3.1.4) verlässlich, wobei eine längerfristige Messerfassung im Expositionssystem fehlt. Upadhyaya et al. und Handa et al. führten zusätzlich eine Messung der Radikalfängereigenschaften von Pflanzenextrakten nach HF-EMF-Exposition aus Winterkirschen, Tomaten und Kohl durch, um die antioxidative Aktivität der Pflanzen zu bestimmen. Eine Exposition von Winterkirschen und Tomaten bis zu 24 h führte zu einer Zunahme der 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl- (DPPH) Aktivität, längere Exposition jedoch zur Abnahme. Es gilt hervorzuheben, dass der Stichprobenumfang und die zugrundeliegende verwendete Statistik nicht eindeutig beschrieben wurden. Gleichzeitig ist das Expositionssystem in den beiden Studien ungeeignet (Upadhyaya et al., 2021; Upadhyaya et al., 2022b; siehe auch 1.3.2). Gegensätzlich dazu wurde in Kohl eine stetige Zunahme der DPPH-Aktivität veröffentlicht. Insgesamt wurde hier eine dosisabhängige Zunahme der antioxidativen Gesamtaktivität durch HF-EMF-Exposition beobachtet (Handa et al., 2023). Zusätzlich zeigte eine Studie in Mais, dass eine Exposition bei 2,45 GHz für bis zu 25 Tage zu keiner Veränderung des isoenzymatischen Profils von Peroxidasen oder SOD führt, wodurch geschlussfolgert wurde, dass diese Art von Exposition in Mais zu keinem Anstieg des oxidativen Stresses führt (Surducun et al., 2013). Auch hier müssen die Ergebnisse durch die Verwendung eines ungeeigneten Expositionssystems hinterfragt werden.

**Tabelle 1.3:** Zusammenfassung der beobachteten Effekte auf Kalzium und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) aus HF-EMF-Studien ab 2021 und Studien, die im Kaur-Review nicht zitiert wurden. <sup>1</sup> nach 48 h Abnahme im Vergleich zur Kontrolle, <sup>2</sup> nur bis 1 h nach Exposition.

Beobachteter Parameter	Änderung	Spezies	Autoren
Aktivität von APX	Zunahme	Bockshornklee (in Wurzeln nach 4/8h)	Sharma et al., 2023a, b
Aktivität von CAT	Zunahme	Bockshornklee, Rotkohl, Grünkohl	Sharma et al., 2023b, Handa et al., 2023
Aktivität von GR	Zunahme	Bockshornklee (nach 8h)	Sharma et al., 2023a, b
Aktivität von GST	Zunahme	Bockshornklee (nach 8h)	Sharma et al., 2023a, b
Aktivität von POD	Zunahme	Kichererbse, Bockshornklee, Tomate <sup>1</sup> , Grünkohl, Rotkohl	Johal et al., 2022, Sharma et al., 2023a, b, Upadhyaya et al., 2022b, Handa et al., 2023
Aktivität von SOD	Zunahme	Kichererbse, Bockshornklee (nach 8h), Grünkohl, Rotkohl	Johal et al., 2022, Sharma et al., 2023a, b, Handa et al., 2023
Aktivität von DPPH	Zunahme	Winterkirsche <sup>1</sup> , Tomate <sup>1</sup> , Rotkohl, Grünkohl	Upadhyaya et al., 2021a, 2022b, Handa et al., 2023
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Gehalt	Zunahme	Arabidopsis, Tomate, Grünkohl, Rotkohl	Porcher et al., 2023, Upadhyaya et al., 2022b, Handa et al., 2023
MDA-Gehalt	Zunahme	Kichererbse, Bockshornklee (nach 8h), Rotkohl <sup>2</sup> , Grünkohl <sup>2</sup>	Johal et al., 2022, Sharma et al., 2023a, b, Handa et al., 2023
antioxidative Gesamtaktivität	Zunahme	Rotkohl, Grünkohl	Handa et al., 2023
MDA-Gehalt	keine Änderung	Arabidopsis	Porcher et al., 2023
Glutathiongehalt	keine Änderung	Arabidopsis	Porcher et al., 2023
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Gehalt	keine Änderung	Kichererbse	Johal et al., 2022
Isoenzymatisches Profil von SOD und Peroxidasen	keine Änderung	Mais	Surducan et al., 2013

#### 1.4.2. DNA-Schäden

Im Kaur-Review werden weiterhin mitotische und chromosomale Aberrationen als Effekt auf HF-EMF angesprochen. Hierfür werden mikroskopische Verfahren genutzt, mit denen es möglich ist, DNA und einzelne Zellstadien sichtbar zu machen. Durch Zählen und Zuordnung der Zellen zu den einzelnen Zellteilungsphasen kann dann beispielsweise ein mitotischer Index (Anzahl der Zellen, die sich gerade teilen/alle analysierten Zellen) berechnet werden oder auch die Häufigkeit verschiedener Chromosomenstörungen, unter anderem Mikrokerne, sichtbar gemacht werden. Mikrokerne sind Chromosomenbruchstücke oder auch ganze Chromosomen, die während der Zellteilung nicht in den Zellkern integriert wurden. Der Mikrokerntest wird in der Toxikologie häufig verwendet, um genotoxische Effekte in Zellen nachzuweisen. Studien im Kaur-Review zeigten keinen eindeutigen Zusammenhang zwischen einer Änderung des mitotischen Index und Chromosomenaberrationen. In Zwiebeln kam es zu einer signifikanten, frequenz-abhängigen Zunahme des mitotischen Index und von Chromosomenstörungen, inklusive einer Anreicherung an Mikrokernen. In Kichererbsen

hingegen wurde eine Abnahme des mitotischen Index bei gleichzeitiger Zunahme von Chromosomenstörungen beobachtet.

Răcuciu 2009 fand eine positive lineare Korrelation zwischen dem mitotischen Index und der Expositionsdauer (900 MHz, 20 mW, 1 h – 36 h) in Maiswurzeln (Răcuciu, 2009). Zusätzlich wurde ein polynomialer Zusammenhang zwischen der Expositionsdauer und dem Auftreten von Chromosomenaberrationen festgestellt (Tabelle 1.4). Das heißt, dass sich mit andauernder Bestrahlung mehr Zellen in der Teilungsphase befanden, die zugleich vermehrt mit Chromosomenstörungen einhergingen (Răcuciu, 2009). Obwohl das Expositionssystem in dieser Studie prinzipiell geeignet wäre (TEM-Zelle, siehe 1.3.1.1), fand keine Überprüfung der TEM-Feldverteilung statt. Zusätzlich fehlt die Angabe wichtiger statistischer Parameter, um objektive Rückschlüsse auf die Verlässlichkeit der erhobenen Daten ziehen zu können. Ähnliche Einschränkungen bezüglich des Expositionssystems und der Statistik treffen auch auf eine weitere Studie derselben Arbeitsgruppe aus dem Jahr 2018 zu (Răcuciu et al., 2018). Auch hier wurde eine Zunahme des mitotischen Index und eine vermehrte Anzahl an Chromosomenstörungen nach Exposition bei 1 GHz abhängig zur Expositionsdauer festgestellt. In Bockshornkleewurzeln wurde ebenfalls ein Anstieg von Chromosomenstörungen abhängig von der Expositionsdauer festgestellt (Tabelle 1.4). Die verwendete Frequenz war dabei unerheblich für den Anteil fehlerhafter Chromosomen (Sharma et al., 2023b; Sharma et al., 2023a). Wie bereits im Abschnitt 1.4.1 (Kalzium und ROS) beschrieben sind die Daten dieser Studien nicht verlässlich, sodass kein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Chromosomenstörungen und HF-EMF-Exposition hieraus geschlussfolgert werden kann.

**Tabelle 1.4:** Zusammenfassung der beobachteten Effekte auf DNA-Schäden aus HF-EMF-Studien ab 2021 und Studien, die im Kaur-Review nicht zitiert wurden.

Beobachteter Parameter	Änderung	Spezies	Autoren
Mitotischer Index	Zunahme	Mais	Răcuciu et al., 2009, 2018
Chromosomale Abberationen	Zunahme	Mais, Bockshornklee	Răcuciu et al., 2009, 2018 Sharma et al., 2023a, b

### 1.4.3. Genexpressionsänderungen

Auf Genexpressionsebene fällt auf, dass es erstens nur wenige Studien gibt, die sich mit Genexpressionsänderungen in diesem Zusammenhang befassen und zweitens, dass nur vereinzelte Gene genannt werden, die mit einer Änderung auf HF-EMF

reagieren. Im Kaur-Review wird gezeigt, dass die Gene *BASIC LEUCINE ZIPPER 1 (bZIP)*, *CALMODULIN*, *CALCIUM-DEPENDENT PROTEIN KINASE (CDPK)*, *CHLOROPLAST mRNA BINDING PROTEIN* und *PROTEINASE INHIBITOR II (PI)* in Tomaten, innerhalb kürzester Zeit nach EMF-Exposition hochreguliert zu werden scheinen. Zusätzlich wurde unabhängig davon berichtet, dass Gene, die mit dem Phytohormon Ethylen zu tun haben, bei Exposition mit 9,3 GHz (5 – 15min) runterreguliert werden. Eine doppelt verblindete Transkriptom-Studie zeigte allerdings, dass in Arabidopsis Suspensionskulturen nur einige wenige Transkriptänderungen (1,9 GHz, 24 h) zu beobachten waren (Engelmann et al., 2008).

Auch in den neuen Studien wurden diverse Gene auf ihre Expressionsänderung durch HF-EMF-Exposition hin untersucht (Tabelle 1.5). Alle hier betrachteten Studien verwendeten die Methode der quantitativen Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR). Diese Methode eignet sich zur quantitativen Charakterisierung der Expression einzelner Kandidatengene unter verschiedenen Bedingungen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe.

Porcher et al. untersuchten Genexpressionsänderungen in Arabidopsis nach einmaliger HF-EMF-Exposition (2450 MHz, 100 V/m, 30 min). *APX1*, welches für das stressregulierte Enzym APX kodiert (siehe Abschnitt 1.4.1), zeigte eine erhöhte Genexpression 30 min und 60 min nach HF-EMF-Exposition. Im Vergleich dazu, war die Genexpression von *CAT2*, einem Gen für Katalase 30 Minuten nach Exposition verringert (Porcher et al., 2023). Zusätzlich wurden auch die Expressionen von *RESPIRATORY BURST OXIDASE homolog, isoform F (RBOHF)* und des Transkriptionsfaktors *ZINC FINGER OF ARABIDOPSIS 12 (ZAT12)* genauer betrachtet. Beide Gene sind direkt bei Stressreaktionen beteiligt, so dass eine Hochregulation auf ein steigendes Stresslevel hindeuten kann. ZAT12, ein Zink-Finger Transkriptionsfaktor, ist Teil des ROS-Signaltransduktionsweges und reguliert die Expression vieler Stressgene. RBOHF spielt eine wichtige Rolle bei der Produktion von ROS (Davletova et al., 2005; Han et al., 2019). Beide Gene waren 30 bzw. 60 min nach HF-EMF-Exposition hochreguliert. Zusätzlich konnte eine Verdopplung der Expression von *TOUCH1 (TCH1)*, welches für *CALMODULIN* codiert, bereits 30 Minuten nach Exposition beobachtet werden (Porcher et al., 2023). Diese Ergebnisse erscheinen interessant und sollten mit einer längerfristige Messerfassung im Expositionssystem wiederholt werden.

Die Hochregulation von *CALMODULIN* und von *bZIP*, welche bereits in Tomaten festgestellt wurde (Kaur et al., 2021), konnte auch in Reis teilweise beobachtet werden. Kundu et al. verzeichneten eine etwa doppelt so starke Expression von *CALMODULIN* in exponierten Reispflanzen im Vergleich zur Kontrolle unabhängig von der Dauer der Exposition (32-tägige Exposition mit 6 h/Tag oder 2,5 h einmalige Exposition). Interessanterweise, zeigte *bZIP* eine Steigerung der Expression um das 260-fache bei einmaliger 2,5-stündiger Exposition und eine Verringerung der Expression um das 2-fache gegenüber dem Wert der Kontrollgruppe bei andauernder Exposition (6 h/Tag über 32 Tage), was die Autoren als Anpassung älterer Pflanzen an EMF-Exposition deuteten. Die ebenfalls zuvor beschriebenen Änderungen der Expression von *PI*, *CDPK1* traten in beiden Reisstudien jedoch nicht ein, bzw. waren laut Auswertung nicht signifikant (Kundu et al., 2021a; Kundu et al., 2021b). Für beide Studien gilt, dass das verwendete Expositionssystem (Modenverwirbelungskammer ohne *Stirrer*) keine definierte Exposition/Feldstärke zulässt und somit ungeeignet ist. Hinsichtlich der Statistik ist außerdem anzumerken, dass der durchgeführte gepaarte *t*-test bei unabhängigen Stichproben zu inkorrekten Signifikanzwerten führen kann, was die Aussagekraft der Ergebnisse zusätzlich beeinträchtigt.

Eine aktuelle Studie aus Deutschland untersuchte den Einfluss von HF-EMF auf die Genexpression von *VIOLAXANTHIN DE-EPOXIDASE (VDE)* und *ZEAXANTHIN EPOXIDASE (ZEP)* in Salatpflanzen (Tran et al., 2023). Beide Gene sind Teil des Xanthophyll-Zyklus und somit bei der Regulation der Lichtabsorption und an der Synthese von Abszisinäure (ABA) beteiligt, was sie zu interessanten Kandidatengenen bei der Charakterisierung von Stressreaktionen macht (Vishwakarma et al., 2017; Goss and Latowski, 2020). Die Autoren schlussfolgerten, dass beide Gene als Reaktion auf HF-EMF (1880 – 1900 MHz; 2,4 – 5 GHz, zwischen 6 h und 48 h) ab 12 h nach Exposition signifikant runterreguliert werden. Das verwendete Expositionssystem (Handy und Router ohne Schirmung in einer „offenen“ Strahlungsumgebung, 1.3.2) ist wiederum ungeeignet. Zusätzlich befanden sich die in dieser Studie verwendeten Kontrollpflanzen in einer anderen Phytokammer als die exponierten Pflanzen, wodurch es bereits zu Unterschieden zwischen den Gruppen kommen kann.

**Tabelle 1.5:** Zusammenfassung der beobachteten Effekte auf Genexpressionen aus HF-EMF-Studien ab 2021 und Studien, die im Kaur-Review nicht zitiert wurden. <sup>1</sup> nach 2,5 h Abnahme gegenüber der Kontrolle

Beobachteter Parameter	Änderung	Spezies	Autoren
Expression von <i>APX1</i>	Zunahme	Arabidopsis	Porcher et al., 2023
Expression von <i>CAT2</i>	Abnahme	Arabidopsis	Porcher et al., 2023
Expression von <i>bZIP</i>	kurzfristige Zunahme	Reis <sup>1</sup>	Kundu et al., 2021a
Expression von <i>CALMODULIN</i>	Zunahme	Reis, Arabidopsis	Kundu et al., 2021a, b, Porcher et al., 2023
Expression von <i>Phytochrome B</i>	Zunahme	Reis	Kundu et al., 2021a, b
Expression von <i>Phytochrome C</i>	Zunahme	Reis	Kundu et al., 2021a
Expression von <i>RBOHF</i>	Zunahme	Arabidopsis	Porcher et al., 2023
Expression von <i>VDE</i>	Abnahme	Salat	Tran et al., 2023
Expression von <i>ZAT12</i> TF	Zunahme	Arabidopsis	Porcher et al., 2023
Expression von <i>ZEP</i>	Abnahme	Salat	Tran et al., 2023
Expression von <i>PIN</i>	keine Änderung	Reis	Kundu et al., 2021a, b
Expression von <i>CDPK1</i>	keine Änderung	Reis	Kundu et al., 2021a, b
Expression von <i>TB1</i>	keine Änderung	Reis	Kundu et al., 2021a
Expression von <i>APX1</i>	keine Änderung 40 Tage nach Exposition	Reis	Kundu et al., 2021b

#### 1.4.4. Einfluss von EMF auf Pflanzenwachstumsparameter

In Bezug auf Pflanzenwachstumsparameter wird im Kaur-Review festgehalten, dass kurze Expositionen von Saatgut mit EMF (5,28 MHz, 15 min) positive Effekte auf anschließendes Keimungswachstum der schwarzen Maulbeere und auf Rhododendronarten haben kann. Im Gegensatz dazu, werden bei Langzeitexpositionen eher negative Effekte beschrieben, die mit dem Auftreten von Pflanzen mit abnormer Entwicklung oder Morphologie einhergingen. Aus Beobachtungen über ein verzögertes und vermindertes Sprosswachstums nach EMF Exposition (900 MHz, 5 V/m) generierten Grémiaux *et al.*, 2016 die Hypothese, dass Pflanzen ein mögliches EMF-Signal speichern könnten und dies zu verzögerten Wachstumsdefekten führt. Die verwendete Modenverwirbelungskammer könnte prinzipiell geeignet für solche Studien sein (1.3.1.3), allerdings fehlen viele Detailangaben, die Gewissheit über die Expositionsbedingungen bieten würden.

Neuere Studien deuten eine negative Auswirkung von HF-EMF auf die Keimungsrate von exponiertem Saatgut von Kichererbsen, Reis, Tomaten und Bockshornklee an (Tabelle 1.6; Kundu et al., 2021b; Johal et al., 2022; Upadhyaya et al., 2022b; Sharma et al., 2023b; Sharma et al., 2023a). Erste Effekte traten bereits nach einer zweistündigen Exposition von Bockshornkleesamen (900 MHz) auf, konnten jedoch

im späteren Verlauf nicht mehr beobachtet werden, sodass die Autoren eine Verzögerung der Keimung unter kurzfristiger HF-EMF-Exposition schlussfolgern. Eine Verlängerung der Expositionsdauer (4 h oder 8 h) führte auch im späteren Verlauf zu einer signifikant verringerten Keimungsrate (Sharma et al., 2023a). Eine Erhöhung der Frequenz auf 1800 MHz führte nur bei längerer Expositionsdauer (8 h) zu einer deutlich stärkeren Reduktion der Keimungsrate im Vergleich zu 900 MHz (Sharma et al., 2023b). In einer Studie aus 2013 wurde eine erhöhte Keimungsrate bei Mais (Exposition bei 2,45 GHz für 25 Tage) und bei Gartenbohnen (Exposition bei 2,45 GHz für 14 Tage) gezeigt (Surducan et al., 2013).

Negative Effekte wurden auch für Wurzellängen in Tomaten, Kohl, Kichererbsen und für Sprosslängen zusätzlich in Mais beobachtet (Tabelle 1.6). Das Ausmaß dieser Effekte war abhängig von der Expositionsdauer (Răcuciu et al., 2015; Johal et al., 2022; Upadhyaya et al., 2022b; Handa et al., 2023). Im Gegensatz dazu konnte bei Bockshornklee kein Zusammenhang zwischen der Expositionsdauer/Frequenz und den beobachteten Spross- und Wurzellängen festgestellt werden. Zwar führte eine Exposition über sieben Tage zu einem verkürzten Spross bzw. einer verkürzten Wurzel gegenüber unbehandelten Pflanzen, jedoch gab es keinen Unterschied zwischen den verschiedenen Expositionsszenarien (4 h/Tag bzw. 8 h/Tag bei 900 bzw. 1800 MHz; Sharma et al., 2023b; Sharma et al., 2023a). Auch in dieser Kategorie tauchen widersprüchliche Ergebnisse auf, da für Mais und Gartenbohne bei 2,45 GHz für 25 Tage (Mais) bzw. 14 Tage (Gartenbohne) verlängertes Epikotyl- und Wurzelwachstum beschrieben wurde (Surducan et al., 2013).

Auch bei Betrachtung der Biomasse konnten negative Effekte von HF-EMF-Exposition in mehreren Spezies beobachtet werden (Tabelle 1.6). Das Frisch- und/oder Trockengewicht von Kichererbsen, Tomaten, Kohl und Bockshornklee war signifikant verringert nach Exposition mit HF-EMF, abhängig von Intensität und Dauer der Exposition (Johal et al., 2022; Upadhyaya et al., 2022b; Handa et al., 2023; Sharma et al., 2023b; Sharma et al., 2023a). In den untersuchten Tomatenpflanzen ging diese Reduktion der Biomasse einher mit einer geringeren Blattgröße und Blattzahl (Upadhyaya et al., 2022b). Tran et al. beobachteten unter Feldbedingungen zudem eine Verfrühung des Blühzeitpunktes in Salatpflanzen. Dieser Effekt ließ sich jedoch nicht unter kontrollierten Gewächshausbedingungen replizieren (Tran et al., 2023). Im Gegensatz, ließ sich in Mais kein Unterschied in Frisch- oder Trockengewicht nach

Exposition bei 418 MHz für 1 h, 2 h, 4 h, oder 12 h beobachten (Ursache et al., 2009). Unter Feldbedingungen wurde eine Zunahme der Pflanzengröße und der Blattfläche bei Hasenklee und Acker-Hellerkraut nach 2-monatiger Exposition (866 - 868 MHz) berichtet (Czerwiński et al., 2023). Dieselben Autoren zeigten des Weiteren einen kurzzeitigen Anstieg des grünen Blattanteils (nach 1-monatiger Exposition, 866 – 868 MHz) von Hasenklee, welcher aber bei andauernder Exposition signifikant absank. Dies korrelierte mit einem kurzzeitigen Absinken der seneszenten Blattfläche (nach 1-monatiger Exposition), welche bei andauernder Exposition signifikant zunahm. Zusätzlich wurde eine Änderung der Blatorientierung in Hasenklee festgestellt (Czerwiński et al., 2023).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass alle Studien mit Ausnahme von Răcuciu et al., 2015, Ursache et al., 2009, Czerwinski et al., 2023 und Tran et al., 2023 prinzipiell ungeeignete Expositionssysteme verwendet haben (1.3.2). Es gilt weiterhin zu bedenken, dass die in Răcuciu (2015) verwendete TEM-Zelle an ihrem oberen Frequenzbereich verwendet wurde und keine Überprüfung der gewünschten TEM-Feldverteilung stattfand. Des Weiteren sind die Angaben zum Expositionssystem bei Ursache et al., 2009 unzureichend und die Expositionsumgebung bei Tran et al., 2023 undefiniert, so dass die hier angegebenen Effekte von HF-EMF auf Pflanzenwachstumsparameter kritisch hinterfragt werden sollten. Dazu kommt, dass die Handhabung und/oder die Beschreibung der Kontrollgruppen in (Răcuciu et al., 2015; Johal et al., 2022; Upadhyaya et al., 2022b; Handa et al., 2023; Tran et al., 2023) unzureichend sind, im Gegensatz zu (Kundu et al., 2021b; Sharma et al., 2023a; Sharma et al., 2023b). Den nachvollziehbaren Ausführungen zum Expositionssystem von Czerwinski et al., 2023 bleibt entgegenzusetzen, dass die biologischen Parameter nicht gemessen, sondern mittels Bildanalyse ermittelt wurden. Während solche Verfahren bei Einzelpflanzen gut mit tatsächlichen Messwerten korrelieren können, ist eine verlässliche Auswertung von mehreren Pflanzen in einem Bild häufig schwierig und fehleranfällig.

**Tabelle 1.6:** Zusammenfassung der beobachteten Effekte auf Pflanzenwachstumsparameter aus HF-EMF-Studien ab 2021 und Studien, die im Kaur-Review nicht zitiert wurden.

Beobachteter Parameter	Änderung	Spezies	Autoren
Frischgewicht	Abnahme	Kichererbse, Tomate, Bockshornklee	Johal et al., 2022, Upadhyaya et al., 2022b, Sharma et al., 2023a, b
Frischgewicht	Keine Änderung	Mais	Ursache et al., 2009

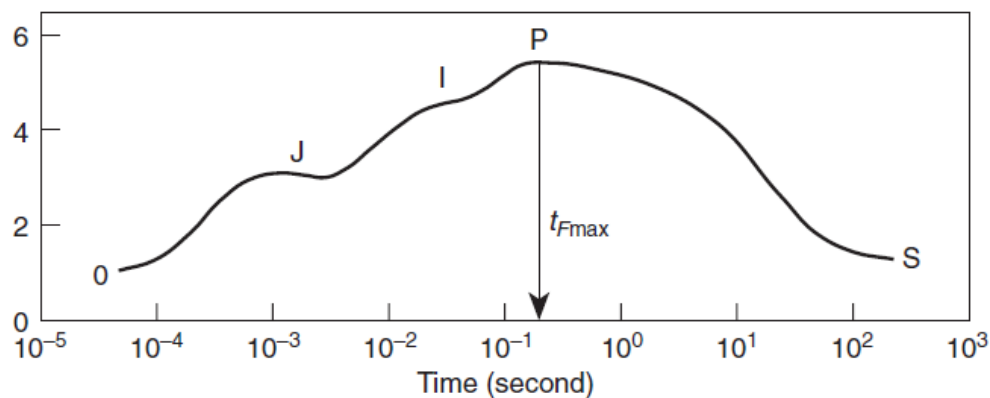
Beobachteter Parameter	Änderung	Spezies	Autoren
Trockengewicht	Abnahme	Kichererbse, Tomate, Grünkohl, Rotkohl	Johal et al., 2022, Upadhyaya et al., 2022b, Handa et al., 2023
Trockengewicht	keine Änderung	Mais	Ursache et al., 2009
Blattgröße	Abnahme	Tomate	Upadhyaya et al., 2022b
Blattfläche	Zunahme	Hasenkleee	Czerwinski et al., 2023
Blattanzahl	Abnahme	Tomate	Upadhyaya et al., 2022b
Blattorientierung	Änderung	Hasenkleee	Czerwinski et al., 2023
Blattanteil grün / Blattanteil seneszent	Änderung	Hasenkleee	Czerwinski et al., 2023
Blühzeitpunkt	Verfrühung	Salat	Tran et al., 2023
Keimungsrate	Abnahme	Kichererbse, Reis, Bockshornklee, Tomate	Johal et al., 2022, Kundu et al., 2021a, Sharma et al., 2023a, b, Upadhyaya et al., 2022b
Keimungsrate	Zunahme	Mais, Gartenbohne	Surducun et al., 2013
Sprosslänge	Abnahme	Kichererbse, Mais, Bockshornklee, Tomate, Grünkohl, Rotkohl	Johal et al., 2022, Răcuciu et al., 2015, Sharma et al., 2023a, b, Upadhyaya et al., 2022b, Handa et al., 2023
Sprosslänge	Zunahme	Mais, Gartenbohne, Hasenkleee, Acker-Hellerkraut	Surducun et al., 2013, Czerwinski et al., 2023
Wurzellänge	Abnahme	Kichererbse, Tomate, Bockshornklee, Grünkohl, Rotkohl	Johal et al., 2022, Upadhyaya et al., 2022b, Sharma et al., 2023a, b, Handa et al., 2023
Wurzellänge	Zunahme	Mais, Gartenbohne	Surducun, et al., 2013

#### 1.4.5. Photosynthese

Die photosynthetische Kapazität von Pflanzen wird maßgeblich durch den Chlorophyllgehalt bestimmt. Unter Stressbedingungen kann der Chlorophyllgehalt sinken, was zu einer Verminderung der photosynthetischen Effizienz und damit einer Abnahme der Produktion von Kohlenhydraten und Energie führt (Liu et al., 2018). Neben Chlorophyll zählen auch Karotinoide zu den photosynthetisch-aktiven Pigmenten, deren Gehalt ebenfalls durch Stresseinwirkung beeinflusst werden kann (Maoka, 2020).

Beschriebene Einflüsse von EMF auf Photosynthese bei Pflanzen sind laut Kaur-Review nicht eindeutig. Verschiedene Studien haben morphologische Veränderungen an Chloroplasten, Zellwänden oder Mitochondrien in unterschiedlichen Pflanzenarten und bei Untersuchungen verschiedener Frequenzen beschrieben. Während Langzeitexpositionen eher eine Reduktion der photosynthetischen Aktivität zeigen, wurde für Kurzzeitexposition ein positiver Einfluss auf photosynthetische Pigmente beschrieben. Im Bereich des Primärmetabolismus werden zusätzlich Effekte auf Kohlenhydratgehalte verschiedener Pflanzenarten erwähnt.

Auch in aktuellen Studien wurde der Effekt von HF-EMF auf verschiedene Photosynthese-Parameter genauer untersucht (Tabelle 1.7). Tran et al. stellten einen negativen Einfluss von HF-EMF auf die Photosyntheseleistung von Salatpflanzen fest (Tran et al., 2023). Die Effekte auf Photosynthese-Parameter traten allerdings nur in einzelnen Feldversuchen auf und waren nicht im Gewächshaus-Versuch unter kontrollierten Bedingungen zu beobachten. Die Forschenden verwendeten den sogenannten OJIP oder auch JIP- Test, der auf der Chlorophyll a-Fluoreszenzkurve basiert (Strasser et al., 2014), Abb. 1.2).



**Abbildung 1.2:** Ein typischer Fluoreszenztransient, der durch Beleuchtung (saturiertes Licht) eines dunkel-adaptierten photosynthetisch aktiven Blatts zu messen ist (aus (Strasser et al., 2014)).

Ein Zusammenhang zwischen dem Verlauf dieses Fluoreszenztransienten mit verschiedenen Photosynthese-Parameter gilt als unumstritten, sodass diese, wenn richtig durchgeführt, sehr verlässliche Methode in der heutigen Photosynthese-Forschung regelmäßig Anwendung findet. Dabei werden die Fluoreszenzintensitäten über einen bestimmten Zeitraum gemessen und daraus verschiedene Photosynthese-Parameter berechnet (Strasser et al., 2014). Der Verlauf dieser Kurve wird nicht nur von äußeren Faktoren (Lichtverhältnisse oder Stressfaktoren), sondern auch unter anderem vom Entwicklungsstadium der Pflanze beeinflusst. Damit ist es essentiell, dass dieselbe Pflanze an definierten Blättern und Blattpositionen mehrfach beprobt wird, was in der Studie von Tran et al. nicht ausreichend Berücksichtigung fand.

In Kichererbsen und Kohl wurde eine Reduktion des Chlorophyllgehaltes nach HF-EMF-Exposition festgestellt (Johal et al., 2022; Handa et al., 2023). In Tomatenpflanzen konnte ein kurzfristiger Anstieg des Chlorophyllgehalts nach Exposition (bis 12 h) beobachtet werden, bevor der Wert unter den der Kontrolle sank (Upadhyaya et al., 2022b). Ein solcher kurzfristiger Anstieg wurde auch in der

Gartenbohne (2,45 GHz, 2 Tage) beobachtet, wobei nach 8 oder 14-tägiger Exposition der Chlorophyllgehalt unverändert zur Kontrolle war (Surducan et al., 2013). Für Mais sind die Effekte von HF-EMF auf den Chlorophyllgehalt widersprüchlich, da in Răcuciu et al., 2015 eine Reduktion beschrieben wird, es bei Surducan et al., 2013 allerdings zu keiner Änderung im Chlorophyllgehalt bei Mais (2,45 GHz, 25 Tage) kam und bei Ursache et al., 2009 ein Anstieg des Chlorophyllgehalts nach kurzzeitiger Exposition (418 MHz, 1 h oder 2 h) beobachtet wurde.

Während in Tomaten (1800 MHz, 8 V/m, 12 h, 60 h, 120 h) nach HF-EMF-Exposition eine Zunahme des Karotinoidgehalts gemessen wurde (abhängig von der Expositionsdauer), wurde in Mais entweder eine Abnahme (1 GHz, 1-8 h) oder eine kurzzeitige Zunahme (418 MHz, 2 h) und in Kohl (2850 MHz, nur bei Expositionsdauer = 4 h pro Tag über 7 Tage) eine Abnahme beobachtet (Ursache et al., 2009; Răcuciu et al., 2015; Upadhyaya et al., 2022b; Handa et al., 2023) und keine Änderung in der Gartenbohne festgestellt (Surducan et al., 2013). Zusätzlich zeigten Handa et al. eine Zunahme des Anthocyangehalts in Abhängigkeit der Expositionsdauer in Kohl. Weitere Untersuchungen in Reis und Mais zeigten weder eine Änderung des Chlorophyll- noch des Karotinoidgehalts (Surducan et al., 2013; Kundu et al., 2021b).

Zusätzlich haben zwei Studien eine Änderung der nicht-photochemischen Löschung (*non-photochemical quenching* = NPQ) beobachtet (Senavirathna et al., 2014; Tran et al., 2023). NPQ ist ein Regelungsmechanismus, bei dem der Teil der Lichtenergie, der nicht durch Photosynthese umgewandelt werden kann, in Form von Wärme abgegeben wird. Ziel dabei ist es, den Photosyntheseapparat mit der optimalen Menge an Energie zu versorgen und die überschüssige Energie zu „vernichten“ (Horton and Ruban, 2005). Für die Quantifizierung des NPQ wird die Chlorophyll-Fluoreszenz-Analyse verwendet. Wie auch bei der OJIP-Methode ist es essentiell, dass dieselbe Pflanze an definierten Blättern und Blattpositionen mehrfach beprobt wird. In Wasserlinse (3,5 GHz, 5,5 GHz, 30 min oder 60 min) und in Salat (1890 MHz – 1900 MHz, 2,4 GHz und 5 GHz, 24 h, nur unter Lichtstress) wurde eine Abnahme des NPQ beobachtet (Senavirathna et al., 2014; Tran et al., 2023).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass nur die Studien von Răcuciu et al., 2015, Senavirathna et al., 2014, und Ursache et al., 2009 prinzipiell geeignete Expositionssysteme verwendet haben (TEM-Zelle, EMF-geschirmte Absorberkammer

mit Transmissionsantenne, 1.3.1). Es gilt weiterhin, dass, wie bereits geschildert, keine Überprüfung der gewünschten TEM-Feldverteilung (Răcuciu et al., 2015), eine unzureichende Beschreibung des Expositionssystems (Ursache et al., 2009) oder keine Kalibrierung der eingesetzten Antennen stattfand oder zumindest nicht beschrieben wurden (Senavirathna et al., 2014). Zusätzlich ist die Handhabung und/oder die Beschreibung der Kontrollgruppen in (Senavirathna et al., 2014; Răcuciu et al., 2015; Johal et al., 2022; Upadhyaya et al., 2022b; Handa et al., 2023; Tran et al., 2023) unzureichend, im Gegensatz zu Kundu et al. (2021a). Dementsprechend sollten auch hier die angegebenen Effekte von HF-EMF auf Photosynthese-Parameter kritisch hinterfragt werden.

**Tabelle 1.7:** Zusammenfassung der beobachteten Effekte auf Photosynthese-Parameter aus HF-EMF-Studien ab 2021 und Studien, die im Kaur-Review nicht zitiert wurden. <sup>1</sup> unter Lichtstress, <sup>2</sup> bis 12 h Zunahme gegenüber der Kontrolle, <sup>3</sup> nur 1 h nach letzter Exposition.

Beobachteter Parameter	Änderung	Spezies	Autoren
NPQ	Abnahme	Wasserlinse, Salat <sup>1</sup>	Senavirathna et al., 2014b, Tran et al., 2023
Chlorophyllgehalt	Abnahme	Kichererbse, Mais, Tomate <sup>2</sup> , Rotkohl, Grünkohl	Johal et al., 2022, Răcuciu et al., 2015, Upadhyaya et al., 2022b, Handa et al., 2023
Chlorophyllgehalt	Zunahme	Mais, Gartenbohne	Ursache et al., 2009 Surducan et al., 2013
Chlorophyllgehalt	keine Änderung	Mais	Surducan et al., 2013
Photosyntheseleistung	Abnahme	Salat	Tran et al., 2023
Karotinoidgehalt	Zunahme	Tomate, Mais	Upadhyaya et al., 2022b, Ursache et al., 2009
Karotinoidgehalt	Abnahme	Mais, Rotkohl <sup>3</sup> , Grünkohl	Răcuciu 2015, Handa et al., 2023
Karotinoidgehalt	keine Änderung	Mais, Gartenbohne	Surducan et al., 2013
Anthocyangehalt	Zunahme	Rotkohl, Grünkohl	Handa et al., 2023

#### 1.4.6. Sekundärmetabolismus

Zur Charakterisierung von Stressreaktionen in Pflanzen können weitere biochemische Parameter betrachtet werden. So können sekundäre Inhaltsstoffe wie phenolhaltige Verbindungen (z.B. Flavonoide), Alkaloide, flüchtige Verbindungen (Volatile), ätherische Öle, oder Verbindungen in der Vitamin C-Synthese, wie Dehydroascorbinsäure (DHA) antioxidative Eigenschaften haben, die zum Schutz der Zellen unter Stresseinwirkung beitragen können (Potters et al., 2004; Di Ferdinando et al., 2012; Kumar et al., 2023). Auch im Kaur-Review wurde nach HF-EMF-Exposition über Veränderungen unterschiedlicher Sekundärmetabolite berichtet.

In neueren Studien in Winterkirschen (900 MHz, 24 h – 72 h), Tomaten (1800 MHz, 12 h, 60 h, 120 h) und Kohl (2850 MHz, 1 h, 2 h, 4 h pro Tag über 7 Tage) konnte ein Anstieg des Phenol- und Flavonoid-Gehalts beobachtet werden (Upadhyaya et al., 2021b; Upadhyaya et al., 2022b; Handa et al., 2023). Gleichzeitig kam es aber in Kohl zu einer allgemeinen Abnahme des Polyphenolgehalts. In Arabidopsis wurde 1 h nach Exposition (2450 MHz, 30 min) ein Anstieg des DHA-Gehalts festgestellt (Porcher et al., 2023). DHA ist eine Vorstufe von Vitamin C, welches in einer Tomatenstudie jedoch nach HF-EMF-Exposition (1800 MHz, 12 h, 60 h, 120 h) abnahm (Upadhyaya et al., 2022b). Der Alkaloidgehalt in Kohl zeigte eine kurzfristige Zunahme nur direkt nach Exposition (2850 MHz, 4 h pro Tag über 1-7 Tage Handa et al., 2023).

Ausschließlich das von Porcher et al. verwendete Expositionssystem lässt sich als prinzipiell geeignet einstufen (Hornantenne im geschirmten Raum, 1.3.1.4). Auch hier müsste allerdings die Feldexposition anhand einer längeren Messerfassung nachgewiesen werden. Zusätzlich ist die Handhabung und/oder die Beschreibung der Kontrollgruppen auch nur bei Porcher et al. nachvollziehbar. Dementsprechend könnte lediglich der Anstieg des DHA-Gehalts als Effekt von HF-EMF auf den Sekundärmetabolismus angenommen werden, sollte aber unabhängig überprüft werden.

**Tabelle 1.8:** Zusammenfassung der beobachteten Effekte auf Sekundärmetabolite aus HF-EMF-Studien ab 2021 und Studien, die im Kaur-Review nicht zitiert wurden. <sup>1</sup> nach 24 h Abnahme gegenüber der Kontrolle.

Beobachteter Parameter	Änderung	Spezies	Autoren
Flavonoidgehalt	Zunahme	Winterkirsche <sup>1</sup> , Tomate <sup>1</sup> , Rotkohl, Grünkohl	Upadhyaya et al., 2021a, Handa et al., 2023
Phenolgehalt	Zunahme	Winterkirsche <sup>1</sup> , Tomate <sup>1</sup> , Rotkohl, Grünkohl	Upadhyaya et al., 2021a, Handa et al., 2023
DHA-Gehalt	Zunahme	Arabidopsis	Porcher et al., 2023
Vitamin C-Gehalt	Abnahme	Tomate	Upadhyaya et al., 2022b
Polyphenolgehalt	Abnahme	Rotkohl	Handa et al., 2023
Alkaloidgehalt	Zunahme	Rotkohl	Handa et al., 2023

### 1.5. Literatursuche zum Abschluss des Projekts (August 2025)

Gegen Ende des Projekts wurde am 29.08.2025 erneut eine Literaturrecherche durchgeführt. Dazu wurden die Datenbanken *Web of Science* and *Pubmed* mit dem angepassten Suchterm (Tabelle 1.1, Suche 3) nach relevanter Literatur durchsucht. Zusätzlich wurde auch die Datenbank „*Connected papers*“ ([Link zu Connected Papers](#)) nochmals nach Studien durchsucht, die thematisch mit dem Kaur-Review in

Verbindung gebracht werden können. Diese Suchen, gefiltert nach dem Zeitraum 2023 – 2025, ergaben 14 Publikationen, die in Tabelle 1.9 angegeben sind.

Darunter fanden sich 4 Übersichtsarbeiten (Feng et al., 2024; Panda et al., 2024; Razek, 2024; Recuero Virto et al., 2024). Von den Forschungsarbeiten fielen vier Studien raus, da sie thematisch (Magnetfeld-Studien oder keine biologischen Untersuchungen) nicht in das Forschungsvorhaben passten (Mukherjee et al., 2023; Faraz Ali et al., 2024; Jo et al., 2024) oder bereits als *Preprint* in der ursprünglichen Literatursuche auftauchten (Handa et al., 2024). Somit wurden sechs Forschungsarbeiten (González et al., 2024; Koleva and Sirakov, 2024; Keller et al., 2025; Sharma et al., 2025a; Sharma et al., 2025b; Suzuki et al., 2025) im Folgenden kurz zusammengefasst und eingestuft.

**Tabelle 1.9:** Ergebnis der Literaturrecherche vom 29.08.2025. doi = *digital object identifier*.

Autoren	Weblink (DOI)	Titel	Journal	Artikel-Art
Ali et al., 2025	<a href="#">DOI-Link zur Publikation</a> <a href="#">Ali et al., 2025</a>	Seed pre-treatment with electromagnetic field (EMF) differentially enhances germination kinetics and seedling growth of maize ( <i>Zea mays</i> L.)	Journal of King Saud University-Science	Forschungsarbeit
Feng et al., 2024	<a href="#">DOI-Link zur Publikation</a> <a href="#">Feng et al., 2024</a>	Novel strategies for enhancing quality stability of edible flower during processing using efficient physical fields: A review	Food Chemistry	Übersichtsarbeit
González et al., 2024	<a href="#">DOI-Link zur Publikation</a> <a href="#">González et al., 2024</a>	The impact of low and medium intensity electromagnetic field exposure on pepper seed germination	IEEE Access	Forschungsarbeit
Handa et al., 2024	<a href="#">DOI-Link zur Publikation</a> <a href="#">Handa et al., 2024</a>	Effect of 2850 MHz electromagnetic field radiation on the early growth, antioxidant activity, and secondary metabolite profile of red and green cabbage ( <i>Brassica oleracea</i> L.)	Environmental Science and Pollution Research	Forschungsarbeit
Jo et al., 2024	<a href="#">DOI-Link zur Publikation</a> <a href="#">Jo et al., 2024</a>	Effect of a directional electromagnetic field on the early stages of plant ( <i>Raphanus sativus</i> and <i>Saccharum officinarum</i> ) growth	Horticulturae	Forschungsarbeit
Keller et al., 2025	<a href="#">DOI-Link zur Publikation</a> <a href="#">Keller et al., 2025</a>	In-depth analysis of chlorophyll fluorescence rise kinetics reveals	International Journal of Molecular Sciences	Forschungsarbeit

Autoren	Weblink (DOI)	Titel	Journal	Artikel-Art
		interference effects of a radiofrequency electromagnetic field (RF-EMF) on plant hormetic responses to drought stress		
Koleva and Sirakov, 2024	nicht angegeben	Study of the effect of pre-sowing electromagnetic impact on the development of primary root system of cotton seeds after different duration of storage. II. Mass of sprout and root	Bulgarian Journal of Agricultural Science	Forschungsarbeit
Mukherjee et al., 2023	<a href="#">DOI-Link zur Publikation Mukherjee et al., 2023</a>	Study of SAR data and spatial distribution in a peace lily plant model under different electromagnetic exposure scenarios	Progress in Electromagnetics Research C	Forschungsarbeit
Panda et al., 2024	<a href="#">DOI-Link zur Publikation Panda et al., 2024</a>	Review on the impact of cell phone radiation effects on green plants	Environmental Monitoring and Assessment	Übersichtsarbeit
Razek 2024	<a href="#">DOI-Link zur Publikation Razek 2024</a>	Analysis and control of ornamental plant responses to exposure to electromagnetic fields	Ornamental Plant Research	Übersichtsarbeit
Sharma et al., 2025a	<a href="#">DOI-Link zur Publikation Sharma et al., 2025a</a>	Assessing cell viability and genotoxicity in <i>Trigonella foenum-graecum</i> L. exposed to 2100 MHz and 2300 MHz electromagnetic field radiations	Plant Physiology and Biochemistry	Forschungsarbeit

<b>Autoren</b>	<b>Weblink (DOI)</b>	<b>Titel</b>	<b>Journal</b>	<b>Artikel-Art</b>
Sharma et al., 2025b	<a href="#">DOI-Link zur Publikation Sharma et al., 2025b</a>	Study on evaluation of effects of electromagnetic radiation on pollen viability in some commonly occurring plant species following different staining methods	Protoplasma	Forschungsarbeit
Suzuki et al., 2025	<a href="#">DOI-Link zur Publikation Suzuki et al., 2025</a>	Microwave pre-stimulation methodology for plant growth promotion	Scientific reports	Forschungsarbeit
Virto et al., 2024	<a href="#">DOI-Link zur Publikation Virto et al., 2024</a>	The exposure of nonhuman living organisms to mobile communication emissions: A survey to establish European stakeholders' policy option preferences	Risk analysis	Übersichtsarbeit/Umfrage

### **González et al., 2024:**

In der Publikation von González et al., 2024 wurde untersucht, wie sich HF-EMF mit niedriger und mittlerer Intensität auf die Keimung von Pfeffersamen (*Capsicum annuum* L.) auswirken. In der Studie wurden unterschiedliche Leistungsdichten und Expositionszeiten untersucht und ob diese Vorbehandlungen die Keimung und das spätere Wachstum der Sämlinge beeinflusst. Die verwendeten Expositionssysteme (Absorberkammer bzw. Wellenleiter) lassen sich als prinzipiell geeignet einstufen. Die Exposition (2,45 GHz, Fernfeld) erfolgte kontrolliert aus einer Bestrahlungsrichtung. Niedrige Leistungsdichten reichten von 3,5 bis 3820  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  (Exposition: Absorberkammer) und mittlere Leistungsdichten reichten von 502,7 bis 2097,9  $\text{mW}/\text{cm}^2$  (Exposition: Wellenleiter). Expositionszeiten erstreckten sich von 4,7 sek bis hin zu 16 Tagen. Nach Exposition wurde das Saatgut unter kontrollierten Bedingungen zum Keimen gebracht und verschiedene Parameter gemessen, inklusive Dauer der Keimung, Keimungsrate, und Biomasse der Keimlinge (56 Tage nach der Aussaat). Die Studie wurde nicht verblindet durchgeführt. Es werden sehr genaue Angaben zur Methodik in der Publikation gemacht, inklusive der Statistik. Allerdings fehlt die Angabe der Statistik in vielen Ergebnissen oder die Ergebnisse zeigen nicht signifikante Änderungen zur entsprechenden Kontrolle, sodass die gezeigten Ergebnisse die Schlussfolgerungen nicht unterstützen. Dennoch schlussfolgerten die Autoren, dass Pfeffersamen, die mittleren Leistungen ausgesetzt waren, im Allgemeinen schneller als die unbehandelte Kontrollgruppe keimten. Auf der anderen Seite, wenn die Leistung niedrig war und die Expositionszeit lang, dann verlangsamte sich die Keimung im Vergleich zur Kontrolle. Zudem wurde eine positive Korrelation zwischen Leistungsintensität und der Wurzelbiomasse festgestellt.

### **Keller et al., 2025:**

Keller et al., 2025 untersuchten, ob HF-EMF die sogenannten hormetischen Reaktionen von Salat (*Lactuca sativa*) auf Trockenstress beeinflussen. Hormesis bedeutet, dass eine schwache Stressbelastung kurzfristig positive Anpassungsreaktionen bewirken kann. Die Studie wurde nicht verblindet durchgeführt. Es wurde hauptsächlich die Photosyntheseleistung über Chlorophyll-Fluoreszenz (OJIP-Kurve) gemessen. Wie bei ähnlichen Publikationen dieser Arbeitsgruppe wurden hier Fritzboxen als Expositionsanlagen verwendet, somit war

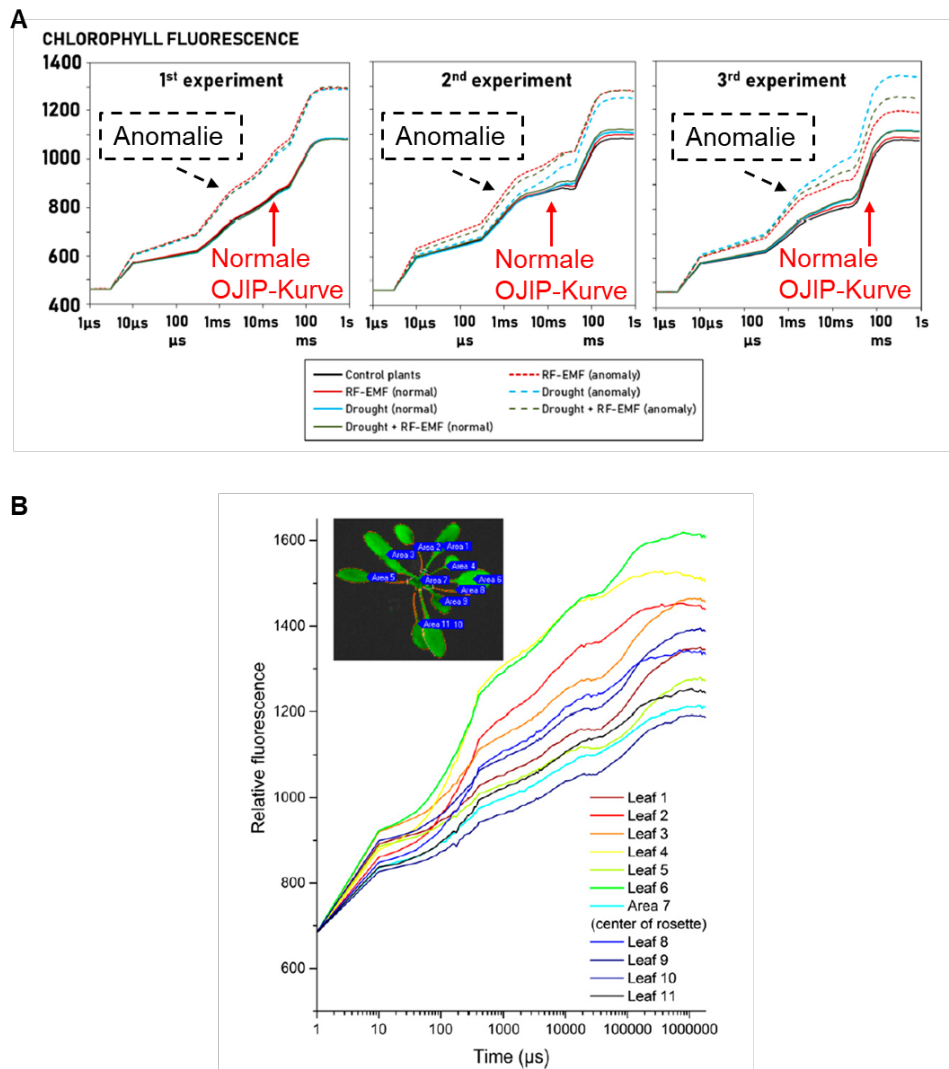
die Exposition weder gleichförmig noch kontrolliert, sodass die Ergebnisse auch hier zu hinterfragen sind.

Bezüglich der biologischen Methoden ist anzumerken, dass keine Kontrolle des angelegten Trockenstresses erfolgte. Es ist angegeben, dass die drei durchgeführten Experimente unter Feldbedingungen im Juli und August 2024 durchgeführt wurden und dass die Pflanzen, die einem Trockenstress ausgesetzt werden sollten, an warmen, sonnigen Tagen für vier Stunden nicht gewässert wurden. Aus dem *Supplemental Material* geht hervor, wann die OJIP-Kurven aufgenommen wurden im Verhältnis zum Start der Exposition, allerdings nicht wie lange ein Trockenstressszenario vorherrschte. Aus den gezeigten Daten zeigt sich zum einen, dass die Expositionsdauer nicht für alle Experimente gleich war und, dass die Wetterbedingungen inklusive natürlichem Niederschlag sehr unterschiedlich zwischen den Einzelexperimenten waren. Somit war auch der Grad des Trockenstresses in den einzelnen Experimenten nicht vergleichbar.

Die OJIP-Kurven wurden auf zwei unterschiedliche Weisen ausgewertet. Einmal wurden die Kurven mit der Standard-Methode ausgewertet, indem die OJIP-Parameter der Kontrollgruppe mit denen der Stressgruppen (HF-EMF, Trockenstress) verglichen wurden. Aus den Ergebnissen von sieben OJIP-Parametern schlussfolgerten die Autoren, dass ein kurzzeitiger Trockenstress bei Salat zu einer erhöhten Photosyntheseleistung führt. Aus der nachgeschalteten Analyse derselben sieben OJIP-Parameter in den übrigen Stressbehandlungen (HF-EMF, HF-EMF + Trockenstress) schlussfolgerten die Autoren, dass es zu einer Interaktion zwischen HF-EMF-Exposition und Trockenstress kommt, dass die Effekte aber äußerst klein sind.

Deswegen wurde eine zusätzliche Analyse der mittels *machine learning* detektierten Anomalien der OJIP-Kurven durchgeführt. Dazu wurden die typischen OJIP-Kurven als normal definiert und jede Kurve, die von den als normal definierten abwich, wurde als Anomalie bezeichnet und ausgewertet (Abb. 1.3). Aus den Ergebnissen dieser Analysen wurde geschlussfolgert, dass es zu starken Interaktionen zwischen HF-EMF-Exposition und Trockenstress kommt und dass HF-EMF-Exposition die natürliche Stressantwort von Salatpflanzen negativ beeinflusst. Es muss angemerkt werden, dass die Definition der Anomalien fraglich erscheint, da jedes einzelne Blatt

einer Pflanze eine andere OJIP-Kurve bedingt (Küpper et al., 2019) und somit die detektierten Anomalien auch auf Entwicklungsunterschiede der Pflanzen hindeuten (Abb. 1.3).



**Abbildung 1.3:** Normale OJIP-Kurven und deren Anomalien aus Keller et al. 2025, sowie OJIP-Kurven aus Küpper et al., 2019. A) Normale OJIP-Kurven und deren Anomalien aus Keller et al., 2025. B) OJIP-Kurven unterschiedlicher *Arabidopsis thaliana* Blätter aus Küpper et al., 2019. Abbildungen wurden aus den Publikationen direkt übernommen.

### Koleva et al., 2024:

In der Studie von Koleva et al., 2024 wurde der Effekt von EMF-Expositionen auf Saatgut von fünf unterschiedlichen Baumwollsorten untersucht. Zudem wurde zwischen unterschiedlichen Lagerungsdauern des Saatguts unterschieden (1-jährige oder 2-jährige Lagerung). Die Experimente wurden nicht verblindet durchgeführt. Bezüglich der Exposition wird in der Publikation nur die Angabe gemacht, dass eine Methode mit periodischem Abfall der Spannungswerte  $U$  zwischen den Elektroden

einer Arbeitskammer und eine zunehmende Expositionsdauer verwendet wurde (Koleva and Sirakov, 2024). Anschließend wird auf ein bulgarisches Patent verwiesen. Bezüglich der fehlenden Angaben zum Expositionsaufbau sollten die Ergebnisse dieser Studie hinterfragt werden. Zudem wurden dreifaktorielle Varianzanalysen durchgeführt, allerdings keine anschließenden Posthoc-Analysen, die wichtig gewesen wären, um tatsächliche signifikante Unterschiede zwischen bspw. den unterschiedlichen Behandlungen oder Baumwollsorten zu ermitteln. Es werden auch keine Angaben zur Streuung der Daten (Fehlerbalken oder ähnliches) gemacht. Somit sind die getroffenen Schlussfolgerungen statistisch nicht abgesichert und auch nicht nachvollziehbar.

Nach Exposition wurde das Saatgut in Keimlingsrollen analysiert und Wurzel-, sowie Sprossmerkmale nach sieben Tagen phänotypisiert. Die Autoren schlussfolgern aus ihren Daten, dass ihre EMF-Exposition das Wachstum von Spross und Wurzel stimuliert (erhöhte Spross- und Wurzelmasse) und dass die unterschiedlichen Baumwollsorten spezifisch reagieren. Die Autoren schlussfolgern zusätzlich, dass der stimulierende Effekt bei einjährig gelagertem Saatgut höher ist als bei zweijährig gelagertem Saatgut.

### **Sharma et al. 2025a:**

Die Studie von Sharma et al., 2025a untersuchte, wie sich HF-EMF-Exposition (2100 MHz und 2300 MHz) auf Bockshornklee (*Trigonella foenum-graecum* L.) auswirkt. Hierbei standen Zelllebensfähigkeit, genetische Schäden, sowie Wachstum und Stressreaktionen im Fokus. Die Studie wurde nicht verblindet durchgeführt. Auch hier ist das verwendete Expositionssystem nur unzureichend beschrieben. Es wird angegeben, dass ein Signalgenerator von Key Sight Technologies zur Erzeugung von HF-EMF (2100 MHz und 2300 MHz mit einer Leistungsdichte von 10 dBm) verwendet wurde. In welcher Messumgebung die Versuche abliefen ist nicht beschrieben, sodass das System als ungeeignet eingestuft werden muss und somit die gezogenen Schlussfolgerungen auch hier zu hinterfragen sind.

In der Studie wurde Saatgut des Bockshornklees bei 2100 oder 2300 MHz für entweder 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h, oder 8 h pro Tag für insgesamt 7 Tage exponiert. Die Autoren berichten eine Reduktion von Wurzel- und Sprosslängen, sowie eine Beeinträchtigung der Keimung insbesondere bei längeren Expositionen (4 h und

8 h/Tag). Zudem schlussfolgerten die Autoren, dass die Zellebensfähigkeit nach HF-EMF-Exposition sank, besonders bei längerer Exposition, was durch die dargestellten Zellfärbungen allerdings nicht unterstützt wird. Diese Schlussfolgerungen basieren auf Färbungen mit Propidium-Iodid. Dieses kommt bei lebenden Zellen nicht durch die Plasma-Membran und wird deswegen bei Pflanzen für Zellwandfärbungen verwendet. Bei toten Zellen färbt Propidium-Iodid den Zellkern (Bureau et al., 2018). Der Farbstoff wird in der Pflanze mittels Fluoreszenz-Mikroskopie analysiert und nicht, wie in der Methodenbeschreibung angegeben, mit einem *Inflorescence-Microscope*, was es im Übrigen nicht gibt. Die dargestellten Bilder zeigen auch deutlich eine Überfärbung der exponierten Pflanzen. Im Gegensatz zeigt die dargestellte Färbung der Kontroll-Wurzel eine reduzierte Zellebensfähigkeit, was möglicherweise dadurch zustande kommt, dass die Wurzel abgeschnitten wurde. Normalerweise werden für solche Färbungen die Wurzeln entweder fixiert oder die gesamte Wurzel gefärbt. Die diesbezüglichen Aussagen werden somit durch die gezeigten Daten nicht unterstützt. Zudem schlussfolgern die Autoren, dass die Anzahl der Chromosomenschäden mit zunehmender Expositionszeit steigt und dass die 2300 MHz-Frequenz eine stärkere Auswirkung auf Chromosomenschäden zeigt als die 2100 MHz-Frequenz. Auch nehmen in dieser Studie die Konzentration an MDA, ein Marker für oxidative Schädigung der Zellmembran, und die Aktivität spezifischer antioxidativer Enzyme bei HF-EMF-Exposition im Vergleich zur unexponierten Kontrolle zu.

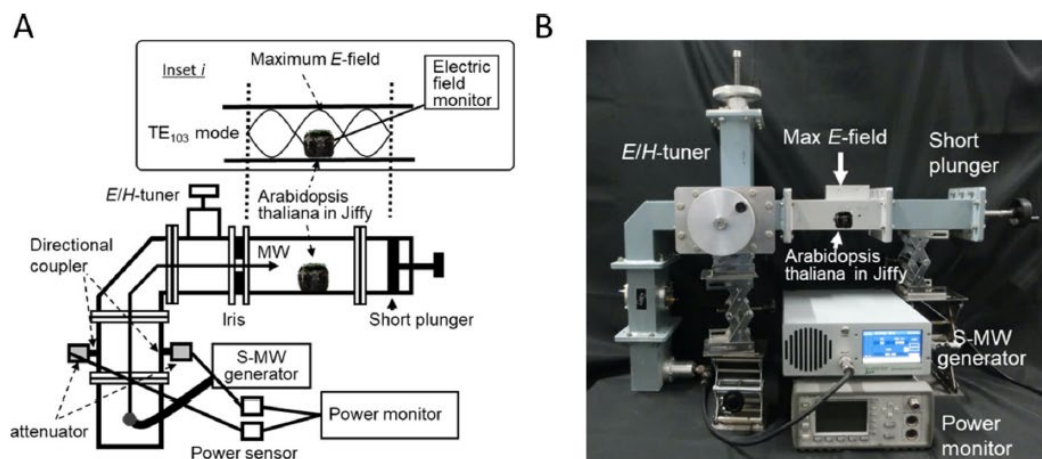
### **Sharma et al., 2025b:**

In der Studie von Sharma et al., 2025b wurde Pollen von 12 verschiedenen Pflanzenarten an vier unterschiedlichen Standorten beprobt und dessen Lebensfähigkeit mittels unterschiedlicher Färbetechniken untersucht. Die vier Standorte an denen beprobt wurde, waren durch EMF-Bedingungen unterschiedlicher Leistungsdichte charakterisiert, und zwar von  $1 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  (Kontroll-Standort) bis  $15 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ . Die Leistungsdichten wurden mit einem EMF-Messgerät bestimmt (Modell: PCE-EM29 von PCE Instruments, UK). Die Studie fand in keiner kontrollierten Messumgebung statt und war nicht verblindet. Es wird angegeben, dass es zu einer kontinuierlichen Exposition über 42 Tage kam. Wie die Exposition zustande kam oder kontrolliert wurde, ist nicht angegeben. Die Autoren schlussfolgern aus ihren Ergebnissen, dass der Standort mit der höchsten Leistungsdichte zu einer Reduktion der Pollenlebensfähigkeit in allen 12 Pflanzenarten führt. Interessant ist allerdings,

dass die Abnahme der Pollenlebensfähigkeit zwischen Kontrollstandort und Standort mit der höchsten Leistungsdichte je nach Färbetechnik unterschiedlich ist und von 0% bis 12% für dieselbe Pflanzenart schwankt, woraus man auch schließen könnte, dass die verwendete Färbetechnik ein ausschlaggebender Faktor für die Ergebnisse ist.

### Suzuki et al., 2025:

In der Publikation von Suzuki et al., 2025 wurde eine Art Hybridsystem aus Mikrowellenherd (2,45 GHz) und Modenverwirbelungskammer realisiert (Abb. 1.4). Die Mikrowellenexposition wurde durch eine transverse elektrische 103 Mode (TE<sub>103</sub>), also eine Einzelmode, realisiert. Während die Idee dahinter prinzipiell ok ist, erscheint hier die Kontrolle der Bedingungen zweifelhaft, bzw. ist nur rudimentär beschrieben. Zudem kann von keiner gleichförmigen Exposition ausgegangen werden, sodass die berichteten Ergebnisse hinterfragt werden sollten.



**Abbildung 1.4:** Schematische und tatsächliche Darstellung des Expositionssystems, das in Suzuki et al., 2025 verwendet wurde. A) Schematische Darstellung des Expositionssystems. B) Foto des verwendeten Expositionssystems. Das System besteht aus einem 2,45 GHz Halbleiter-Mikrowellen-Generator (*S-MW generator*), einem faseroptischen Temperatursensorsystem, einem Leistungssensor (*power sensor*), einem Leistungsmonitor (*power monitor*), und einem „Einzelmoden-Applikator“. Einschub-Bild (*Inset i*): Verteilung des elektrischen Feldes (*E-field*) innerhalb des „Einzelmoden-Applikators“ und Darstellung der Position der Pflanzen (*Arabidopsis thaliana in Jiffy*).

Die Studie untersuchte im Modellsystem *Arabidopsis thaliana* (14 oder 15 Tage alte Pflanzen) Effekte einer einstündigen Mikrowellen-Exposition auf verschiedene Wachstumsparameter, auf molekulare Prozesse, und auf Stresstoleranz. Die Studie wurde unverblindet durchgeführt und analysiert wurde bis 63 Tage nach der Mikrowellen-Exposition. Auch die Beschreibungen des Versuchsaufbaus sind lückenhaft, da beispielsweise fehlt, wieviele Pflanzen gleichzeitig exponiert wurden.

Wichtige Angaben zur Auswertung des Mikroarray-Experiments fehlen, da nur geschrieben steht, dass die Analyse mittels eines erstellten R-codes durchgeführt wurde. Es ist angegeben, dass eine *One-color microarray*-Analyse durchgeführt wurde mit einem DNA-Mikroarray. Damit ist eine Genexpressionsanalyse nicht möglich, da hierzu 2-Farbkanäle und ein RNA-Mikroarray üblich sind. Zusätzlich entsprechen Mikroarray-Analysen nicht mehr dem Stand der Technik. Die angegebene Statistik zur Ermittlung differenziell exprimierter Gene (*Student's t-test*) ist für eine solche Analyse nicht geeignet.

**Wachstumsparameter:** Die Ergebnisse der Studie zeigen, dass eine einstündige Mikrowellen-Behandlung mit 23 W, aber nicht 26 W oder 30 W, zu einer größeren Blatt-Rosette bei Arabidopsis führt. Die vergrößerte Blattrosette bei 23 W führte nicht zu Änderungen des Trocken- oder Frischgewichts. Zusätzlich war der Infloreszenz-Stamm nach Exposition ausschließlich mit 23 W signifikant verlängert im Vergleich zu Kontrollpflanzen. Auch waren Gewicht und Anzahl der Samen in den exponierten Pflanzen im Vergleich zu den Kontrollpflanzen erhöht. Die Wachstumszunahme der Arabidopsis-Rosette nach einstündiger 23 W Mikrowellen-Behandlung war in Arabidopsis-Pflanzen, bei denen der Photorezeptor PHYTOCHROME B mutiert wurde, nicht zu beobachten. Temperaturmessungen und ein Nachweis über die Genexpression wärmeinduzierter Gene zeigte, dass die Mikrowellenbehandlung die Temperatur der Pflanzen nicht erhöhte.

**Genexpressionsänderungen:** Aus den Mikroarray-Analysen, deren Auswertung laut Angabe im Material und Methodenteil über *t*-Tests ohne Berücksichtigung der multiplen Testproblematik lief, wurde geschlussfolgert, dass es nach Mikrowellen-Behandlung zu Mikrowellen-spezifischen Transkriptänderungen kommt. Trotz vieler differenziell regulierter Gene nach Mikrowellen-Behandlung und nach induziertem Hitzestress war nämlich nur ein geringer Überlapp an Genen zwischen den beiden Stress-Applikationen zu detektieren. Bei den Mikrowellen-spezifischen Transkriptänderungen waren vor allem Gene hochreguliert, die der Signalkaskade des Phytohormons Abszisionsäure zuzuordnen sind. Zudem erschienen Gene weiterer Phytohormon-Signalkaskaden, insbesondere Auxin und Gibberellin, differenziell reguliert. Zusätzlich wurden Transkripte als differenziell exprimiert detektiert, die mit

Hitzestress, Licht, UV, und der Biosynthese von Pigmenten und Flavonoiden zu tun haben.

**Metabolom-Analysen:** Ungerichtete Metabolom-Untersuchungen der Arabidopsis-Rosetten nach Mikrowellen-Behandlung zeigten, dass das Level von insgesamt 20 Metaboliten differenziell zur Kontrolle verändert war. Unter den differenziell regulierten Metaboliten waren hauptsächlich Aminosäuren zu finden, wodurch geschlossen wurde, dass eine Anreicherung von Aminosäuren, induziert durch die Mikrowellen-Behandlung, die beobachtete Wachstumszunahme nach Mikrowellen-Behandlung bedingen könnte.

#### 1.6. Zusammenfassung

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der derzeitige Stand der Wissenschaft keine ausreichend begründeten Schlüsse zulässt, zu welchen Effekten es tatsächlich nach Exposition von HF-EMF im Bereich von Pflanzenwachstum und Pflanzengesundheit kommt. Obwohl viele Studien meist negative Effekte auf unterschiedliche Prozesse in Pflanzen aufzeigen, sind diese Studien aufgrund fehlender standardisierter Verfahren schwer vergleichbar. Darüber hinaus werden widersprüchliche Effekte bei Betrachtung gleicher Parameter beschrieben. In Übersichtsarbeiten fehlt zusätzlich häufig eine Bewertung der Originalarbeiten oder bereits veröffentlichte Empfehlungen geeigneter Expositionssysteme werden übergangen (Vian *et al.*, 2016; Halgamuge, 2017; Kaur *et al.*, 2021). Dazukommt, dass viele Studien guter Labor- oder Publikationspraxis nicht genügen, da sie entweder unzureichend durchgeführt und/oder mangelhaft beschrieben werden. Zum anderen untersuchen Studien unterschiedliche Pflanzenarten, diverse Frequenzbereiche, Intensitäten, und Expositionsdauern. Eine deutliche Unterscheidung der Studien hinsichtlich der Qualität der verwendeten Expositionsanlagen und das fast vollständige Fehlen von systematischen Ansätzen, erschweren zusätzlich die Vergleichbarkeit dieser Studien und somit eine Bewertung der erzielten Ergebnisse.

Ungeachtet der im vorigen Absatz beschriebenen Einschränkungen von HF-EMF-Studien allgemein, muss weiter angemerkt werden, dass viele der untersuchten Studien und Reviews, biologische Schlussfolgerungen ziehen und dann auch zitieren, die mit den veröffentlichten Daten nicht in Einklang zu bringen sind, da geringe Effekte statistischer Signifikanz nicht notwendigerweise eine biologische Signifikanz

bedingen. Basierend auf den neueren Studien ab 2021 erscheinen nur die beschriebenen Effekte von Porcher et al (Anstieg von  $H_2O_2$ , Genexpressionsänderungen von *APX1*, *CALMODULIN*, *CAT2*, *RHOB*, *ZAT12* und ein Anstieg von DHA) nach HF-EMF Exposition (2450 MHz, 0,5 h, 1 h) zunächst interessant. Auch in dieser Studie hätte eine homogene und reproduzierbare Feldexposition im Bereich der Pflanzen anhand einer längeren Messerfassung nachgewiesen werden müssen.

Abschließend lässt sich nur betonen, dass es gerade im Bereich potentieller Effekte von HF-EMF auf Pflanzengesundheit und Pflanzenwachstum dringend verlässlichen Forschungsbedarf gibt. Dafür sind interdisziplinäre Zusammenarbeiten (Biologie, Physik, Statistik) nicht nur empfehlenswert, sondern zwingend notwendig.

## Arbeitspaket 2 Expositionsanlage - Verwirbelungskammer

### 2.1. Einleitung und Zielsetzung

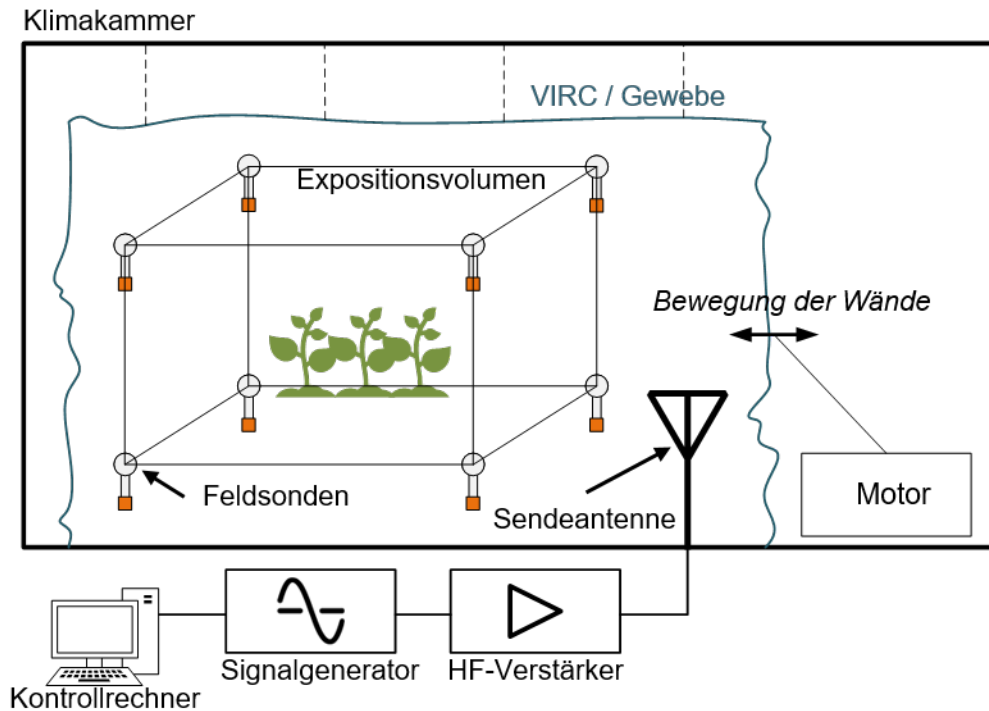
Zur Reproduktion der Forschungsarbeiten der Arbeitsgruppe Vian sollte eine Modenverwirbelungskammer (MVK) entwickelt werden, die eine Exposition von Pflanzen HF-EMF bei 900 MHz im Bereich von 0 V/m bis 40 V/m ermöglicht. Um kontrollierte Aufzuchtbedingungen zu gewährleisten sollte die Kammer als in-situ-Aufbau konzipiert werden, der in der Pflanzenanzuchtkammer des Lehrstuhls Crop Functional Genomics (CFG) der Universität Bonn installiert werden kann. Darin sollten Expositionsexperimente mit Rosen-, sowie Tomatenpflanzen durchgeführt werden. Ziel war die Entwicklung einer Expositionsanlage, die kontrollierte und reproduzierbare Bedingungen einhält. Dazu sollte eine vollautomatische Erzeugung vorgegebener Expositionsfeldstärken ermöglicht werden, sodass verblindete Experimente durchgeführt werden können.

#### 2.1.1. Konzept der Modenverwirbelungskammer

Die Modenverwirbelungskammer ist eine in der technischen EMV etablierte Prüfumgebung zur Durchführung von Störfestigkeitsmessungen. Sie besteht typischerweise aus einem geschirmten Raum aus metallischen Flächen. Im Inneren werden die erzeugten elektromagnetischen Felder reflektiert, sodass sich durch die Überlagerung der Mehrfachreflexionen ein charakteristisches Feldbild mit lokalen Minima und Maxima einstellt. Durch Veränderung der Randbedingungen (Serra et al., 2017) können die Positionen der lokalen Feldstärkeüberhöhungen verschoben werden, sodass neue Feldbilder entstehen. Dieser Prozess wird Modenverwirbelung bzw. *Stirring* genannt. Wenn hinreichend viele statistisch unabhängige Feldbilder durch kontinuierliche Änderung der elektromagnetischen Randbedingungen erzeugt werden, kann man in einem Volumen, das sich mindestens eine Viertelwellenlänge von allen Berandungen entfernt befindet, ein statistisch homogenes, isotropes Feld mit zufälliger Polarisierung annehmen. Detaillierte Beschreibungen zu den Grundlagen von Modenverwirbelungskammern sind in Krauthäuser (2007) und Hill (1998a) zu finden.

Die Änderung der Randbedingungen kann auf verschiedene Arten erfolgen. Für eine Übersicht sei auf Serra et al. (2017) verwiesen. Bei der im Rahmen dieses Projektes entwickelten Modenverwirbelungskammer wird eine *Stirring*-Methode verwendet, die in Leferink et al. (2000) erstmals vorgestellt wurde. Weitere Arbeiten hierzu sind in

Leferink and van Etten (2001) und Leferink (2008) beschrieben. Hierbei wird die Modenverwirbelungskammer als sogenannte *Vibrating Intrinsic Reverberation Chamber* (VIRC) ausgeführt. Dazu wird kein geschirmter Raum mit starren Wänden eingesetzt, sondern die Kammer als eine Art Zelt mit flexiblen, aber metallisch leitfähigen Wänden, aufgebaut. Durch mechanische Anregung der flexiblen Wände verändert sich die Form des Schirmzeltens und damit die elektromagnetischen Randbedingungen. Eine möglichst chaotische Bewegung führt zu besonders effektiver Feldverwirbelung (Serra and Leferink, 2010). Der Vorteil dieser *Stirring*-Art ist der mögliche Einsatz als in-situ-Messumgebung. Durch Verwendung von elektrisch leitfähigen Stoffen (Oppermann and Weidemeier, 2022) oder Gewebe kann die Modenverwirbelungskammer als Zelt konstruiert werden, das direkt um lokal fest installierte Prüflinge herum aufgebaut werden kann und so örtlich flexibel Feldexpositionen ermöglicht. Je nach geplantem Nutzfrequenzbereich kann das verwendete Gewebe auch lichtdurchlässig sein, ohne Einschränkung der Funktion als Prüfumgebung. Zu diesem Zweck ist die Maschenweite klein gegenüber der entsprechenden Wellenlänge der Nutzfrequenz zu wählen um eine hinreichend hohe Schirmdämpfung zu erzielen. Detailliertere Informationen sind Casey (1988), Graebner (2016) und Amralah (2021) zu entnehmen. Für die kontrollierte Exposition von Pflanzen ist dies besonders vorteilhaft, da ein solches Abschirmzelt mit flexiblen Wänden direkt in einer Pflanzenanzuchtkammer installiert werden kann. Mit einer lichtdurchlässigen Konstruktion können die Wachstumsbedingungen (Lichtmenge, Luftfeuchtigkeit, Temperatur) für die Pflanzen erhalten bleiben. Abbildung 2.1. zeigt den geplanten Aufbau einer solchen in-situ-Modenverwirbelungskammer als Expositionsanlage für Pflanzen innerhalb einer Klima- bzw. Anzuchtkammer. Ein Abschirmzelt aus elektrisch leitfähigem, mechanisch flexiblem Gewebe wird als hängende Konstruktion ähnlich einem Moskitonetz an der Decke der Anzuchtkammer aufgehängt. Mit einem Motor können die Wände des Zeltes mechanisch bewegt werden, um die Randbedingungen im Inneren effektiv zu ändern.



**Abbildung 2.1:** Aufbau der Expositionsanlage innerhalb der Klimakammer.

Innerhalb des Abschirmzeltes befindet sich eine Sendeantenne zur Erzeugung der Expositionsfeldstärke. Das Signal wird als CW-Signal (*continuous wave*) mit einem HF-Signalgenerator erzeugt und über einen HF-Leistungsverstärker auf die Antenne geleitet.

Die Pflanzen befinden sich in einem Expositionsvolumen, welches mindestens eine Viertelwellenlänge von allen Berandungen, sowie leitfähigen Flächen entfernt sein muss (IEC 61000-4-21, 2011). An jeder Ecke des quaderförmigen Prüfvolumens befindet sich ein Sensor zur vektoriellen Messung der elektrischen Feldstärke. Der Signalgenerator, sowie sämtliche Feldsensoren sind mit einem Kontrollrechner verbunden, der die Steuerung der Anlage, sowie die Aufzeichnung sämtlicher betriebsrelevanter Parameter übernimmt.

## 2.2. Aufbau und Beschreibung der Expositionsanlage

### 2.2.1. Aufbau des Abschirmzeltes

#### 2.2.1.1. Material

Für die Materialwahl sind umfangreiche Recherchen durchgeführt und Vorüberlegungen getroffen worden. Das ausgewählte Zeltgewebe ist ein Edelstahlgeflecht, *MeshArt Soft Silver* des Herstellers *Dorstener Drahtwerke*. Die

Dicke des Gewebes beträgt 0,1 mm. Mit einer Maschenweite von 0,077 mm (Dorstener Drahtwerke, 2023) ist es für eine effektive Abschirmung elektromagnetischer Felder bei 900 MHz geeignet (Graebner, 2016) und bietet gleichzeitig eine hinreichende Lichtdurchlässigkeit, wie in Abbildung 2.2. dargestellt.



**Abbildung 2.2:** Lichtdurchlässigkeit des Zeltmaterials.

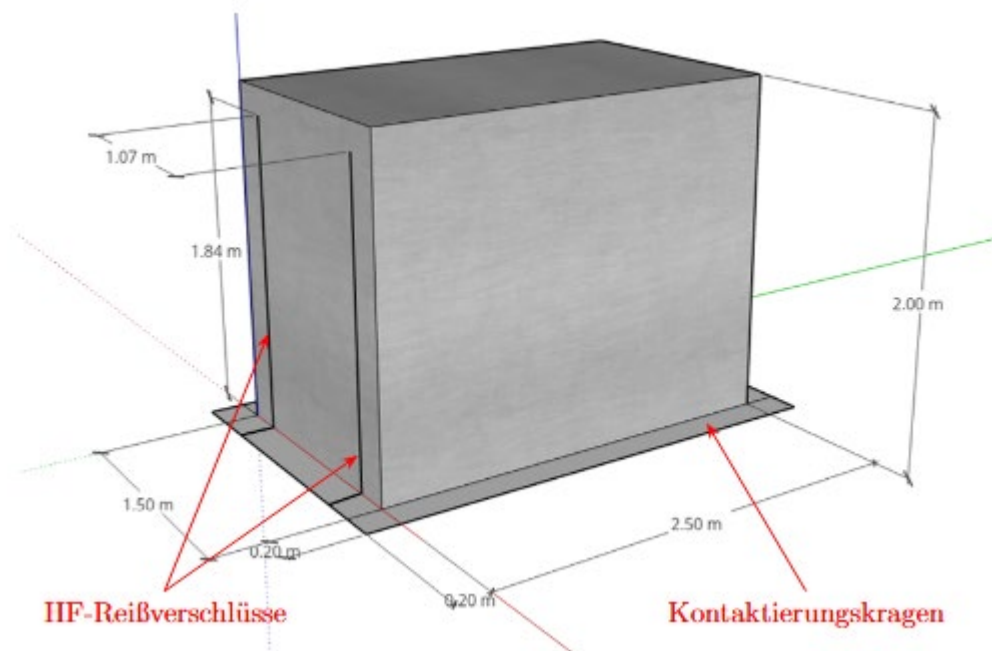
Bei Vorabuntersuchungen wurde eine Reduktion der Photonenflussdichte durch das Material von etwa 40% ( $90 \mu\text{mol} / \text{m}^2\text{s}$  bei Beleuchtung durch das Metallgewebe gegenüber  $150 \mu\text{mol} / \text{m}^2\text{s}$  bei direktem Weg) festgestellt. Dieser Verlust kann durch Erhöhung der Intensität der Lampen in der Anzuchtammer kompensiert werden, sodass die Bedingungen für die Pflanzen erhalten bleiben, wenn Sie sich in der Expositionsanlage befinden.

#### 2.2.1.2. Dimensionierung

Die Dimensionierung erfolgte anhand der Abmessungen der Pflanzenanzuchtammer, in der das Abschirmzelt installiert werden sollte. Es sollte eine komfortable Begehung möglich sein, um die Pflanzen komfortabel herein- und heraus zu transportieren, sowie in der Kammer eine Schockfrostung mit flüssigem Stickstoff vornehmen zu können. Das Lambda-Viertel-Kriterium, nach dem das Prüfvolumen zu sämtlichen Metallflächen innerhalb der Kammer mindestens eine

Viertelwellenlänge (bei 900 MHz etwa 90 mm) Abstand besitzen muss, soll ohne Schwierigkeiten eingehalten werden können.

Das Abschirmzelt ist 1,5 m breit, 2,5 m lang und besitzt eine Höhe vom Punkt der Bodenauflage bis zur Decke von 2 m (Abb. 2.3). Die erste Resonanzstelle, d.h. der  $H_{110}$ -Mode liegt bei etwa 96 MHz. Die niedrigste Nutzfrequenz für den Betrieb als Modenverwirbelungskammer lässt sich damit bei hinreichender Feldverwirbelung konservativ auf etwa 300 MHz abschätzen (Eulig, 2004). Es ist davon auszugehen, dass sich die Kammer bei 900 MHz im Bereich der *well-stirred-condition* (Andrieu et al., 2020) betreiben lässt, i.e. die Feldstärkewerte der kartesischen Raumkomponenten unterliegen einer Rayleigh-Verteilung. Dies ist im Sinne der Theorie von Modenverwirbelungskammern der angestrebte Zustand (Hill, 1998b).



**Abbildung 2.3:** Aufbau des Abschirmzells mit Bemaßung.

Zur Herstellung einer benutzungsfreundlichen Zugangsmöglichkeit wurden zwei metallbeschichtete HF-Reißverschlüsse vom Hersteller *Shieldex* an der Stirnseite des Abschirmzells eingearbeitet. Diese sind in Abbildung 2.3. durch die schwarzen Linien dargestellt.

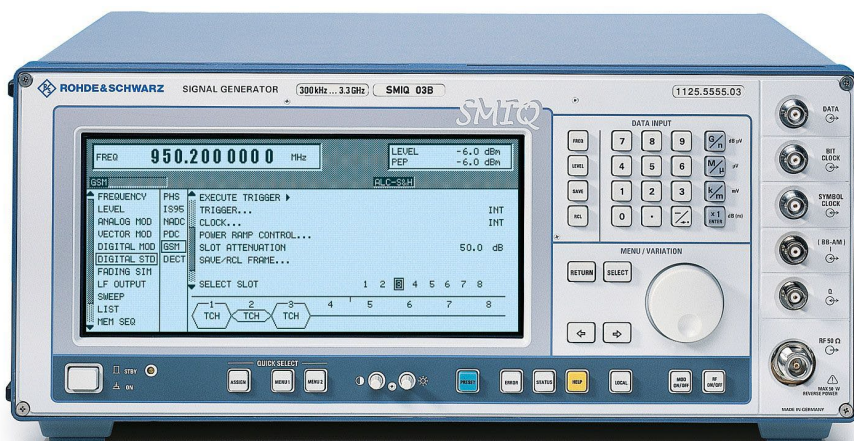
Das Abschirmzelt besitzt keinen eigenen Boden. Als *Groundplane* wird der Aluminiumfußboden der Anzuchtammer verwendet. Um eine ausreichende Kontaktierung zu gewährleisten besitzt das Abschirmzelt einen etwa 30 cm breiten

Kontaktierungskragen. Dieser kann nach der Installation beschwert werden, um einen möglichst hohen, gleichmäßigen Anpressdruck zu erreichen. Als Beschwerung sind Sandsäcke von Vorteil, da Unebenheiten auf dem Aluminiumfußboden effektiv ausgeglichen werden können. Da sich der Kontaktierungskragen auf der außenliegenden Seite der Zeltbewandungen befindet, sind die elektromagnetischen Eigenschaften der Sandsäcke nicht relevant.

## 2.2.2. Equipment zur Felderzeugung und -messung

### 2.2.2.1. Signalgenerator

Zur Erzeugung eines CW-Signals bei 900 MHz wird ein HF-Signalgenerator vom Typ *SMIQ* von *Rohde & Schwarz* eingesetzt, dargestellt in Abbildung 2.4. Die Kommunikation mit dem Kontrollrechner erfolgt über eine GPIB-Schnittstelle. Als Ersatzgerät für den Fall eines Defektes steht ein *SMR* von *Rohde & Schwarz* zur Verfügung.



**Abbildung 2.4:** Verwendeter HF-Signalgenerator (Bild: Rohde & Schwarz GmbH & Co. KG, München).

### 2.2.2.2. HF-Leistungsverstärker

Die Verstärkung erfolgt über einen HF-Leistungsverstärker *Model25W1000* von *Amplifier Research*, dargestellt in Abbildung 2.5. Dieser liefert 25 W und ist für den Frequenzbereich 1 MHz – 1000 MHz spezifiziert. Durch die Class-A-Bauweise ist dieser Verstärker für den Einsatz in Modenverwirbelungskammern geeignet (Eulig, 2004). Der Verstärker wird über ein Koaxialkabel vom Typ *ECOFLEX 15* mit der Sendeantenne verbunden. Als Ersatzgerät für den Fall eines Defektes steht ein HF-Leistungsverstärker *Model120S1G3* von *Amplifier Research* mit 120 W Nennleistung zur Verfügung.



**Abbildung 2.5:** Verwendeter HF-Leistungsverstärker.

### 2.2.2.3. Sendeantenne

Als Sendeantenne wird eine vom Institut für EMV der TU Braunschweig eigens konstruierte Discone-Antenne vom Typ *Konia 1* eingesetzt. Diese bietet gegenüber den in Modenverwirbelungskammern für den Frequenzbereich unterhalb von 1 GHz gängigen logarithmisch-periodischen Breitbandantennen einen wesentlich geringeren Platzbedarf bei gleichzeitig guter Anpassung ( $|S_{11}| < 10$  dB bei 900 MHz). Abbildung 2.6 zeigt das eingesetzte Modell.

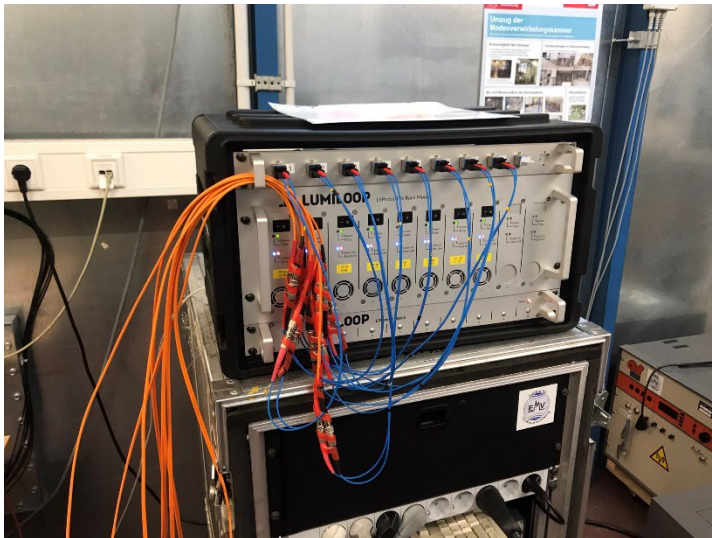


**Abbildung 2.6:** Verwendete Discone-Sendeantenne *Konia 1*.

### 2.2.2.4. E-Feldsondensystem

Zur expliziten Erfassung der elektrischen Feldstärke wurde ein Lumiloop LSProbe 1.2 Multiprobe-System eingesetzt. Das System besteht aus acht lasergespeisten

Sondenköpfen, in denen sich jeweils ein dreiachsiger, isotrop messender Feldsensor befindet. Gespeist und gesteuert werden die Sondenköpfe von je einem Computer-Interface (CI), welche zusammengefasst in dem in Abbildung 2.7 gezeigten *Multiprobe-Rack* untergebracht sind. Sämtliche Sondenköpfe sind durch die Speisung per Laser über Lichtwellenleiter vollständig galvanisch getrennt und benötigen keine separate Stromversorgung.



**Abbildung 2.7:** Lumiloop LSProbe 1.2 *Multiprobe-Rack* mit acht Schnittstellen.

Das System wird über USB an den Kontrollrechner angeschlossen. Auf diesem ist ein Lumiloop-TCP-Server installiert, der die Kommunikation mit allen Feldsonden übernimmt. Das System erlaubt eine Erfassung der elektrischen Feldstärke mit einer Samplingrate von 500 kS/sek, sodass damit eine explizite, hochpräzise Erfassung der Momentanfildstärke über den gesamten Expositionszeitraum möglich ist.

### 2.2.3. Modenverwirbelung

Um die Randbedingungen innerhalb des Abschirmzeltes zu verändern, werden die Zeltwände mechanisch bewegt. Die Auslenkung erfolgt mittels eines DC-Motors, dessen Welle über eine kugelgelagerte Umlenkrolle und ein Polyesterseil an einer der Zeltwände befestigt ist. Die Drehbewegung der Motorwelle wird dadurch in eine translatorische Bewegung am Befestigungspunkt der Zeltwand umgesetzt. Durch die flexible Struktur des Zeltmaterials führt die mechanische Anregung an einem Punkt bereits zu einer ausreichend chaotischen Bewegung aller Zeltberandungen. Um eine effektive Modenverwirbelung zu erreichen sollte die Geometrie des Zeltes vorzugsweise in allen drei Raumrichtungen verändert werden (Serra and Leferink,

2010). Eine Feinjustierung der Anregung (Auslenkungspunkt, Geschwindigkeit, Amplitude) wird anhand einer messtechnischen Bestimmung der Feldgleichförmigkeit vorgenommen (siehe Abschnitt 2.4.2.3). Die Motorgeschwindigkeit und damit die Geschwindigkeit der Modenverwirbelung kann über einen *PWM*-Controller reproduzierbar eingestellt werden. Die Umdrehungsgeschwindigkeit bzw. die mechanische Anregungsperiodendauer wird dazu auf etwa 3 sek eingestellt. Der Motor ist in eine mit Lüftern ausgestattete Holzbox eingebaut um eine Kühlung für längere Betriebszeiten zu gewährleisten, dargestellt in Abbildung 2.8. Dies hat sich bereits in vorangegangenen Forschungsarbeiten (Oppermann and Löser, 2022; Oppermann and Weidemeier, 2022) bewährt, bei denen die Motorbox über mehrere Stunden eingesetzt wurde um ein großes Stoffsegel zu bewegen. Eine zweite Motorbox als Ausfallersatz steht zur Verfügung.



**Abbildung 2.8:** Motorbox mit *PWM*-Controller zur Bewegung der Zeltwände.

## 2.2.4. Einstellung der Expositionsfeldstärke

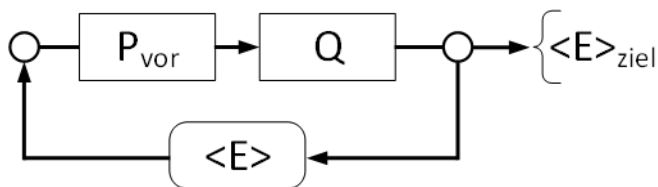
### 2.2.4.1. Definition der Expositionsfeldstärke

Ziel ist die Erzeugung von Expositionsfeldstärken im Bereich von 0 V/m bis 40 V/m. Die Feldstärkewerte sind definiert als Mittelwert über eine Betrachtungsdauer von 6 Minuten. Zur Ermittlung des Momentanwertes wird der Mittelwert  $\langle E \rangle$  aus den Feldstärkebeträgen aller acht dreiaxigen Feldsonden gebildet,

$$\langle E \rangle = \frac{1}{8} \sum_{i=1}^8 \sqrt{E_{x,i}^2 + E_{y,i}^2 + E_{z,i}^2}. \quad (1)$$

### 2.2.4.2. Closed-Loop-Regelung

Die hohe Samplingrate von 500 kS/sek des verwendeten Feldsondensystems erlaubt eine aktive *Closed-Loop*-Regelung der Expositionsfeldstärke. Eine solche Aktivregelung ist in Izzo et al. (2020) erstmals vorgestellt worden und wird aktuell in die technischen EMV-Normen zu Störfestigkeitsmessungen in Modenverwirbelungskammern eingepflegt. Die ISO 11452-5 zur Störfestigkeitsprüfung von Fahrzeugen enthält in der neuesten Ausgabe (ISO 11452-5, 2023) bereits die aktive Feldstärkeregelung. Eine Aufnahme in die allgemeine Prüfnorm IEC 61000-4-21 (IEC 61000-4-21, 2011) ist geplant. Abbildung 2.9 zeigt das Schema der Regelung nach Izzo et al. (2020).



**Abbildung 2.9:** Schematische Darstellung der *Closed-Loop*-Regelung für die mittlere Feldstärke.

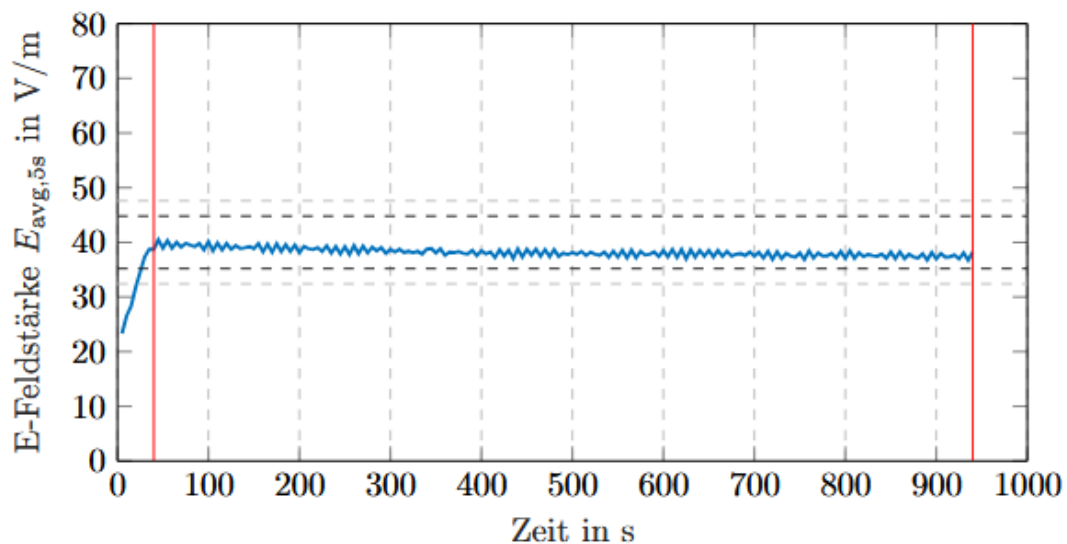
Die über einen bestimmten Betrachtungszeitraum (Regelintervall) aufgenommene, statistisch gemittelte Feldstärke nach oben angegebener Definition wird an einen Regler zurückgeführt, der die vom Signalgenerator ausgegebene Leistung anpasst. Der Betrachtungszeitraum wird so gewählt, dass er mindestens der Periodendauer der mechanischen Anregung der Zeltwände entspricht, damit sämtliche durch die Modenverwirbelung entstehenden Kurzzeitfluktuationen erfasst werden. In der Grafik stellt  $Q$  (kurz für *Quality Factor*) die unbekannte Güte der Kammer inklusive der Beladung durch die Pflanzen dar, also ein Maß für die Dämpfung des Resonators.

Eine Substitutionskalibrierung zur Ermittlung der vom Prüfling absorbierten Leistung kann durch die Verwendung der *Closed-Loop*-Regelung entfallen. Für den Anwendungszweck der Expositionsanlage ist dies von Vorteil, da die Beladung, d.h. die Anzahl der zu exponierenden Pflanzen, variiert werden kann, ohne dass eine erneute Kalibrierung notwendig ist. Zudem entfällt der Einsatz von Ersatzpflanzen, die nur zur Beladungskalibrierung eingesetzt werden, ersatzlos.

Implementiert wurde eine Reglercharakteristik, die ein Überschwingen verhindert, sodass selbst eine kurzzeitige Exposition mit höheren Feldstärkewerten ausgeschlossen wird. Die vorlaufende Leistung wird schrittweise erhöht bis die

Zielfeldstärke erreicht ist. Da eine solche Reglercharakteristik typischerweise langsamer arbeitet als eine solche, die Überschwingen erlaubt, wurde ein zweistufiger Regler implementiert. Zunächst erfolgt die Mittelung der Feldstärkewerte über ein kürzeres Regelintervall von 2-3 sek solange bis der Ist-Wert eine maximale Abweichung vom Soll-Wert von 15% besitzt. Anschließend wird das Regelintervall auf 5 sek verlängert um eine Regelung mit erhöhter Genauigkeit zu ermöglichen. Dieser 5-sek-Mittelwert wird weiterhin über die gesamte Expositionsdauer überwacht. Die Mittelung erfolgt dabei zu jeder Zeit auf Basis einer Samplingrate von 500 kS/sek. Ein Regelintervall von 5 sek liefert also einen auf einer Datenbasis von 2,5 Millionen Werten errechneten Mittelwert. Die Dauer der Feldregelung variiert je nach Szenario und Beladungsfaktor durch die Pflanztopfe. Typische Einregelzeiten liegen im Bereich von 30 sek. Für Expositionsdauern von mindestens 15 Minuten wirkt sich der Einregelvorgang damit nur gering auf den 6-Minuten-Mittelwert der elektrischen Feldstärke aus.

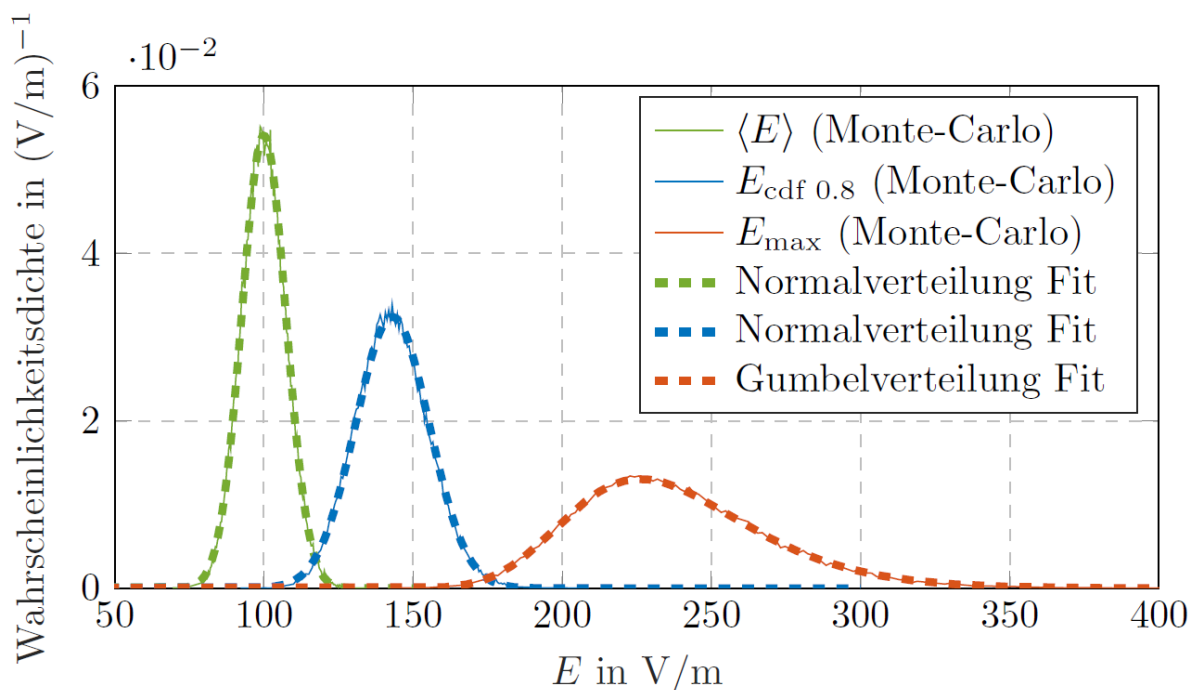
In Abbildung 2.10 ist exemplarisch der Verlauf der statistischen Feldstärke als 5-sek-Mittelwert für die Exposition von Tomatenpflanzen bei 40 V/m gezeigt. Der rot berandete Bereich stellt das Expositionszeitfenster von 15 Minuten Dauer dar.



**Abbildung 2.10:** Zeitlicher Verlauf der statistischen Feldstärke für die Exposition von Tomatenpflanzen bei 40 V/m.

**Anmerkung zur Schwankungsbreite:** In der technischen EMV wird in Modenverwirbelungskammern prinzipiell mit Maxima der Feldstärke gerechnet. Eine Verwendung von Mittelwerten bei Störfestigkeitsmessungen in

Modenverwirbelungskammern ist unüblich. Die breite Streuung der Maxima erschwert allerdings eine stabile Regelung. In Izzo et al. (2020) wird deshalb vorgeschlagen, als Prüffeldstärke das 80%-Quantil der gemessenen Feldstärkewerte zu verwenden. Dieses ist normalverteilt und besitzt damit eine wesentlich geringere Streuung als die einer Extremwertverteilung unterliegenden Maxima. In Abbildung 2.11 ist das Ergebnis einer Monte-Carlo Simulation aus 10000 Zufallsexperimenten am Beispiel eines Rayleigh-verteiltern Feldstärke-Ensembles mit einem Zielwert von  $\langle E \rangle = 100 \text{ V/m}$  dargestellt. Daraus ist ersichtlich, dass die Schwankungsbreite des Mittelwertes  $\langle E \rangle$  selbst die des 80%-Quantils unterschreitet. Eine Verwendung des Mittelwertes für die *Closed-Loop*-Regelung, wie hier angestrebt, stellt kein Problem dar. Für eine detailliertere Beschreibung sei auf Andrieu (2021) verwiesen.



**Abbildung 2.11:** Wahrscheinlichkeitsverteilungen aus Monte-Carlo-Simulation für verschiedene Definitionen der Prüffeldstärke mit zugehörigem Fit.

## 2.3. Steuerungssoftware und Bedienkonzept

### 2.3.1. Steuerungssoftware

Die Expositionsanlage wird über eine Steuerungssoftware auf einem zugehörigen Kontrollrechner bedient. Diese wurde auf Basis der Entwicklungsumgebung *LabView 2023* von *National Instruments* erstellt. Sie dient der vollautomatischen Steuerung der Exposition und der Aufzeichnung aller expositionsrelevanten Daten. Die Benutzeroberfläche (GUI) der Software ist in Abbildung 2.12 dargestellt.

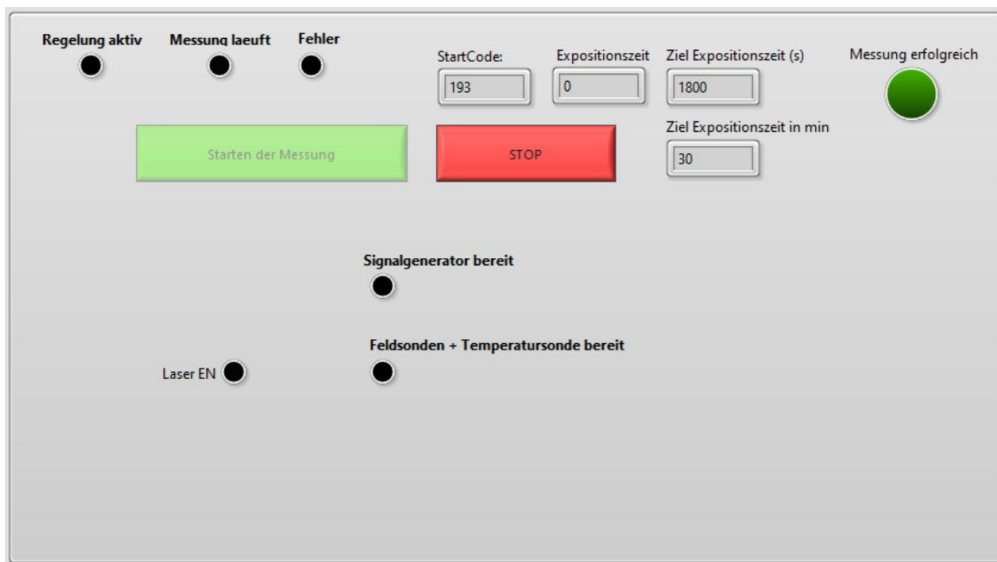


Abbildung 2.12: GUI zur Bedienung der Expositionsanlage.

### 2.3.1.1. GUI und Funktionsbeschreibung

Die Software kann im Vorhinein definierte Experimente durchführen. Ein Experiment besteht aus einer Kombination einer Zielfeldstärke und einer Expositionszeit. Diese Kombinationen können im *Backend* der Software einem Startcode fest zugeordnet werden. Der Startcode ist eine Zahlenkombination, die beliebig gewählt werden kann. Nachfolgend sind die Bedienung und der Ablauf des Programms schrittweise erläutert.

- 1) **Startcode eingeben:** Beim Start der Software erscheint zunächst eine Eingabeaufforderung, in der der Benutzer aufgefordert wird, einen gültigen Startcode einzugeben. Gültig sind alle Startcodes, die im *Backend* definiert sind. Im Beispiel von Abbildung 2.12 ist der Startcode 193 eingegeben worden, dem eine Expositionsdauer von 30 Minuten und eine dem Benutzer unbekannt zugeordnete Zielfeldstärke zugeordnet ist. Durch die Verwendung der Startcodes ist gewährleistet, dass der Benutzer die tatsächlich eingestellte Expositionszeit nicht kennt, sodass die Durchführung verblindeter Experimente ermöglicht wird.
- 2) **Geräte bereit:** Ist ein gültiger Startcode eingegeben worden, prüft die Software zunächst, ob alle benötigten Messgeräte angeschlossen und bereit sind. Ist das der Fall, so leuchten die drei im unteren Bereich des GUI befindlichen Signalleuchten grün. Falls eine oder mehrere Leuchten nicht aufleuchten, sind vom Benutzer die Verbindungen, sowie der Betriebszustand der Geräte zu

prüfen. Sind alle Geräte bereit, beginnt der große Start-Button zu blinken und signalisiert damit, dass das Experiment gestartet werden kann.

- 3) **Start des Experiments:** Mit einem Klick auf den Start-Button beginnt das durch den Startcode definierte Experiment. Dabei wird zunächst die Feldstärke auf den dem Benutzer unbekanntem Zielwert eingeregelt. Dies wird durch die linke Leuchte in der oberen Reihe in der Farbe gelb signalisiert. In dem Fall, dass dem Startcode ein Kontrollexperiment bei 0 V/m zugeordnet ist, wird eine Wartezeit durchlaufen, die den Einregelvorgang simuliert, sodass für den Benutzer kein Unterschied ersichtlich ist. Bereits jetzt beginnt die Aufzeichnung der Feldstärkedaten im Hintergrund.
- 4) **Start der Expositionszeit:** Ist die Zielfeldstärke eingeregelt und stabil, beginnt die eigentliche Expositionszeit. Signalisiert wird dies durch eine orangefarbene Signalleuchte in der oberen Reihe der Benutzeroberfläche. Die Expositionszeit wird durch den Startcode automatisch festgelegt und ist im Gegensatz zur Zielfeldstärke für den Benutzer ersichtlich. Angezeigt wird ebenfalls die bereits verstrichene Expositionszeit. Dieser Wert wird alle 5 sek aktualisiert. Die Zielfeldstärke wird im Hintergrund als statistischer 5-sek-Mittelwert kontrolliert. Eine Abweichung von über 1 dB gegenüber der Zielfeldstärke führt zum Aufleuchten der roten Fehlerleuchte und dem sofortigen Abbruch des Experiments. Das HF-Signal wird dabei automatisch ausgeschaltet.
- 5) **Ende der Exposition:** Nach Verstreichen der Expositionszeit wird das HF-Signal deaktiviert und das Programm automatisch beendet. Wenn alle Log-Dateien abgespeichert wurden und über die gesamte Expositionszeit kein Fehlerfall eingetreten ist, leuchtet die große Signalleuchte in der oberen rechten Ecke grün auf.

#### 2.3.1.2. Fehlerfall

Für den Fall, dass das Experiment aufgrund eines äußerlich bedingten Fehlerfalls abgebrochen werden muss, kann der große rote Stopp-Button in der Mitte betätigt werden. Dies sorgt für eine Deaktivierung des HF-Signals und ein sofortiges Beenden des Programms.

### 2.3.1.3. Aufzeichnung und Überwachung relevanter Parameter

Bei der Durchführung eines Experiments werden die Daten der gemessenen elektrischen Feldstärke auf zwei Arten aufgezeichnet.

- 1) **Datenstream:** Mit dem Starten des Experiments wird das Datenstream-Logging des Lumiloop-Systems gestartet. Diese Funktion erlaubt die Aufzeichnung der Rohdaten für jede der acht Feldsonden separat und je Achse (x, y, z) mit zeitlich hoher Auflösung. Maximal möglich ist eine Datenrate von 500 kS/sek. Um die Stabilität der Aufzeichnung mit dem Kontrollrechner zu gewährleisten und eine praktisch handhabbare Datenmenge zu erhalten, wurde die Aufzeichnung der Rohdaten mit reduzierter Samplingrate durchgeführt. Gewählt wurde eine Datenrate von 100 S/sek, sodass alle 10 ms 24 Feldstärkewerte (acht Sonden mit je drei Achsen) aufgezeichnet werden. Das Abtastintervall liegt damit immer noch unterhalb der Kohärenzzeit, i.e. der Zeitspanne, nach der während der kontinuierlichen Feldverwirbelung eine neue, unkorrelierte Feldverteilung vorliegt (Oppermann and Löser, 2022). Der Datenstream wird vom Lumiloop-TCP-Server speichereffizient im Binärformat abgespeichert. Für jede eingesetzte Feldsonde wird jeweils eine .bin-Datei und eine .lut-Datei geschrieben. Die Dateien können nach Abschluss der Experimente mit einem Konvertierungsprogramm in .csv-Dateien umgewandelt werden. Mit diesen Daten ist eine Auswertung der Gleichförmigkeit des Feldes, sowie der Anzahl statistisch unabhängiger Randbedingungen für jedes durchgeführte Experiment explizit möglich.
- 2) **Statistische Feldstärke als 5-sek-Mittelwert:** Zusätzlich zu den Rohdaten wird in einer .csv-Datei der 5-sek-Mittelwert der elektrischen Feldstärke geloggt. Dieser wird vom Lumiloop-TCP-Server intern auf Basis der mit maximaler Abtastrate von 500 kS/sek generierten Felddaten aus acht Feldsonden (je drei Achsen) berechnet. Hierbei wird das *Logging* jedoch erst bei Beginn der eigentlichen Expositionszeit, d.h. nach dem Einregeln der Zielfeldstärke gestartet. Aus den 5-sek-Mittelwerten lässt sich mit maximaler Genauigkeit direkt der 6-Minuten-Mittelwert der statistischen elektrischen Feldstärke berechnen.

## 2.4. In-situ Installation und Inbetriebnahme

### 2.4.1. Installation in der Pflanzenanzuchtkammer

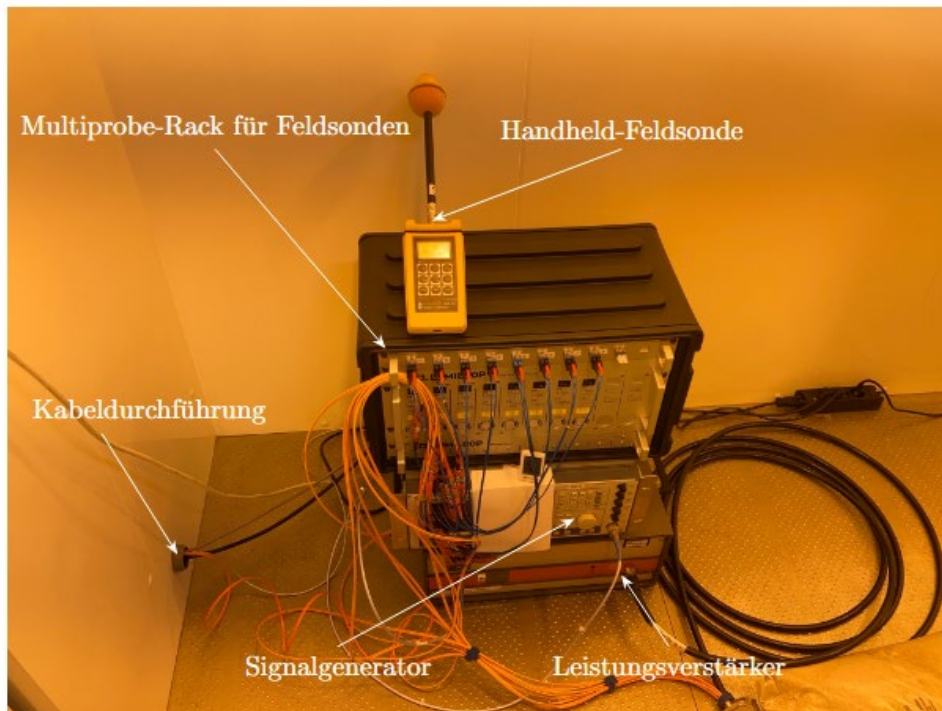
Abbildung 2.13 zeigt die in der Pflanzenanzuchtkammer der Universität Bonn installierte Modenverwirbelungskammer. Die Probenpflanzen befinden sich in einem von acht Feldsensoren berandeten Testvolumen. Als Erhöhung dient ein Podest aus Polystyrolkisten. Der Boden der Pflanzschalen befindet sich auf einer Höhe von 81 cm. Die Feldsonden sind auf einer Höhe von 80 cm bzw. 140 cm über dem Boden angebracht. Das Viertelwellenkriterium ist an jeder Stelle eingehalten.



**Abbildung 2.13:** Blick durch das Fenster der Anzuchtkammer mit installiertem Expositionszelt.

Sämtliche Messgeräte, sowie Geräte zur Felderzeugung befinden sich innerhalb der Anzuchtkammer, aber außerhalb des Abschirmzelt, gezeigt in Abbildung 2.14. Die Platzierung der Messtechnik innerhalb der Kammer verhindert, dass der Benutzer über eventuell unterschiedliche Betriebsgeräusche bei Experimenten mit unterschiedlichen Zielfeldstärken einen Hinweis auf die tatsächliche Exposition erhält. Ein Ablesen der Geräte ist für den Benutzer der Expositionsanlage zudem während der Experimente nicht möglich. Sicherheitshalber ist das Display des Signalgenerators zusätzlich abgedeckt und nicht ablesbar. Über einen Durchführungskanal sind die

Datenleitungskabel an den Kontrollrechner angeschlossen, der sich außerhalb der Anzuchtammer befindet.

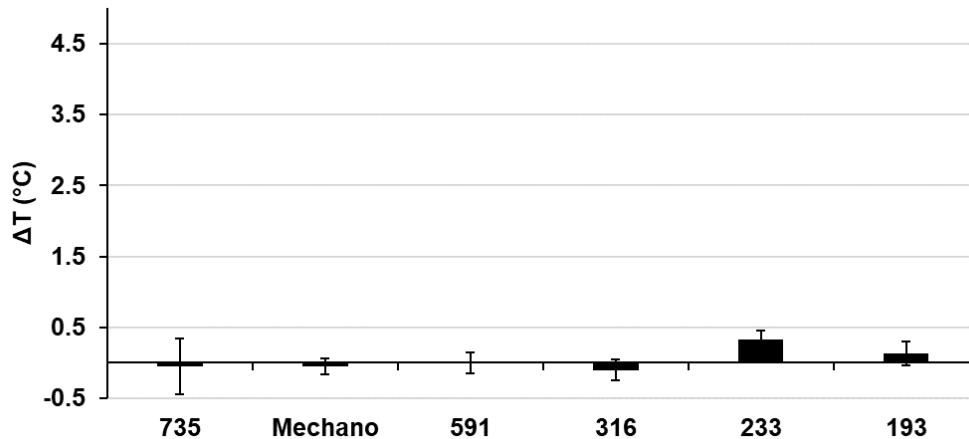


**Abbildung 2.14:** Aufbau der Felderzeugungs- und Messtechnik innerhalb der Pflanzenanzuchtammer.

## 2.4.2. Charakterisierung betriebsrelevanter Parameter

### 2.4.2.1. Wärmeerzeugung der Geräte innerhalb der Pflanzenanzuchtammer

Um zu überprüfen, ob die Geräte, die sich in der Pflanzenanzuchtammer zur Feldstärke-Generierung und zur Feldstärke-Überwachung befinden (Feldsonden, Signalgenerator, HF-Verstärker, Anregungsmotor) eine relevante Abwärme produzieren, wurden Temperaturmessungen in der Pflanzenanzuchtammer durchgeführt. Dazu wurde die Temperatur innerhalb der Anzuchtammer, aber außerhalb des Expositionszeltes vor und nach jedem Expositionsszenario gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2.15 dargestellt.

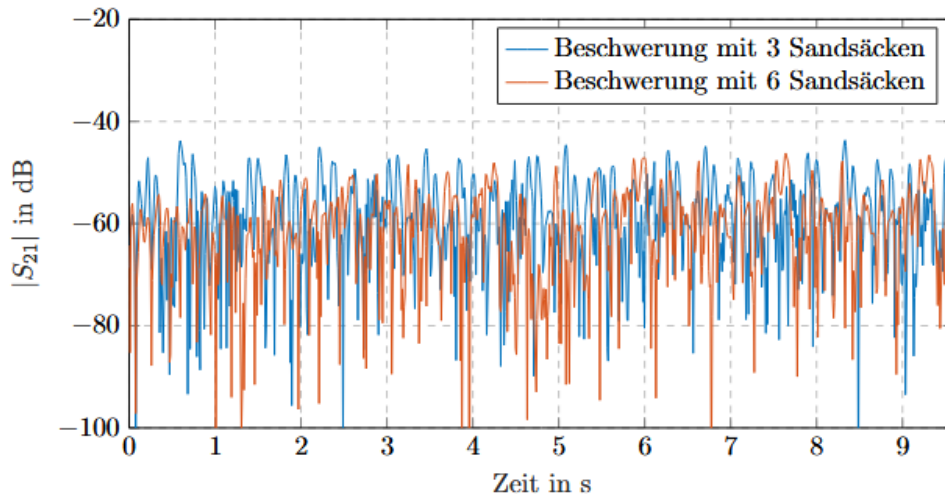


**Abbildung 2.15:** Temperaturunterschiede innerhalb der Pflanzenanzuchtkammer vor und nach den unterschiedlichen Expositionsszenarien. Die X-Achse gibt die einzelnen Startcodes und somit die unterschiedlichen Expositionsszenarien wieder (735, 591, 316 = 15 min Exposition oder Scheinexposition von Tomaten; Mechano = mechanischer Stress durch Verwundung von Tomaten; 233, 193 = 30 min Exposition oder Scheinexposition von Rosenstecklingen). Die Y-Achse zeigt die Temperaturänderung  $\Delta T$  (Temperatur nach der Exposition – Temperatur vor der Exposition). Angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler der Temperaturunterschiede für jeden Startcode, wobei 735, Mechano, 591, und 316 ( $n = 2$ ) und 233 und 193 ( $n = 6$ ). min = Minuten.

Es ist ersichtlich, dass die Temperaturen innerhalb der Pflanzenanzuchtkammer, um die Messgenauigkeit der verwendeten Thermometer schwanken ( $\pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Somit kommt es durch die Geräte, die sich in der Pflanzenanzuchtkammer zur Feldstärke-Generierung und zur Feldstärke-Überwachung befinden, zu keiner nennenswerten Temperaturänderung innerhalb der Pflanzenanzuchtkammer.

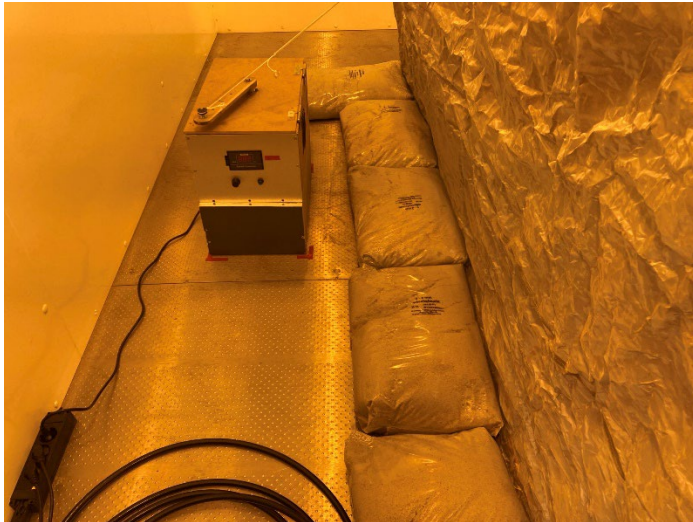
#### 2.4.2.2. Schirmdämpfung

Abbildung 2.16 fasst die Ergebnisse einer qualitativen Schirmdämpfungsmessung bei der Inbetriebnahme zusammen. Dazu ist mit einem vektoriellen Netzwerkanalysator (*ENA5080, Keysight Technologies*) und einer der Sendeantenne baugleichen Discone-Antenne die Transmission bei eingeschalteter Feldverwirbelung gemessen worden. Die zweite Antenne wurde dabei innerhalb der Pflanzenanzuchtkammer, aber außerhalb des Abschirmzeltes platziert. Gezeigt ist der Betrag des  $|S_{21}|$ -Parameters bei 900 MHz über einen Betrachtungszeitraum von 10 sek (entspricht mehreren mechanischen Anregungsperioden) für zwei verschiedene Beschwerungen des Kontaktierungskragens.



**Abbildung 2.16:** Schirmdämpfung (elektromagnetisch) bei 900 MHz über 10 Sekunden (s) bei Zeltanregung für unterschiedliche Beschwerungen des Zeltüberhanges auf dem Metallboden.

Als besonders praktikabel haben sich Sandsäcke zur Beschwerung erwiesen, wie in Abbildung 2.17 dargestellt. Diese sorgen für einen großen, flächigen Anpressdruck und gleichen dabei die Unebenheiten des genoppten Metallfußbodens aus. Dadurch wird eine hohe kapazitive Verkopplung des Zeltmaterials mit dem Fußboden erreicht. Es ist ersichtlich, dass bereits 3 Sandsäcke (je 25 kg), verteilt auf dem Kontaktierungskragen, ausreichen um eine Schirmdämpfung von 40 dB dauerhaft zu unterschreiten. Eine Verwendung von mindestens 6 Sandsäcken führt zu einer geringfügigen Verbesserung, sodass 46 dB Schirmdämpfung dauerhaft unterschritten werden. Dies entspricht bei einer eingestellten Expositionsfeldstärke von 40 V/m innerhalb des Zeltes einer Dämpfung auf maximal 0,2 V/m außerhalb der Abschirmung, was deutlich unterhalb des Eigenrauschlevels der verwendeten Feldsonden liegt. Für den Aufbau werden 10 Sandsäcke zur Beschwerung verwendet um eine möglichst große kapazitive Verkopplung von Zeltwand und Aluminiumfußboden zu erreichen.



**Abbildung 2.17:** Beschwerung des Kontaktierungskragens mit Sandsäcken.

### 2.4.2.3. Gleichförmigkeit des Feldes

Die Gleichförmigkeit des Feldes, i.e. Feldhomogenität und Isotropie, ist anlehnend an das in der Norm IEC 61000-4-21 (IEC 61000-4-21, 2011) beschriebene Verfahren validiert worden. Dort wird davon ausgegangen, dass die Kammer die Anforderungen zur Gleichförmigkeit des Feldes erfüllt, wenn die Standardabweichung der maximalen E-Feldstärkewerte sowohl für die drei einzelnen Feldkomponenten ( $E_x$ ,  $E_y$ , und  $E_z$ ) als auch für den gesamten Datensatz ( $E_{\text{gesamt}}$ ) innerhalb der festgelegten Grenzabweichung liegt. Der gesamte Datensatz besteht aus den 24 Messungen, die sich durch die Kombination der drei einzelnen Feldkomponenten ( $E_x$ ,  $E_y$ , und  $E_z$ ) an den acht Orten der E-Feldsonden ergeben.

Die Gleichförmigkeit des Feldes ist der wichtigste Indikator für eine gut funktionierende Modenverwirbelungskammer (Serra, 2009). Zur Ermittlung wird zunächst für jede der acht Feldsonden und für alle Raumkomponenten  $E_{xyz}$  der maximale, ermittelte Wert aus den N-Einzelmessungen bestimmt:

$$E_{\max,i} = \max_{j=1 \dots N} (E_{i,j}); i \in \{1, \dots, 8\} \quad (2)$$

Bei einer Samplingrate von 500 kS/sek und einer Betrachtungszeit von 5 sek wird also das Maximum aus  $N = 2,5$  Millionen Einzelmessungen berechnet. Aus den 24 maximalen Feldkomponenten wird anschließend der Mittelwert (Formel 3) und die Standardabweichung (Formel 4) der jeweiligen Raumrichtung wie folgt berechnet:

$$\langle E \rangle_8 = \frac{1}{8} \sum_{i=1}^8 E_{\max,i} \quad (3)$$

$$\sigma_8 = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^8 (E_{\max,i} - \langle E \rangle_8)^2}{8 - 1}} \quad (4)$$

Analog dazu wird der Mittelwert  $\langle E_{24} \rangle$  und die Standardabweichung  $\sigma_{24}$  aus allen 24 Komponenten ermittelt. Anschließend wird die Standardabweichung normiert auf den Mittelwert in dB ausgedrückt:

$$\sigma_{\text{dB}} = 20 \log_{10} \left( \frac{\sigma + \langle E \rangle}{\langle E \rangle} \right) \quad (5)$$

Es ergeben sich also vier verschiedene Standardabweichungen:  $\sigma_{8,x}$ ,  $\sigma_{8,y}$ ,  $\sigma_{8,z}$  und  $\sigma_{24}$ . Die mechanische Zeltanregung konnte so eingestellt werden, dass alle der vier Standardabweichungen der maximalen E-Feldstärkewerte pro 5-sek-Intervall, deutlich unter dem in (IEC 61000-4-21, 2011) vorgegebenen Grenzwert von 3 dB liegen.

In Tabelle 2.1 sind die ermittelten Werte bei der Erstinbetriebnahme dargestellt. Die Einhaltung dieser Bedingung kann jedoch für jedes durchgeführte Experiment anhand der aufgezeichneten Felddaten explizit validiert werden.

**Tabelle 2.1:** Indikatoren für die Gleichförmigkeit des Feldes bei der Erstinbetriebnahme.

$\sigma_{8,x}$	$\sigma_{8,y}$	$\sigma_{8,z}$	$\sigma_{24}$
2,25 dB	2,33 dB	1,74 dB	2,06 dB

## Arbeitspaket 3 Genexpression in Tomaten

### 3.1. Einleitung und Zielsetzung

In AP3 sollten im Speziellen zwei Studien aus 2006 reproduziert werden (Roux et al., 2006; Vian et al., 2006). In diesen Arbeiten wurden die Genexpressionsänderungen gezielter Tomatengene (*Calmodulin-N6*, *Proteinase Inhibitor 2 (PI)*, *BASIC LEUCINE ZIPPER 1 (bZIP)*, und *Chloroplast mRNA-binding Protein*) kurzzeitig (bis 60 Minuten) nach HF-EMF-Exposition (900 MHz, 5 V/m und 40 V/m) untersucht (Roux et al., 2006; Vian et al., 2006).

Neben der gezielten Analyse von Genexpressionsänderungen des *PI*-Gens und des *bZIP*-Gens sollten in AP3 zusätzlich die transkriptomweiten (Transkriptom = die Gesamtheit aller exprimierten Ribonukleinsäuren (RNA)) Genexpressionsänderungen von Tomaten nach kurzfristiger Wirkung von HF-EMF (900 MHz, 0 V/m, 5 V/m, und 40 V/m für jeweils 15 Minuten) mittels RNA-Sequenzierung (RNA-Seq) untersucht werden. Darüber hinaus sollten ATP-Messungen der exponierten und scheinexponierten Proben durchgeführt werden, um die Ergebnisse einer weiteren Studie aus der Arbeitsgruppe Vian zu replizieren (Roux et al., 2008a). Es sollten verschiedene Zeitpunkte nach Expositionsende beprobt werden (0 Minuten, 15 Minuten, 30 Minuten, und 60 Minuten). Abweichend von der Leistungsbeschreibung wurde zusätzlich der Zeitpunkt vor der Exposition/Stressbedingung beprobt. Als Positivkontrolle wurde ein leichter mechanischer Stress (durch Anschneiden des 4. Blattes) verwendet. Die Durchführung des Experiments und die Auswertung der RNA-Seq Daten erfolgten verblindet, das heißt den Versuchsdurchführenden blieb verborgen, welches Expositionsszenario wann durchgeführt wurde. Nach der vollständigen bioinformatischen Auswertung wurde die Verblindung gelöst und anschließend eine Auswahl an Genen, die zwischen den exponierten und scheinexponierten Ansätzen differenziell exprimiert werden, mittels quantitativer-PCR (RT-qPCR) validiert. Abschließend sollten bioinformatische Netzwerkanalysen angeschlossen werden.

### 3.2. Versuchsdurchführung, Methodik und Ergebnisse

#### 3.2.1. Modenverwirbelungskammer

Für die detaillierte Beschreibung zur mobilen Modenverwirbelungskammer, die für die kontrollierte Exposition von Pflanzen mit HF-EMF (900 MHz, verschiedene Feldstärken) entwickelt wurde, sei auf Arbeitspaket 2 verwiesen.

#### 3.2.2. Exposition, Verblindung, und Szenarien

Die verblindete Durchführung von im Vorfeld definierten Expositionen wurde mit der hierfür programmierten Software *Fields'N'Roses* ermöglicht. Eine definierte Exposition bestand aus einer Zielfeldstärke und einer Expositionszeit. Für AP3 sollten drei definierte Expositionen untersucht werden:

- 900 MHz, 5 V/m, 15 min
- 900 MHz, 40 V/m, 15 min
- 900 MHz, 0 V/m, 15 min

Diesen drei definierten Expositionen wurden im *Backend* der Software jeweils ein Startcode fest zugeordnet. Ein Startcode ist eine dreistellige Zahlenkombination, die vom Institut für elektromagnetische Verträglichkeit festgelegt wurde und mit der die Expositionsszenarien über die *Fields'N'Roses* Software gestartet werden konnten (für Details siehe 2.3). Für AP3 wurden drei Startcodes für die drei definierten Expositionen festgelegt, nämlich 316, 591 und 735. Die Zuordnung der Startcodes zu den definierten Expositionen blieben den Versuchsdurchführenden an der Uni Bonn verborgen, sodass die Experimente verblindet durchgeführt werden konnten. Da bei der Durchführung des mechanischen Stresses das 4. Blatt manuell angeschnitten wurde, konnte dieses Szenario nicht verblindet durchgeführt werden. Die Auswertung der Daten wurde von einer Person durchgeführt, die an der Versuchsphase nicht beteiligt war, sodass alle Daten verblindet ausgewertet wurden.

In AP3 wurden insgesamt vier Szenarien durchgeführt, die im Folgenden mit I, II, III, und IV bezeichnet werden und denen die folgenden experimentellen Bedingungen zugrunde liegen: Scheinexposition (0 V/m für 15 Minuten), Exposition mit 5 V/m (15 Minuten), Exposition mit 40 V/m (15 Minuten), und ein mechanischer Stress, durch Anschneiden des 4. Blattes. Die festgelegten Startcodes der Expositionsszenarien und der mechanische Stress wurden randomisiert den vier Szenarien (I – IV) zugeordnet. Da es während der Durchführung von Szenario IV zu technischen Schwierigkeiten kam, die in den folgenden Abschnitten genauer erklärt werden, wurde

Szenario IV wiederholt. Die Wiederholung wird im Folgenden mit R\_IV angegeben. Die Zuordnung zu den einzelnen Szenarien ist in Tabelle 3.1 angegeben.

**Tabelle 3.1:** Zuordnung der verschiedenen Szenarien zu den Startcodes und dem mechanischen Stress, sowie Datumsangabe des Versuchstags. \* Szenario IV musste aus technischen Gründen wiederholt werden. Die Wiederholung wird im Folgenden mit R\_IV gekennzeichnet.

Szenario-Nummer	Bedingung	Datum
I	Startcode 735	22.04.2024
II	Mechanischer Stress	23.04.2024
III	Startcode 591	24.04.2024
IV	Startcode 316	26.04.2024
R_IV*	Startcode 316	10.07.2024

Für jedes Szenario wurden fünf Zeitpunkte beprobt. Diese waren vor Exposition, 0 Minuten nach Exposition, 15 Minuten nach Exposition, 30 Minuten nach Exposition, und 60 Minuten nach Exposition. Die Beprobung der einzelnen Zeitpunkte wird in Abschnitt 3.4. im Detail erklärt.

### 3.2.3. Tomatenaufzucht

Um die Auswirkungen von HF-EMF auf das Transkriptom von Tomaten (*Solanum lycopersicum*) zu untersuchen, wurde die Sorte Sweet-100 ausgewählt, da diese vollständig sequenziert ist (Alonge et al., 2022), relativ kleinwüchsig ist, und eine schnelle Generationsdauer hat. Dies ist eine Abweichung zu der verwendeten Sorte in den zu replizierenden Studien (Roux et al., 2006; Vian et al., 2006). Dort wurde die Tomatensorte VFN-8 (*Lycopersicon esculentum*) verwendet. Diese Abweichung wurde bereits im Angebot vorgeschlagen, da die Sorte VFN-8 nicht sequenziert ist, was die Auswertung von Transkriptomdaten beeinflussen kann, da nicht auf das tatsächliche Genom *gemapped* werden kann, sondern das Referenzgenom (*Solanum lycopersicum* cv. Heinz 1706) verwendet werden muss.

In den zu replizierenden Studien wurde jeweils das 4. Blatt von Tomatenpflanzen beprobt (Roux et al., 2006, 2008; Vian et al., 2006). Wie in den Vian-Studien angegeben, entwickelt sich das 4. Blatt bei der Tomatensorte VFN-8 nach ca. 3 Wochen. In Vorversuchen wurde deswegen die Entwicklung der von uns verwendeten Tomatensorte Sweet-100 bis zur Bildung des 4. Blattes untersucht. Das 4. Blatt entwickelte sich nach 3 Wochen. Somit ist die frühe Blattentwicklung der Tomatensorte Sweet-100 mit der von VFN-8 vergleichbar.

Für die Tomatenaufzucht wurden insgesamt 216 Töpfe mit jeweils 100 g Erde befüllt (ein 10:1:1 Mix aus Floragard B fein, Sand, und Perligran G), anschließend bis zur vollen Feldkapazität gewässert, das heißt vollständig mit Wasser gesättigt, und abschließend gewogen (mittleres Gewicht = 199.4 g  $\pm$  7.5 g). Pro Topf wurde ein Samenkorn ca. 2,5 cm tief eingepflanzt. 24 Töpfe wurden auf eine Pflanzschale gestellt. Jede Pflanzschale (24 Töpfe) wurde in eine Plastiktüte verpackt (zur Erhöhung der Luftfeuchtigkeit). Die Pflanzschalen wurden in die Anzuchtammer (Klimakammer 1) überführt (16 h Tag, 8 h Nacht, 26 °C Tag, 21 °C Nacht, 70% Luftfeuchtigkeit 150  $\mu$ mol / m<sup>2</sup>s). Die Folie verblieb bis zur Keimung über den Pflanzschalen (3 - 4 Tage) und wurde sobald die Tomatenkeimlinge sichtbar waren entfernt. Die Tomaten verblieben in der Klimakammer 1 bis zur Durchführung der Experimente für insgesamt drei Wochen. Die Tomaten wurden betriebsüblich alle zwei Tage einheitlich bis zur vollen Feldkapazität gewässert.

#### 3.2.4. Durchführung/Probennahme

##### 3.2.4.1. Akklimatisierung der Pflanzen in der Expositionskammer

Analog zu Roux et al. (2006) und Vian et al. (2006) wurde täglich nur ein Versuchsszenario durchgeführt (Tabelle 3.1). Am Vortag um 17:00 wurden jeweils 48 Pflanzen bezüglich ihrer Wuchshöhe und der Länge des 4. Blattes phänotypisiert. Um 18:00 wurden diese 48 Pflanzen in die Expositionskammer (Klimakammer 2 mit Expositionszelt) zum Akklimatisieren überführt (auf 2 Pflanzschalen). Die beiden verwendeten Klimakammern sind baugleich und die Wachstumsbedingungen waren einheitlich (16 h Tag, 8 h Nacht, 26 °C Tag, 21 °C Nacht, 70 % Luftfeuchtigkeit 150  $\mu$ mol / m<sup>2</sup>s<sup>1</sup>).

##### 3.2.4.2. Übersicht über die Beprobung allgemein

Für jedes der vier Szenarien (I, II, III, IV) und für jeden Beprobungszeitpunkt (vor Exposition, 0 Minuten nach Exposition, 15 Minuten nach Exposition, 30 Minuten nach Exposition, und 60 Minuten nach Exposition) wurden jeweils die 4. Blätter der Tomatenpflanzen beprobt. Für jeden Beprobungszeitpunkt nach Exposition bzw. nach dem mechanischen Stress wurden 4 Pflanzen für die RNA-Sequenzierung und als *Backup* 7 weitere Pflanzen beprobt. Zusätzlich wurden an jedem Versuchstag 4 Pflanzen vor der Exposition bzw. vor dem mechanischen Stress beprobt, so dass für jedes Szenario alle 48 Pflanzen beprobt wurden. Um zusätzlich eine verblindete Auswertung über die Zeitpunkte zu ermöglichen wurden den einzelnen Zeitpunkten

Buchstaben zugeordnet (a – e). Eine Übersicht zur Beprobung inklusive der Beprobungszeitpunkte ist in Tabelle 3.2 angegeben.

**Tabelle 3.2:** Übersicht zur Beprobung der einzelnen Versuchsszenarien.

Szenario	Abkürzung Zeitpunkt	Zeitpunkt	Anzahl beprobter Pflanzen
I, II, III, IV, R_IV	e	Kontrollzeitpunkt = vor Exposition	4
	a	0 Minuten nach Exposition	11
	b	15 Minuten nach Exposition	11
	c	30 Minuten nach Exposition	11
	d	60 Minuten nach Exposition	11

#### 3.2.4.3. Beprobung der unexponierten Kontrolle am Versuchstag

An jedem Versuchstag wurden vor Versuchsbeginn (Uhrzeit = 8:45) 4 Pflanzen beprobt (Zeitpunkt e = unexponierte Kontrolle). Dazu wurde von den 4 Pflanzen jeweils das 4. Blatt komplett geerntet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren (die Auswahl der 4 Pflanzen erfolgte zufällig und randomisiert). Anschließend wurde die Temperatur im Expositionszelt, sowie außerhalb des Expositionszeltes notiert (die Ergebnisse der Temperaturänderungen sind in Arbeitspaket 2 aufgeführt).

#### 3.2.4.4. Beprobung nach Exposition oder mechanischem Stress am Versuchstag

Expositionsszenarien: Nach Beprobung der unexponierten Kontrolle (Zeitpunkt e) wurde das Expositionszelt geschlossen, alle Geräte angeschaltet (Motorbox für Verwirbelung am Zelt, Verstärker, Signalgenerator, Lumiloop-Sonden, Kontrollrechner), sodass jeweils um 09:00 ein Expositionsexperiment mittels Startcode über den Kontrollrechner und die *Fields'N'Roses* Software gestartet werden konnte (Tabelle 3.1; Szenarios I, III, IV, und R\_IV). Jedes Expositionsszenario hatte eine Zeitdauer von 15 Minuten. Nach Ablauf der 15 Minuten (09:15) wurde der Verstärker auf *Standby* gesetzt, die Motorbox ausgeschaltet, das Expositionszelt geöffnet, und sofort Zeitpunkt 0 Minuten nach Exposition (Zeitpunkt a) beprobt (je ein Blatt von 11 Pflanzen: 4 Blätter für die RNA-Sequenzierung, als *Backup* jeweils 3 Proben mit jeweils 2 Blättern und 1 Probe mit 1 Blatt). Zudem wurde die Temperatur innerhalb und außerhalb des Expositionszeltes notiert, um mögliche Temperaturänderungen während der Exposition zu dokumentieren. Die Ergebnisse dieser Temperaturmessungen sind unter Arbeitspaket 2 angegeben. Die weitere Beprobung erfolgte analog nach 15 Minuten (Zeitpunkt b), 30 Minuten (Zeitpunkt c), und nach 60 Minuten (Zeitpunkt d).

Mechanischer Stress: Nach Beprobung der unexponierten Kontrolle (Zeitpunkt e) wurde der mechanische Stress um 09:00 gestartet (Tabelle 3.1, Szenario II). Dazu wurde das 4. Blatt einer Pflanze mittig angeschnitten, anschließend sofort komplett abgeschnitten, und schockgefroren (Zeitpunkt a = 0 Minuten). Dies wurde an 10 weiteren Pflanzen wiederholt, sodass insgesamt 11 Pflanzen am Zeitpunkt a beprobt wurden. Anschließend wurde das 4. Blatt aller restlichen Pflanzen analog mechanisch gestresst. Die weitere Beprobung dieser Pflanzen erfolgte nach 15 Minuten (Zeitpunkt b), 30 Minuten (Zeitpunkt c), und nach 60 Minuten (Zeitpunkt d).

#### 3.2.4.5. Aufbewahrung exponierter und mechanisch gestresster Pflanzen zur weiteren Phänotypisierung

Nach jedem Versuchsszenario wurden 6 Einzelpflanzen für eine nachfolgende phänotypische Analyse bezüglich der Wuchshöhe aufbewahrt.

#### 3.2.4.6. Ausfall Verstärker, Versuchstag = Szenario IV, und Wiederholung von Szenario IV = R IV

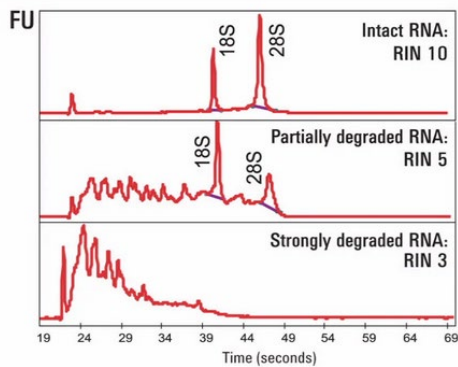
Nach Durchführung von Szenario III am 24.4.2024 wurde mit einer 0,1°C genauen Temperatursonde (Ebro EBI 310 V2.02.0) Messungen in der Erde durchgeführt, um potentielle Temperaturänderungen in den Tomatentöpfen während der unterschiedlichen Expositionen zu analysieren. Die Ergebnisse dazu sind unter Arbeitspaket 4 und Arbeitspaket 5 angegeben. Dabei kam es zum Komplettausfall des Verstärkers, sodass ein Ersatz-Verstärker aus Braunschweig geholt werden musste. Nach der Einbindung des neuen Verstärkers am Folgetag kam es teilweise zu Ausfällen von einzelnen Feldsonden. Dies betraf hauptsächlich die zusätzliche Feldsonde, die nur zu Testzwecken für Temperaturmessungen verwendet wurde. Das Durchlaufen der einzelnen Expositionsszenarien wurde durch den Ausfall dieser „Temperatursonde“ nicht gestört, da die Messwerte dieser Sonde nicht zur Berechnung der tatsächlichen Befeldung beitrugen. Auch der Ausfall einzelner Messfeldsonden während der HF-EMF-Exposition behinderte das fehlerfreie Durchlaufen von Expositionsszenarien nicht, da sie nur zu geringfügigen Veränderungen in der Feldstärke-Erfassung führten, die innerhalb des 1 dB Toleranzniveaus lagen, das als Abbruchkriterium diente. Deswegen wurde der letzte Versuchstag durchgeführt, allerdings nicht, wie geplant am 25.4.24, sondern erst am 26.4.24. Zusätzlich kam es an dem Versuchstag zu Schwierigkeiten bei der Lieferung des benötigten flüssigen Stickstoffs. Somit konnte die Exposition an diesem Tag erst

um 10:00 gestartet werden (alle anderen Versuche wurden um 09:00 gestartet). Nach Starten der Software fiel auf, dass der Einregelungsvorgang deutlich länger dauerte als bei den vorangegangenen Versuchstagen (Anmerkung: Es stellte sich im Nachgang heraus, dass es während der Einregelung bereits zum Ausfall einer Feldsonde kam. Da im Vorfeld die Software so programmiert war, dass für die Einregelung alle Feldsonden benötigt werden, konnte die Einregelung nicht funktionieren. Die Abhängigkeit des Einregelungsvorgangs von allen Feldsonden wurde für die Experimente der Arbeitspakete 4 und 5 geändert). Nach 3 Minuten wurde deswegen die Software manuell gestoppt und nochmal gestartet. Um einen *Reset* des Systems zu ermöglichen wurde erneut gestoppt und das System komplett neu gestartet, inklusive aller Geräte. Nach einer erneuten Einregelung lief die Exposition 15 Minuten lang durch, wobei es zwischenzeitlich zum Ausfall einer Feldsonde kam (siehe Abb. 3.10C). Alle Proben wurden analog zu den drei vorangegangenen Szenarien geerntet. Wegen den technischen Schwierigkeiten bei dem Starten der Exposition wurde Rücksprache mit der TU Braunschweig gehalten. Da die Feldsonden-Daten zeigten, dass die angestrebte Feldstärke über die gesamte Expositionsdauer nach dem 3. Start innerhalb des Toleranzniveaus (1 dB Abbruchkriterium) geblieben ist und somit die Versuchspflanzen über den Zeitraum von 15 Minuten einem homogenen und isotropen Feld mit der angestrebten Feldstärke ausgesetzt waren, wurde gemeinsam entschieden, die Proben dennoch zur Sequenzierung zu schicken. Die Verblindung war im gesamten Verlauf des Experiments nie gefährdet und wurde strikt aufrechterhalten.

### 3.2.5. Transkriptom-Analyse

#### 3.2.5.1. RNA-Isolation und Qualitätssicherung

Für die Isolation von *messenger*-Ribonukleinsäure (mRNA) wurde das NucleoSpin RNA Plant, mini Kit für RNA aus Pflanzen der Firma Macherey-Nagel verwendet (Bestellnummer: 740949.250). Die Isolation erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Konzentration, sowie die Qualität der isolierten RNAs wurden anschließend mit Hilfe des Bioanalyzer RNA 6000 Nano-Systems der Firma Agilent überprüft. Das Bioanalyzer System liefert als Ergebnis Gel-ähnliche Bilder und einen RIN-Wert. Der RIN-Wert (*RNA integrity number*) ist ein objektiver, metrischer Wert zwischen 1 und 10, der die Qualität der isolierten RNA angibt. 1 bedeutet, dass die RNA hochgradig degradiert ist und 10 bedeutet, dass die RNA intakt ist (Abb. 3.1).



**Abbildung 3.1:** Beispielhafte Darstellung intakter und degradierter RNA in Form von Gel-ähnlichen Bildern und mit Angabe des entsprechenden RIN-Wertes. Abbildung übernommen von: [Link zum Bioanalytiker-Manual](#). RIN = RNA integrity number.

RNA-Proben mit RIN-Werten ab 7 gelten als qualitativ hochwertig, sodass sie für jegliche Sequenzierungen verwendet werden können. In Tabelle 3.3 werden die RIN-Werte der isolierten RNAs dargestellt. Die Probenamen setzen sich, wie folgt zusammen:

EMF\_Szenario\_Zeitpunkt\_biologisches Replikat

Die RNA Probe aus Szenario I zum Zeitpunkt b (15 Minuten nach Expositionsende) des 3. geernteten Blattes ist demnach mit EMF\_I\_b\_3 bezeichnet. Alle RIN-Werte waren deutlich über 7 und die Proben wurden deswegen zum Sequenzieren an die Firma Novogene GmbH geschickt.

**Tabelle 3.3:** Probenamen und RIN-Werte der isolierten RNA-Proben für die Versuchsszenarien I - IV. RIN = RNA integrity number, Sz. = Szenario.

Probenname Sz. I	RIN Sz. I	Probenname Sz. II	RIN Sz. II	Probenname Sz. III	RIN Sz. III	Probenname Sz. IV	RIN Sz. IV
EMF_I_a_1	8.7	EMF_II_a_1	8.6	EMF_III_a_1	8.4	EMF_IV_a_1	8.3
EMF_I_a_2	8.7	EMF_II_a_2	8.6	EMF_III_a_2	8.6	EMF_IV_a_2	8.5
EMF_I_a_3	8.8	EMF_II_a_3	8.6	EMF_III_a_3	8.4	EMF_IV_a_3	8.5
EMF_I_a_4	8.7	EMF_II_a_4	8.7	EMF_III_a_4	8.5	EMF_IV_a_4	8.1
EMF_I_b_1	8.6	EMF_II_b_1	8.5	EMF_III_b_1	8.4	EMF_IV_b_1	8.4
EMF_I_b_2	8.8	EMF_II_b_2	8.6	EMF_III_b_2	8.3	EMF_IV_b_2	8.4
EMF_I_b_3	8.8	EMF_II_b_3	8.3	EMF_III_b_3	8.3	EMF_IV_b_3	8.4
EMF_I_b_4	8.7	EMF_II_b_4	8.5	EMF_III_b_4	8.4	EMF_IV_b_4	8.6
EMF_I_c_1	8.7	EMF_II_c_1	8.3	EMF_III_c_1	8.4	EMF_IV_c_1	8.4
EMF_I_c_2	8.6	EMF_II_c_2	8.6	EMF_III_c_2	8.2	EMF_IV_c_2	8.2
EMF_I_c_3	8.6	EMF_II_c_3	8.5	EMF_III_c_3	8.5	EMF_IV_c_3	8.1
EMF_I_c_4	8.8	EMF_II_c_4	8.5	EMF_III_c_4	8.5	EMF_IV_c_4	8.4
EMF_I_d_1	8.4	EMF_II_d_1	8.5	EMF_III_d_1	8.3	EMF_IV_d_1	8.4

Probename Sz. I	RIN Sz. I	Probename Sz. II	RIN Sz. II	Probename Sz. III	RIN Sz. III	Probename Sz. IV	RIN Sz. IV
EMF_I_d_2	8.6	EMF_II_d_2	8.4	EMF_III_d_2	8.5	EMF_IV_d_2	8.3
EMF_I_d_3	8.6	EMF_II_d_3	8.4	EMF_III_d_3	8.5	EMF_IV_d_3	8.3
EMF_I_d_4	8.6	EMF_II_d_4	8.4	EMF_III_d_4	8.2	EMF_IV_d_4	8.6
EMF_I_e_1	8.7	EMF_II_e_1	8.4	EMF_III_e_1	8.5	EMF_IV_e_1	8.6
EMF_I_e_2	8.5	EMF_II_e_2	8.7	EMF_III_e_2	8.5	EMF_IV_e_2	8.4
EMF_I_e_3	8.7	EMF_II_e_3	8.5	EMF_III_e_3	8.6	EMF_IV_e_3	8.3
EMF_I_e_4	8.5	EMF_II_e_4	8.6	EMF_III_e_4	8.3	EMF_IV_e_4	8.3

### 3.2.5.2. Sequenzierung mittels Illumina-Technologie

Die RNA-Proben wurden bei der Novogene GmbH mittels Illumina-Technologie sequenziert. Die Illumina-Sequenzierung ist eine sogenannte *Next-Generation* Sequenzier-Methode, bei der hochgradig parallel sequenziert werden kann. Das bedeutet, dass im Vergleich zu älteren Sequenzierverfahren, mehrere Proben gleichzeitig sequenziert werden können. Dazu werden DNA-Fragmente, an die ein Adapter ligiert wurde, auf eine sogenannte *Flow Cell* hybridisiert. Eine *Flow Cell* besteht typischerweise aus mehreren Kanälen oder auch *lanes*. Pro *Flow Cell* kann also entweder eine Probe pro *lane* sequenziert werden, oder es können auch mehrere Proben auf einer *lane* sequenziert werden, was als *multiplexing* bezeichnet wird. Falls mehrere Proben pro *lane* sequenziert werden, werden die einzelnen Proben durch individuelle Barcodes markiert, um die resultierenden Sequenzierdaten den entsprechenden Proben zuordnen zu können. Vor der Sequenzierung werden die einzelnen DNA-Fragmente direkt auf der *Flow Cell* weiter amplifiziert, durch einen Prozess, der sich *Clustering* nennt. Die amplifizierten DNA-Fragmente, werden dann direkt auf der *Flow Cell* mittels Sequenzierung-durch-Synthese sequenziert. Dazu werden die 4 unterschiedlichen DNA-Basen, als Didesoxyribonukleosid-Triphosphate (ddNTPs) und mit unterschiedlichen fluoreszierenden Farbstoffen markiert, verwendet. ddNTPs sorgen dafür, dass die DNA-Synthese nach der Inkorporation jedes einzelnen Nukleotids abbricht. Somit kann nach jedem Nukleotideinbau das Fluoreszenzsignal ausgelesen werden, sodass anhand des Farbsignals die Zuordnung zu den einzelnen Basen und somit der Basenablauf eines DNA-Fragments bestimmt werden kann. Nach dem Auslesen des Farbsignals werden die gebundenen ddNTPs in normale dNTPs umgewandelt, sodass die Verlängerung des DNA-Fragments weitergeführt werden kann. Für eine genaue Beschreibung der Illumina-

Sequenzierung sei auf die ausführliche Beschreibung auf der Illumina-Webseite verwiesen ([Link zur Illumina-Webseite](#)).

Für die Sequenzierung der RNA-Proben (Tabelle 3.3) aus Tomate wurde ein Illumina Sequenziergerät der Novaseq X Serie verwendet. Die Proben wurden *gemultiplexed*, was bedeutet, dass mehrere Proben auf einer *Flow Cell lane* sequenziert wurden.

#### 3.2.5.3. Bioinformatische Auswertung

Von der Firma Novogene wurden die Sequenzierdaten als fastq-Dateien zur Verfügung gestellt. Für nähere Informationen zum fastq Dateiformat sei auf (Cock et al., 2009) verwiesen. Für jede Probe wurden ca. 9 Gb an Daten generiert, was im Durchschnitt pro Probe 71 000 000 *raw reads* bedeutet (Tabelle 3.4). Die in Tabelle 3.4 angegebenen Q-Werte geben die Qualität der einzelnen Basen an. Ein Q-Wert von 20 für eine Base bedeutet eine Wahrscheinlichkeit von 1 in 100, dass die Base falsch zugeordnet wurde, also eine 99% Wahrscheinlichkeit, dass diese Base richtig zugeordnet wurde. Analog beschreibt ein Q-Wert von 30 eine Wahrscheinlichkeit von 1 in 1000, dass die Base falsch ist, also eine 99,9% Wahrscheinlichkeit, dass sie richtig ist. Die angegebenen Prozentangaben zeigen für alle Proben im Durchschnitt einen Q20-Wert von 98%, was heißt, dass pro Sample 98% der Basen zu 99% korrekt sequenziert wurden. Pro Sample zeigen 95% der Basen einen Q30-Wert, was bedeutet, dass 95% der Basen zu 99,9% korrekt sind. Somit wurde jede Probe mit einer sehr hohen Genauigkeit sequenziert, was eine hohe Verlässlichkeit der Sequenzierdaten bedeutet.

**Tabelle 3.4:** Qualitätskontrolle der erhaltenen Sequenzierdaten. *Effective* (%) beschreibt die Prozentzahl der sauberen *reads* (*reads* ohne Adapter und *reads* ohne geringe Q-Werte). Q20 und Q30 sind Qualitätsangaben über die Genauigkeit, dass eine Base richtig zugeordnet wurde. Ein Q-Wert von 20 für eine Base bedeutet eine Wahrscheinlichkeit von 1 in 100, dass die Base falsch zugeordnet wurde, also eine 99% Wahrscheinlichkeit, dass diese Base richtig zugeordnet wurde. Analog beschreibt ein Q-Wert von 30 eine Wahrscheinlichkeit von 1 in 1000, dass die Base falsch ist, also eine 99,9% Wahrscheinlichkeit, dass sie richtig ist. GC-Gehalt gibt die Prozentzahl der Guanin- und Cytosinbasen (GC) an.

Probe	Anzahl raw reads	Rohdaten	Effective (%)	Fehler (%)	Q20 (%)	Q30 (%)	GC-Gehalt (%)
EMF_I_a_1	43693810	6554071500	96.16	0.01	98.48	95.8	43.55
EMF_I_a_2	36494490	5474173500	98.82	0.01	98.48	95.68	43.24
EMF_I_a_3	54030134	8104520100	98.57	0.01	98.36	95.44	43.26
EMF_I_a_4	40842966	6126444900	96.37	0.01	98.36	95.49	43.76
EMF_I_b_1	58171820	8725773000	98.42	0.01	98.6	95.99	43.06
EMF_I_b_2	29719144	4457871600	97.59	0.01	98.79	96.41	43.59
EMF_I_b_3	53959608	8093941200	97.31	0.01	98.36	95.45	43.56
EMF_I_b_4	95440288	1.4316E+10	98.54	0.01	98.77	96.28	43.15
EMF_I_c_1	68631894	1.0295E+10	97.53	0.01	98.35	95.05	43.38
EMF_I_c_2	63565090	9534763500	97.73	0.01	98.81	96.35	43.35
EMF_I_c_3	93778322	1.4067E+10	97.85	0.01	98.63	96.02	43.46
EMF_I_c_4	55972962	8395944300	96.54	0.01	98.25	94.81	43.45
EMF_I_d_1	69111208	1.0367E+10	96.52	0.01	98.26	94.9	43.45
EMF_I_d_2	62026444	9303966600	96.5	0.01	98.15	94.54	43.51
EMF_I_d_3	63227158	9484073700	96.03	0.01	98.12	94.51	43.58
EMF_I_d_4	71128626	1.0669E+10	97.54	0.01	98.22	94.74	43.51
EMF_II_a_1	59284082	8892612300	97.43	0.01	98.34	95.04	43.53
EMF_II_a_2	104305650	1.5646E+10	97.37	0.01	98.77	96.35	43.39
EMF_II_a_3	67681522	1.0152E+10	96.32	0.01	98.26	94.86	43.44
EMF_II_a_4	59947620	8992143000	96.28	0.01	98.26	94.8	43.7
EMF_II_b_1	67960458	1.0194E+10	97.07	0.01	98.23	94.78	43.38
EMF_II_b_2	57769812	8665471800	97.24	0.01	98.22	94.75	43.37
EMF_II_b_3	64321264	9648189600	96.75	0.01	98.2	94.65	43.33
EMF_II_b_4	64490270	9673540500	97.05	0.01	98.2	94.63	43.45
EMF_II_c_1	65316396	9797459400	97.1	0.01	98.3	94.94	43.51
EMF_II_c_2	65125330	9768799500	97.09	0.01	98.23	94.83	43.45
EMF_II_c_3	56827142	8524071300	97.63	0.01	98.15	94.54	43.16
EMF_II_c_4	82069946	1.231E+10	97.4	0.01	98.24	94.78	43.56
EMF_II_d_1	72375772	1.0856E+10	96.28	0.01	98.4	95.2	43.32
EMF_II_d_2	71717320	1.0758E+10	97.22	0.01	98.16	94.57	43.25
EMF_II_d_3	62935466	9440319900	97.67	0.01	98.31	94.98	43.04
EMF_II_d_4	64583736	9687560400	97.78	0.01	98.27	94.86	43.11
EMF_III_a_1	62156818	9323522700	97.28	0.01	98.36	95.13	43.08
EMF_III_a_2	65525048	9828757200	96.9	0.01	98.13	94.51	43.2
EMF_III_a_3	61274166	9191124900	97.42	0.01	98.14	94.51	43.26
EMF_III_a_4	62238422	9335763300	97.29	0.01	98.21	94.77	43.01

Probe	Anzahl raw reads	Rohdaten	Effective (%)	Fehler (%)	Q20 (%)	Q30 (%)	GC-Gehalt (%)
EMF_III_b_1	61174268	9176140200	97.2	0.01	98.11	94.48	43.07
EMF_III_b_2	59828198	8974229700	97.43	0.01	98.1	94.44	42.97
EMF_III_b_3	59204060	8880609000	98.09	0.01	98.22	94.73	42.94
EMF_III_b_4	73591788	1.1039E+10	97.4	0.01	98.26	94.86	43.35
EMF_III_c_1	67732100	1.016E+10	96.81	0.01	98.27	94.91	43.34
EMF_III_c_2	70520324	1.0578E+10	97.46	0.01	98.28	94.95	43.34
EMF_III_c_3	78970582	1.1846E+10	96.64	0.01	98.37	95.26	42.86
EMF_III_c_4	72663076	1.0899E+10	96.86	0.01	98.31	95.1	43.39
EMF_III_d_1	86592240	1.2989E+10	97.14	0.01	98.34	95.2	42.46
EMF_III_d_2	85497620	1.2825E+10	97.79	0.01	98.35	95.17	43.45
EMF_III_d_3	93698382	1.4055E+10	96.06	0.01	98.36	95.22	43.22
EMF_III_d_4	61719076	9257861400	97.77	0.01	98.28	95.06	42.99
EMF_IV_a_1	69923824	1.0489E+10	97.33	0.01	98.35	95.19	43.13
EMF_IV_a_2	68998386	1.035E+10	97.32	0.01	98.3	95.06	43.27
EMF_IV_a_3	84565508	1.2685E+10	96.63	0.01	98.32	95.12	42.83
EMF_IV_a_4	136434340	2.0465E+10	98.26	0.01	98.66	96.12	42.82
EMF_IV_b_1	69048736	1.0357E+10	96.36	0.01	98.26	94.96	42.97
EMF_IV_b_2	73225060	1.0984E+10	96.89	0.01	98.36	95.23	42.96
EMF_IV_b_3	74063544	1.111E+10	96.68	0.01	98.29	95.14	43.03
EMF_IV_b_4	93181026	1.3977E+10	97.59	0.01	98.63	96.07	42.66
EMF_IV_c_1	77233934	1.1585E+10	97.22	0.01	98.38	95.27	43.08
EMF_IV_c_2	74999276	1.125E+10	97.8	0.01	98.36	95.25	43
EMF_IV_c_3	79347740	1.1902E+10	97.99	0.01	98.35	95.19	42.89
EMF_IV_c_4	90223726	1.3534E+10	96.98	0.01	98.29	95.04	42.85
EMF_IV_d_1	74852734	1.1228E+10	97.43	0.01	98.31	95.08	43.37
EMF_IV_d_2	85199696	1.278E+10	98.15	0.01	98.26	95.04	42.55
EMF_IV_d_3	76023468	1.1404E+10	97.49	0.01	98.29	95.05	43.08
EMF_IV_d_4	82862236	1.2429E+10	96.26	0.01	98.34	95.19	42.86
EMF_I_e_1	74291232	1.1144E+10	96.6	0.01	98.37	94.93	43.59
EMF_I_e_2	73977210	1.1097E+10	96.79	0.01	98.23	94.47	43.51
EMF_I_e_3	76313490	1.1447E+10	95.78	0.01	98.41	95.08	43.59
EMF_I_e_4	76961906	1.1544E+10	96.42	0.01	98.37	94.91	43.36
EMF_II_e_1	78212074	1.1732E+10	97.06	0.01	98.45	95.14	43.66
EMF_II_e_2	86841180	1.3026E+10	96.58	0.01	98.37	94.9	43.55
EMF_II_e_3	74314602	1.1147E+10	95.59	0.01	98.43	95.13	43.92
EMF_II_e_4	76290902	1.1444E+10	96.3	0.01	98.37	94.9	43.96
EMF_III_e_1	73396704	1.101E+10	96.51	0.01	98.46	95.17	43.8
EMF_III_e_2	73382632	1.1007E+10	95.75	0.01	98.34	94.85	43.59
EMF_III_e_3	66148548	9922282200	95.54	0.01	98.4	95.03	43.69
EMF_III_e_4	74874772	1.1231E+10	95.8	0.01	98.26	94.58	43.21
EMF_IV_e_1	82830094	1.2425E+10	96.06	0.01	98.4	95.05	43.12

Probe	Anzahl raw reads	Rohdaten	Effective (%)	Fehler (%)	Q20 (%)	Q30 (%)	GC-Gehalt (%)
EMF_IV_e_2	73088334	1.0963E+10	93.29	0.01	98.26	94.7	43.87
EMF_IV_e_3	75437928	1.1316E+10	93.57	0.01	98.56	95.48	43.72
EMF_IV_e_4	77802032	1.167E+10	97.08	0.01	98.42	94.97	42.81
R_IV_a_1	78031554	1.1705E+10	97.51	0.01	97.83	93.69	38.01
R_IV_a_2	70919342	1.0638E+10	96.79	0.01	97.95	94.05	36.99
R_IV_a_3	71144624	1.0672E+10	97.56	0.01	97.91	93.89	41.73
R_IV_a_4	57785862	8667879300	98.46	0.01	97.9	93.77	40.72
R_IV_b_1	56919802	8537970300	97.27	0.01	97.77	93.49	40.74
R_IV_b_2	94153222	1.4123E+10	97.77	0.01	97.84	93.64	40.59
R_IV_b_3	38453802	5768070300	98.68	0.01	97.81	93.51	41.04
R_IV_b_4	59033890	8855083500	98.74	0.01	98.02	94.13	40.58
R_IV_c_1	58483416	8772512400	97.92	0.01	97.87	93.69	41.67
R_IV_c_2	58870342	8830551300	97.47	0.01	97.96	94	41.11
R_IV_c_3	64490382	9673557300	97.37	0.01	98.07	94.3	40.93
R_IV_c_4	126098984	1.8915E+10	98.33	0.01	97.97	94	40.18
R_IV_d_1	69523618	1.0429E+10	97.55	0.01	97.96	94	38.85
R_IV_d_2	62621218	9393182700	97.64	0.01	98.38	94.92	43.34
R_IV_d_3	62969094	9445364100	96.32	0.01	97.78	93.64	36.68
R_IV_d_4	63936722	9590508300	95.45	0.01	97.66	93.38	36.23
R_IV_e_1	65540666	9831099900	95.05	0.01	98.29	94.86	37.88
R_IV_e_2	77604620	1.1641E+10	96.98	0.01	97.84	93.85	36.97
R_IV_e_3	60664538	9099680700	97.11	0.01	97.83	93.73	36.82
R_IV_e_4	75787276	1.1368E+10	97.17	0.01	98.02	94.28	37.11

### 3.2.5.3.1. Mapping auf das Tomaten-Genom

Die erhaltenen Sequenzierdaten wurden anschließend auf dem Server der Uni Bonn (Marvin) entpackt und auf das Tomatengenom (Sweet-100) *gemapped*. Falls ein sequenziertes Genom zur Verfügung steht ist ein *Mapping* auf das Genom einem *Mapping* auf das Transkriptom vorzuziehen, da dabei unterschiedliche *Splice*-Varianten (das heißt unterschiedliche Transkripte desselben Gens) berücksichtigt werden können. Für die Tomatensorte Sweet-100 ist das Genom vollständig sequenziert (Alonge et al., 2022) und über folgenden Link zugänglich: [Link zur Sweet-100 Genomsequenz](#).

Für das *Mapping* wurde die RNA-Alignment Software STAR (Version 2.7.11b-GCC-12.3.0) verwendet (Dobin et al., 2013). Dazu wurde zunächst ein Genomindex erstellt. Dieser ermöglicht es der *Alignment-Software* bestimmte Abrufoperationen deutlich schneller durchzuführen, indem ein Suffix-Array erstellt wird, also eine Tabelle, in der

die Suffixe einer Zeichenkette in lexikographischer Reihenfolge angegeben werden. Der Genomindex wurde durch Aufrufen der Software STAR mit der Option `-runMode genomeGenerate` erstellt. Es wurden zunächst die *Default*-Einstellungen verwendet, außer für die Option `--genomeSAindexNbases`, der von 14 auf 13 aufgrund der relativ kleinen Genomgröße gesetzt wurde. Der optimale Wert für diese Option wird von STAR direkt ermittelt und gibt die k-mer Größe des Index an, also die Länge der Suffixe der Zeichenketten im Suffix-Array. Für die Generierung des Tomatengenomindex wurde folgender Code verwendet:

STAR

```
--runThreadN 8  
  
--runMode genomeGenerate  
  
--genomeDir ${GenomeDir}  
  
--sjdbOverhang 100  
  
--genomeSAindexNbases 13  
  
--sjdbGTFfile ${GTF1}  
  
--genomeFastaFiles ${FASTA3}
```

Für detaillierte Informationen zur Erstellung des Genomindex mit STAR, inklusive Beschreibung aller Optionen und Parameter, sei auf die Originalpublikation (Dobin et al., 2013) und das STAR-Manual verwiesen ([Link zum STAR-Manual](#)).

Im Anschluss wurden die jeweiligen *reads* der einzelnen Proben mit Hilfe des Genomindex auf das Sweet-100 Tomatengenom *gemapped*. Gleichzeitig wurden die *reads* auf Genebene gezählt. Auch dazu wurde STAR verwendet, diesmal mit der Option `--quantMode GeneCounts`. Auch hier wurden zunächst die *Default*-Einstellungen verwendet. Der verwendete Software-Code für die RNA Probe EMF\_I\_a\_2 war:

STAR

--runThreadN 8

--genomeDir Tomate\_EMF\_AP3/GenomIndex\_SAindex

--sjdbGTFfile \${GTF1}

--sjdbGTFtagExonParentTranscript Parent

--outSAMtype BAM SortedByCoordinate

--quantMode GeneCounts

--outFileNamePrefix EMF\_I\_a\_2\_

--readFilesIn

EMF\_I\_a\_2\_MKRN240001947-1A\_227WC7LT4\_L7\_1.fq

EMF\_I\_a\_2\_MKRN240001947-1A\_227WC7LT4\_L7\_2.fq

Im Schnitt konnten so 85% der erhaltenen *reads* eindeutig auf das Sweet-100 Tomatengenom *gemapped* werden (Tabelle 3.5).

**Tabelle 3.5:** Zusammenfassung der *Mapping*-Ergebnisse der einzelnen RNA-Sequenzierproben.

Probenname	Prozent eindeutig <i>gemappter reads</i>	Prozent <i>reads</i> , die an mehrere Stellen <i>gemapped</i> wurden	Prozent <i>reads</i> , die nicht <i>gemapped</i> wurden (zu kurz)
EMF_I_a_1	81.5	2.32	16.01
EMF_I_a_2	83.37	2.64	13.68
EMF_I_a_3	83.46	2.45	13.85
EMF_I_a_4	83.34	2.32	14.23
EMF_I_b_1	86.29	2.4	11.21
EMF_I_b_2	82.64	2.46	14.73
EMF_I_b_3	92.72	2.76	4.24
EMF_I_b_4	83.17	2.45	14.28
EMF_I_c_1	79.81	2.35	17.64
EMF_I_c_2	82.02	2.27	15.61
EMF_I_c_3	82.61	2.38	14.83
EMF_I_c_4	79.33	2.26	18.2
EMF_I_d_1	81.5	2.44	15.68
EMF_I_d_2	79.45	2.37	17.95
EMF_I_d_3	79.88	2.24	17.71
EMF_I_d_4	83.93	2.51	13.39
EMF_I_e_1	92.91	2.68	4.33

<b>Probenname</b>	<b>Prozent eindeutig gemappter reads</b>	<b>Prozent reads, die an mehrere Stellen gemapped wurden</b>	<b>Prozent reads, die nicht gemapped wurden (zu kurz)</b>
EMF_I_e_2	93.15	2.84	3.92
EMF_I_e_3	92.24	2.8	4.88
EMF_I_e_4	93.76	2.53	3.63
EMF_II_a_1	86.04	2.52	11.27
EMF_II_a_2	81.39	2.25	16.22
EMF_II_a_3	81.63	2.27	15.95
EMF_II_a_4	81.34	2.48	15.97
EMF_II_b_1	82.74	2.32	14.74
EMF_II_b_2	81.2	2.30	16.4
EMF_II_b_3	80.58	2.43	16.7
EMF_II_b_4	81.54	2.36	15.94
EMF_II_c_1	84.52	2.59	12.68
EMF_II_c_2	80.63	2.37	16.82
EMF_II_c_3	83.31	2.44	14.1
EMF_II_c_4	84.45	2.5	12.92
EMF_II_d_1	81.68	2.19	16.01
EMF_II_d_2	79.33	2.46	17.92
EMF_II_d_3	80.69	2.33	16.66
EMF_II_d_4	80.08	2.65	16.75
EMF_II_e_1	93.6	2.96	3.34
EMF_II_e_2	92.56	2.67	4.67
EMF_II_e_3	93.18	2.8	3.94
EMF_II_e_4	93.81	2.82	3.28
EMF_III_a_1	77.92	2.34	19.51
EMF_III_a_2	78.13	2.07	19.65
EMF_III_a_3	79.1	2.37	18.34
EMF_III_a_4	77.84	1.96	20.03
EMF_III_b_1	82.83	2.37	14.46
EMF_III_b_2	82.78	2.33	14.65
EMF_III_b_3	87.79	2.34	9.63
EMF_III_b_4	87.84	2.28	9.69
EMF_III_c_1	82.79	2.47	14.58
EMF_III_c_2	84.15	2.48	13.09
EMF_III_c_3	83.24	1.84	14.72
EMF_III_c_4	82.77	2.35	14.75
EMF_III_d_1	85.52	1.8	12.43
EMF_III_d_2	88.37	2.69	8.84
EMF_III_d_3	82.8	2.2	14.91
EMF_III_d_4	81.78	2.15	15.81
EMF_III_e_1	92.74	2.68	4.49

<b>Probenname</b>	<b>Prozent eindeutig gemappter reads</b>	<b>Prozent reads, die an mehrere Stellen gemapped wurden</b>	<b>Prozent reads, die nicht gemapped wurden (zu kurz)</b>
EMF_III_e_2	92.4	2.8	4.69
EMF_III_e_3	92.58	2.67	4.68
EMF_III_e_4	93.4	2.52	3.97
EMF_IV_a_1	81.35	2.06	16.49
EMF_IV_a_2	81.88	2.04	15.9
EMF_IV_a_3	81.76	1.61	16.48
EMF_IV_a_4	82.57	1.66	15.59
EMF_IV_b_1	78.76	1.49	19.59
EMF_IV_b_2	82.66	1.79	15.38
EMF_IV_b_3	78.48	1.64	19.7
EMF_IV_b_4	77.42	1.49	20.95
EMF_IV_c_1	78.71	1.69	19.52
EMF_IV_c_2	88.1	2.09	9.43
EMF_IV_c_3	78.99	1.98	18.7
EMF_IV_c_4	80.56	1.75	17.53
EMF_IV_d_1	80.7	2	17.13
EMF_IV_d_2	91.94	1.71	6.25
EMF_IV_d_3	89.21	1.84	8.71
EMF_IV_d_4	86.83	1.58	11.47
EMF_IV_e_1	93.71	1.84	4.38
EMF_IV_e_2	88.34	2.63	8.34
EMF_IV_e_3	91.43	2.19	6.22
EMF_IV_e_4	94.81	1.72	3.38
R_IV_a_1	91.28	1.16	7.55
R_IV_a_2	89.18	1.31	9.49
R_IV_a_3	87.48	1.36	11.12
R_IV_a_4	89.26	1.13	9.59
R_IV_b_1	89.26	1.09	9.64
R_IV_b_2	89.77	1.09	9.13
R_IV_b_3	88.77	1.26	9.94
R_IV_b_4	89.65	1.18	9.15
R_IV_c_1	90.2	1.22	8.55
R_IV_c_2	91.84	1.15	6.99
R_IV_c_3	91.86	1.16	6.94
R_IV_c_4	91.53	1.19	7.26
R_IV_d_1	90.43	1.17	8.38
R_IV_d_2	92.29	2.43	5.06
R_IV_d_3	87.33	1.37	11.28
R_IV_d_4	86.37	1.25	12.37
R_IV_e_1	87.87	1.16	10.95

Probenname	Prozent eindeutig <i>gemappter reads</i>	Prozent <i>reads</i> , die an mehrere Stellen <i>gemapped</i> wurden	Prozent <i>reads</i> , die nicht <i>gemapped</i> wurden (zu kurz)
R_IV_e_2	87.27	1.37	11.34
R_IV_e_3	88.08	1.19	10.71
R_IV_e_4	89.98	1.19	8.82

Diese *Mapping*-Raten sind als sehr gut anzusehen (Dobin et al., 2013). Es fällt auf, dass die *Mapping*-Raten der einzelnen Proben teilweise sehr unterschiedlich sind (von mindestens 77,42% bis maximal 94,81%) und dass es prinzipiell bei den schlechteren *Mapping*-Raten zu einem Anstieg der *reads* kommt, die gar nicht *gemapped* werden konnten, und nicht zu einem Anstieg an *reads*, die nicht eindeutig *gemapped* werden konnten.

Deswegen wurden die *reads* einzelner Proben erneut *gemapped* mit Anpassungen spezifischer Parameter. Da die *Default*-Parameter auf das menschliche Genom angepasst sind und es hier Unterschiede zum Tomatengenom bspw. in Intronlängen gibt, könnten die *Default*-Parameter ein korrektes *Mapping* bspw. einzelner Transkripte verhindern. Zudem werden per *Default reads* nur *gemapped*, wenn mindestens 2/3 der *read*-Länge (in unserem Fall 100 Basen) *gemapped* werden können. Anpassungen der Intronlängen mit den Optionen `--alignIntronMin` und `--alignIntronMax` auf die Werte typischer Tomatenintronlängen zwischen 5 und 350000 bp (Clark et al., 2019), sowie eine Verkürzung der *read*-Länge, die mindestens *gemapped* werden muss, auf 1/3 mit der Option `--outFilterMatchNminOverLread`, führten zu keinen Verbesserungen der *Mapping*-Raten. Deswegen wurde mit dem ursprünglichen *Mapping* (*Default*-Parameter) weitergearbeitet.

Auch hier sei für detaillierte Informationen zu den einzelnen *Mapping*-Parametern mit STAR auf die Originalpublikation (Dobin et al., 2013) und das STAR-Manual verwiesen ([Link zum STAR-Manual](#)).

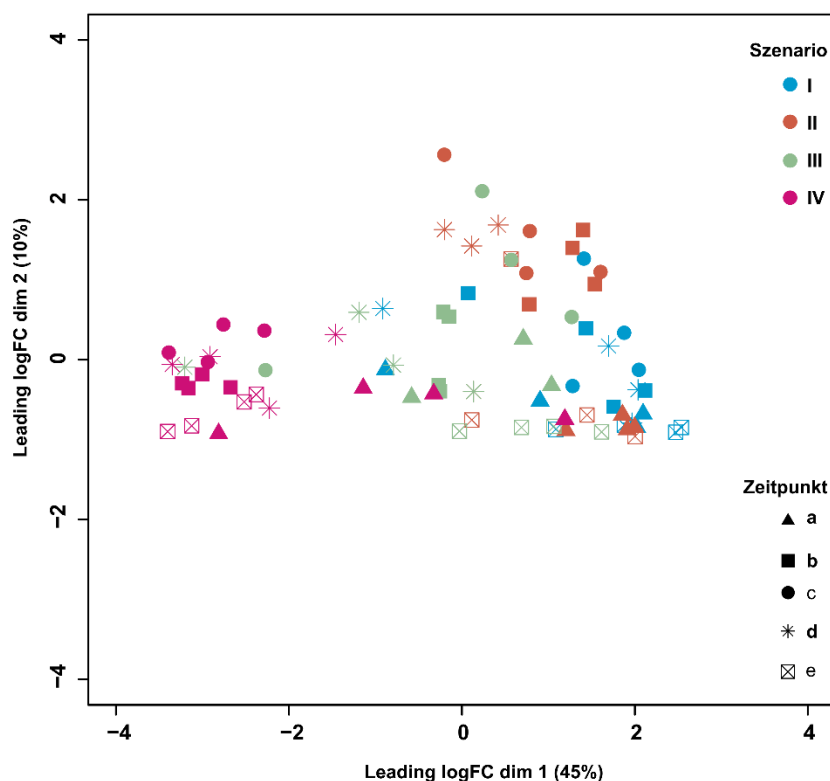
### 3.2.5.3.2. Differenzielle Genexpressionsanalyse und Wiederholung Tag IV

Für die Analyse der differenziell exprimierten Gene (DEG) wurden die zuvor ermittelten *Gen-Counts* (auf Genebene quantifizierte *reads*) verwendet. Die Auswertung der Daten, sowie die Berechnung der DEGs erfolgte in RStudio unter Verwendung der Pakete *edgeR* (Robinson et al., 2009) und *limma* (Ritchie et al., 2015). Zunächst wurde die Bibliotheksgröße der einzelnen Proben mittels der

colSums()-Funktion aus dem R Base Packet ermittelt (R Core Team, 2021). Diese gibt einen Aufschluss über die Anzahl der zugeordneten Gene und lässt Rückschlüsse auf die Vergleichbarkeit der Proben und die Qualität der Daten zu. Ferner dient die Bibliotheksgröße als Kennzahl für die späteren Normalisierungsverfahren.

Zur genaueren Bewertung der Datenqualität wurden die Proben in einem multidimensionalen Skalierungsplot (MDS-Plot) mit der plotMDS()-Funktion aus dem Bioconductor-Paket limma in R (R Version 3.4.0, limma\_3.32.2) visualisiert. Die räumliche Anordnung zwischen gepaarten Proben, dargestellt als *leading log2-fold change*, liefert eine zweidimensionale Darstellung der Probenbeziehungen. Der *leading log2-fold change* ist hier definiert als geschätzte quadratische Abweichung der 500 Gene mit der größten Standardabweichung zwischen allen Proben.

Der normalisierte MDS-Plot für die RNA-Sequenzierungen der Versuchstage vom 22.4.24 – 26.4.24 (Szenario I, II, III, und IV) ist in Abbildung 3.2 dargestellt.

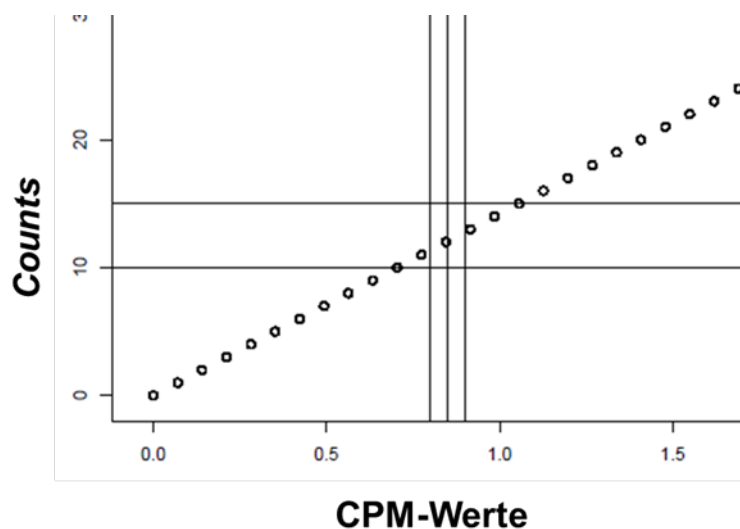


**Abbildung 3.2:** Normalisierter multidimensionaler Skalierungsplot der RNA-Sequenzierdaten vom 22.4.24 - 26.4.24 (Szenario I, II, III, und IV).

Aus Abbildung 3.2 wird ersichtlich, dass sich die Daten aus Szenario IV (26.4.24) von denen der übrigen Szenarien (I, II, und III) „räumlich“ abheben (siehe Trennung auf

der X-Achse). Das lässt den Rückschluss zu, dass sich die Genexpressionen von diesem Tag deutlich von den anderen unterscheiden. Dies trifft auch auf die unexponierten Proben (Zeitpunkt e) zu. Das bedeutet, dass sich das Transkriptom der Pflanzen von Szenario IV bereits **vor** Exposition deutlich von dem der Pflanzen an den anderen Tagen unterscheidet, und lässt sich mit entwicklungsbiologischen Unterschieden der Tomatenpflanzen an den unterschiedlichen Tagen erklären. Diese Unterschiede werden an den Zahlen der differenziell exprimierten Gene ersichtlicher (Tabelle 3.6). Differenziell exprimierte Gene wurden, wie folgt, ermittelt:

Da für die Analyse nur Gene betrachtet werden sollten, die aktiv waren, wurde der Datensatz über die *counts per million* (CPM) gefiltert. Dabei werden die Gen-Zahlen (*counts*) in Relation zur Bibliotheksgröße betrachtet und es wird ein Schwellenwert bestimmt, der zu gering exprimierte Gene ausschließt. Hierbei wird versucht den CPM-Grenzwert zu finden, bei dem die zugehörigen *counts*-Werte zwischen 10 und 15 liegen. Gene deren *counts* unterhalb 10-15 liegen, sind oft nicht ausreichend exprimiert oder sehr variabel und haben daher wenig biologische Bedeutung. Durch eine graphische Darstellung der CPM-Werte gegenüber der *counts* konnte als Schwellenwert 0,85 bestimmt werden und wurde im Weiteren verwendet (Abb. 3.3).



**Abbildung 3.3:** Graphische Darstellung der Korrelation zwischen CPM-Werten und Gen-Counts.

Gene, deren CPM-Werte in mindestens vier der 80 Proben über diesem Wert lagen, wurden für die fortlaufende Analyse behalten. Das bedeutet, dass jedes Gen, das im Datensatz verbleibt mindestens 0,85 *reads* pro Million in mindestens vier Proben hat.

Da dieser Ansatz *unsupervised* ist wurde die Anzahl der biologischen Replikate ( $n = 4$ ) als Grenzwert gesetzt.

Das experimentelle Design umfasste zwei Faktoren: vier Bedingungen (I bis IV) und fünf Zeitpunkte (a bis e), mit jeweils vier biologischen Replikaten pro Bedingung und Zeitpunkt. Die gesamte Analyse wurde verblindet durchgeführt und alle Szenarien wurden untereinander verglichen. Demnach konnte kein Referenzwert gewählt werden, da bei der Auswertung die Kontrollgruppe weiterhin verblindet war. Wie im *Manual* des R-Pakets *limma* empfohlen, wurden deswegen zur Vereinfachung die Faktoren (Bedingung und Zeitpunkt) als ein gemeinsamer Faktor zusammengefasst und basierend auf diesem Faktor ein lineares Modell erstellt. Die Vereinfachung liegt in der Erstellung der Kontrastmatrix und der späteren Interpretation. Jede hierbei entstehende Kombination (also beispielsweise Szenario I zum Zeitpunkt a verglichen mit Szenario II zum Zeitpunkt a) ist so direkt einem Koeffizienten im Modell zuzuordnen. Außerdem können Interaktionsterme umgangen werden, da jede Kombination bereits als einzelne Gruppe betrachtet wird.

Anschließend wurden die Daten mittels der TMM-Methode (*Trimmed Mean of M-values*) über ihre Sequenziertiefe normalisiert und  $\log_2$ -transformiert. Eine weitere Normalisierung erfolgte mittels der *voom()*-Funktion des *limma* Pakets. Hierbei wird die Beziehung zwischen Mittelwert und Varianz geschätzt und verwendet, um jeder Beobachtung Präzisionsgewichte zuzuweisen, um die Varianzheterogenität zu korrigieren.

Zur Bestimmung von differenziell exprimierten Genen wurde im Anschluss ein lineares Modell (wie oben angegeben mit einem Faktor = alle Kombinationen aus Szenario und Zeitpunkt) für die normalisierten Daten angepasst. Ein Bayes-Ansatz wurde gewählt um die Variabilität über alle Gene hinweg zu schätzen und die Varianzen auf einen gemeinsamen Wert zu reduzieren. Dies wurde mit der Funktion *eBayes()* aus dem *limma* Paket realisiert. So werden eventuelle Verzerrungen durch hohe Variabilität oder kleine Bibliotheksgrößen reduziert. Mittels der Funktion *contrasts.fit()* wurden paarweise Vergleiche berechnet. Zur Korrektur der berechneten  $p$ -Werte durch die Mehrfachtestproblematik (*adjust.method = „fdr“*, was eine Korrektur nach Benjamini & Hochberg beinhaltet) wurde die *False Discovery Rate* (FDR) auf  $\leq 5\%$  angepasst.

Der Auftragsbeschreibung folgend wurden paarweise Vergleiche zwischen allen Bedingungen (I bis IV) innerhalb eines Zeitpunktes (a bis e) durchgeführt. Gene wurden dann als signifikant differenziell exprimiert bezeichnet, wenn der *log2-fold change* größer gleich  $\pm 1$  war und der FDR-Wert unter 0,05 lag. Ein *log2-fold change* von  $\pm 1$  bedeutet biologisch, dass sich die Genexpression im Vergleich zur Referenzexpression verdoppelt (+ 1) beziehungsweise halbiert (- 1) hat. Solche Veränderungen sind biologisch betrachtet signifikante Änderungen. Um zu verhindern, dass schwach exprimierte Genmodelle identifiziert werden, bei denen eine Verdoppelung der Expression biologisch wohl nicht signifikant ist (beispielsweise bei *counts* von 1 auf 2, was ja auch einer Verdopplung entspricht) wurde vorab über CPM gefiltert. Gerade bei Transkriptionsfaktoren, die maßgeblich die Expression anderer Gene beeinflussen, hat eine Verdopplung der Expression einen signifikanten biologischen Einfluss.

Die Zahlen der ermittelten differenziell exprimierten Gene zwischen allen Szenarien vom 22.4. – 26.4.24 sind in Tabelle 3.6 dargestellt.

**Tabelle 3.6:** Anzahl differenziell exprimierter Gene innerhalb der einzelnen Zeitpunkte verglichen zwischen den unterschiedlichen Versuchsszenarien (I – IV, siehe auch Tabelle 3.1). vs = versus, verglichen mit.

Zeitpunkt	Vergleich von Bedingungen	Anzahl hoch regulierter Gene	Anzahl herunter regulierter Gene	Anzahl differenziell exprimierter Gene gesamt	Anzahl nicht regulierter Gene
a	I vs II	0	0	0	20738
a	I vs III	1	0	1	20737
a	I vs IV	699	674	1373	19365
a	II vs III	0	0	0	20738
a	II vs IV	515	1058	1573	19165
a	III vs IV	90	27	117	20621
b	I vs II	0	0	0	20738
b	I vs III	141	178	319	20419
b	I vs IV	1066	3597	4663	16075
b	II vs III	24	120	144	20594
b	II vs IV	971	3586	4557	16181
b	III vs IV	467	1748	2215	18523
c	I vs II	1	1	2	20736
c	I vs III	112	173	285	20453
c	I vs IV	1278	3916	5194	15544
c	II vs III	1	0	1	20737
c	II vs IV	854	2754	3608	17130

Zeitpunkt	Vergleich von Bedingungen	Anzahl hoch regulierter Gene	Anzahl herunter regulierter Gene	Anzahl differenziell exprimierter Gene gesamt	Anzahl nicht regulierter Gene
c	III vs IV	359	1696	2055	18683
d	I vs II	42	129	171	20567
d	I vs III	634	1123	1757	18981
d	I vs IV	1346	3596	4942	15796
d	II vs III	0	0	0	20738
d	II vs IV	895	2300	3195	17543
d	III vs IV	392	801	1193	19545
e	I vs II	1	0	1	20737
e	I vs III	1	0	1	20737
e	I vs IV	1236	3556	4792	15946
e	II vs III	0	0	0	20738
e	II vs IV	751	3128	3879	16859
e	III vs IV	634	2438	3072	17666

Wie in Tabelle 3.6 gezeigt wird, kommt es zu den meisten differenziell exprimierten Genen bei den Vergleichen mit Szenario IV, unabhängig davon mit welchem anderen Szenario verglichen wird. Dies trifft allerdings auch auf die Vergleiche des Zeitpunktes e zu, also den Proben vor Exposition (unexponierte Kontrolle). Somit kommt es bereits vor Exposition zu großen Unterschieden in den Genexpressionen zwischen den Pflanzen aus Szenario IV und den Pflanzen der anderen Szenarien. Dies lässt sich am ehesten mit Unterschieden in der Tomatenentwicklung, bedingt durch die zeitversetzte Durchführung der einzelnen Szenarien erklären (Durchführung an unterschiedlichen Tagen). Die entwicklungspezifischen Unterschiede können aus den Vergleichsversuchen herausgefiltert werden, allerdings gehen dann mögliche Expositionseffekte, die entwicklungsrelevante Gene betreffen, verloren. Das könnte möglicherweise Transkriptionsfaktoren beinhalten, die sowohl an Entwicklungsprozessen als auch an Stressreaktionen beteiligt sind. Unter Berücksichtigung der technischen Schwierigkeiten bei der Versuchsdurchführung erschien es deswegen sinnvoll diesen Versuchstag zu wiederholen. Dies wurde nach Rücksprache mit der Auftraggeberin gemacht und der Versuchstag am 10.7.24 wiederholt. Dieses Szenario wird im Folgenden mit **R\_IV** angegeben.

Für die Wiederholung (R\_IV) konnte im Vorfeld die Problematik der sporadischen Feldsondenausfälle behoben werden. Die Versuchsdurchführung inklusive der

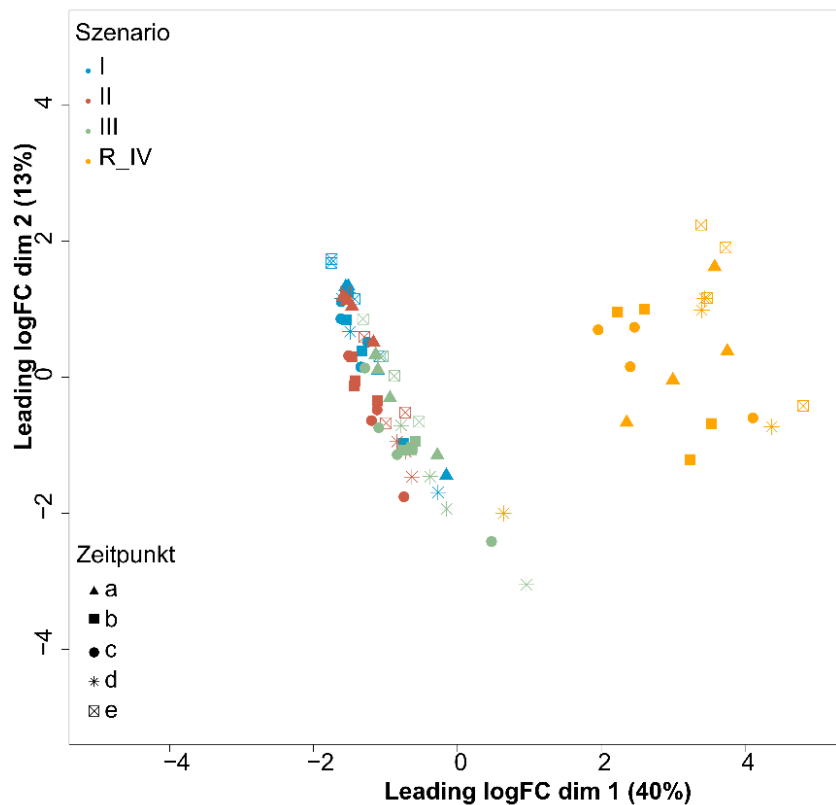
Pflanzenanzucht, der Probennahme, RNA-Isolation und Qualitätssicherung der RNA-Proben erfolgte analog zur ersten Versuchsreihe. Die Probenamen und RIN-Werte sind in Tabelle 3.7 angegeben. Die Qualität dieser Proben war auch sehr hoch (alle RIN-Werte deutlich > 7) und auch diese Proben wurden zur Sequenzierung an die Novogene GmbH verschickt.

**Tabelle 3.7:** Probenname und RIN-Werte der isolierten RNA-Proben des Wiederholungstages IV (R\_IV). RIN = *RNA integrity number*, Sz. = Szenario.

Probenname Sz. R_IV	RIN Sz. R_IV
R_IV_a_1	8.6
R_IV_a_2	8.6
R_IV_a_3	8.9
R_IV_a_4	9.1
R_IV_b_1	8.8
R_IV_b_2	8.9
R_IV_b_3	9
R_IV_b_4	9.1
R_IV_c_1	8.9
R_IV_c_2	8.8
R_IV_c_3	9
R_IV_c_4	8.8
R_IV_d_1	8.6
R_IV_d_2	8.5
R_IV_d_3	8.6
R_IV_d_4	8.1
R_IV_e_1	8.7
R_IV_e_2	8.7
R_IV_e_3	8.7
R_IV_e_4	8.7

Die von der Novogene GmbH erhaltenen Daten zu R\_IV wurden analog der Daten aus Szenarien I, II, III, IV mit der Software STAR auf das Tomatengenom *gemapped* und die *reads* auf Genebene gezählt. Die entsprechenden Qualitätskriterien waren ähnlich derer aus den Szenarien I, II, III, IV und sind in den entsprechenden Tabellen mit aufgelistet (Tabellen 3.4, 3.5). Es fiel auf, dass die *Mapping*-Parameter der Szenario R\_IV Daten etwas besser waren als die der Daten aus Szenario I-IV, was auf einen Batch-Effekt durch die Sequenzierung hindeutet.

Die Daten von R\_IV wurden anschließend mit den Daten von Szenario I, II, und III erneut in einem MDS-Plot dargestellt. Dieser ist in Abbildung 3.4 dargestellt.



**Abbildung 3.4:** Multidimensionaler Skalierungsplot der RNA-Sequenzierdaten der Szenarien I, II, III, und dem Wiederholungstag R\_IV.

Wie in Abbildung 3.4 dargestellt weichen die Genexpressionen des Wiederholungstags R\_IV noch deutlicher von den anderen Szenarien ab, als das ursprüngliche Szenario IV. Dies traf auch wieder auf die Proben des Zeitpunkts vor Exposition (Zeitpunkt e) zu und ist wieder deutlicher an der Anzahl der differenziell exprimierten Gene zwischen den Szenarien pro Zeitpunkt ersichtlich (Tabelle 3.8). Für den Vergleich mit den in Tabelle 3.6 angegebenen Zahlen ist zu berücksichtigen, dass für die Berechnung der differenziell exprimierten Gene in dem neuen Datensatz (Szenarien I, II, III, R\_IV) erneut die schwach exprimierten Gene über den CPM-Wert ausgeschlossen wurden. Je nach Datensatz verändert sich die Anzahl an exprimierten Genen, was dann konsequenterweise zu Änderungen in der Anzahl der differenziell exprimierten Gene führt.

**Tabelle 3.8:** Anzahl der differenziell exprimierten Gene innerhalb verschiedener Zeitpunkte und zwischen verschiedenen Szenarien mit den Daten aus den Szenarien I, II, III, und denen des Wiederholungstags R\_IV. vs = versus, verglichen mit.

Zeitpunkt	Vergleich von Bedingungen	Anzahl hoch regulierter Gene	Anzahl herunter regulierter Gene	Anzahl differenziell exprimierter Gene gesamt	Anzahl nicht regulierter Gene
a	I vs II	0	0	0	21308
a	I vs III	1	0	1	12307
a	I vs R_IV	1652	5863	7515	13793
a	II vs III	0	0	0	21308
a	II vs R_IV	1623	6639	8262	13046
a	III vs R_IV	1711	4832	6543	14765
b	I vs II	0	0	0	21308
b	I vs III	8	22	30	21278
b	I vs R_IV	1385	4629	6014	15294
b	II vs III	3	12	15	21293
b	II vs R_IV	1440	5251	6691	14617
b	III vs R_IV	1544	3355	4899	16409
c	I vs II	0	1	1	21307
c	I vs III	2	2	4	21304
c	I vs R_IV	1360	4634	5994	15314
c	II vs III	1	0	1	21307
c	II vs R_IV	1497	4293	5790	15518
c	III vs R_IV	1490	3264	4754	16554
d	I vs II	3	25	28	21280
d	I vs III	495	727	1222	20086
d	I vs R_IV	1875	6228	8103	13205
d	II vs III	0	0	0	21308
d	II vs R_IV	1865	5847	7712	13596
d	III vs R_IV	2056	5033	7089	14219
e	I vs II	0	0	0	21308
e	I vs III	0	0	0	21308
e	I vs R_IV	2554	8834	11388	9920
e	II vs III	0	0	0	21308
e	II vs R_IV	2575	9094	11669	9639
e	III vs R_IV	2680	8673	11353	9955

Wie aus den Vergleichen zwischen den einzelnen Szenarien zum Zeitpunkt vor Exposition/Stressbedingung (Zeitpunkt e) ersichtlich wird, ist bei dem vorliegenden Versuchsdesign, der Vergleich zwischen den Szenarien wenig aufschlussreich, da alle differenziell exprimierten Gene vor Exposition aus der Analyse zur Detektion von Expositionseffekten ausgeschlossen werden müssen. Deswegen wurden zusätzlich

innerhalb einer Bedingung alle Zeitpunkte gegen den Zeitpunkt e verglichen, da dieser Zeitpunkt als Referenzzeitpunkt vor der Exposition erhoben wurde, also als unexponierte Kontrolle dient. Für diese Analyse wurde der komplette Datensatz (d.h. alle Szenarien: I, II, III, IV, R\_IV) verwendet und erneut die schwach exprimierten Gene über den CPM-Wert herausgefiltert. Diese Analyse erfolgte analog zu den Vergleichen zwischen den Szenarien mit den R Paketen edgeR und limma. Die so ermittelten Zahlen der differenziell exprimierten Gene sind in Tabelle 3.9 dargestellt.

**Tabelle 3.9:** Anzahl der differenziell exprimierten Gene innerhalb der einzelnen Szenarien für jeden Zeitpunkt im Vergleich zur unexponierten Kontrolle (Zeitpunkt e).

Szenario	a im Vergleich zu e	b im Vergleich zu e	c im Vergleich zu e	d im Vergleich zu e
I	1	4	1	36
II	1	80	54	28
III	1	85	143	307
R_IV	1679	5989	6068	864
IV	825	992	641	1443

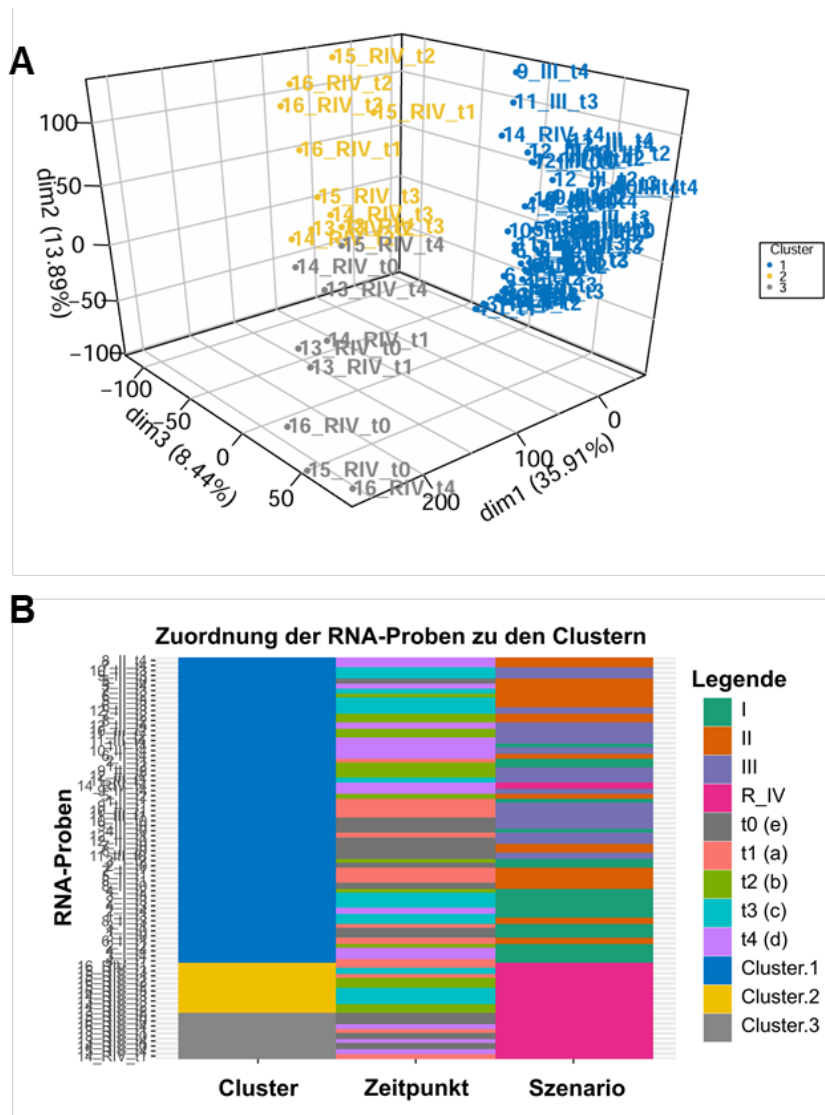
Aus Tabelle 3.9 ist ersichtlich, dass die größte Anzahl an differenziell exprimierten Genen im Vergleich zur unexponierten Kontrolle innerhalb von Szenario IV und dessen Wiederholung R\_IV detektiert wurden. Dies zeigt, dass die Expositionsbedingung die diesen Szenarien (IV und R\_IV) zugrunde liegt größere transkriptionelle Änderungen bedingt, als die anderen getesteten Szenarien (I, II, und III).

### 3.2.5.3.3. Zeitverlaufsanalyse mit dem R-Paket MultiRNAFlow

Um die Genexpressionsänderungen über den Zeitverlauf von bis zu 60 Minuten nach HF-EMF-Exposition detaillierter zu analysieren wurde zusätzlich eine integrierte Analyse der Zeitverläufe über die unterschiedlichen Szenarien mit dem R-Paket *MultiRNAFlow* durchgeführt (Loubaton et al., 2024). Aufgrund der technischen Schwierigkeiten bei Szenario IV, wurden hierzu nun ausschließlich die Daten von R\_IV verwendet.

Nach dem Einlesen wurden die Daten zuerst, wie im Manual angegeben, mit einer varianzstabilisierenden Transformation normalisiert und erneut schwach exprimierte Gene aus dem Datensatz entfernt. Die Normalisierung wurde mittels der Funktion `DATANormalization()` aus dem *MultiRNAFlow*-Paket realisiert. Die Probenbeziehungen wurden mit einer *Principal Component Analyse* (PCA) und einem anschließendem hierarchischem Clustering basierend auf den *Principal Components*

(HPCP) ermittelt. Der 3D-PCA-Plot mit den ermittelten HPCP-Clustern ist in Abbildung 3.5 dargestellt. Dazu wurden die Funktionen PCAanalysis() und HPCPanalysis() aus dem *MultiRNAFlow*-Paket verwendet.



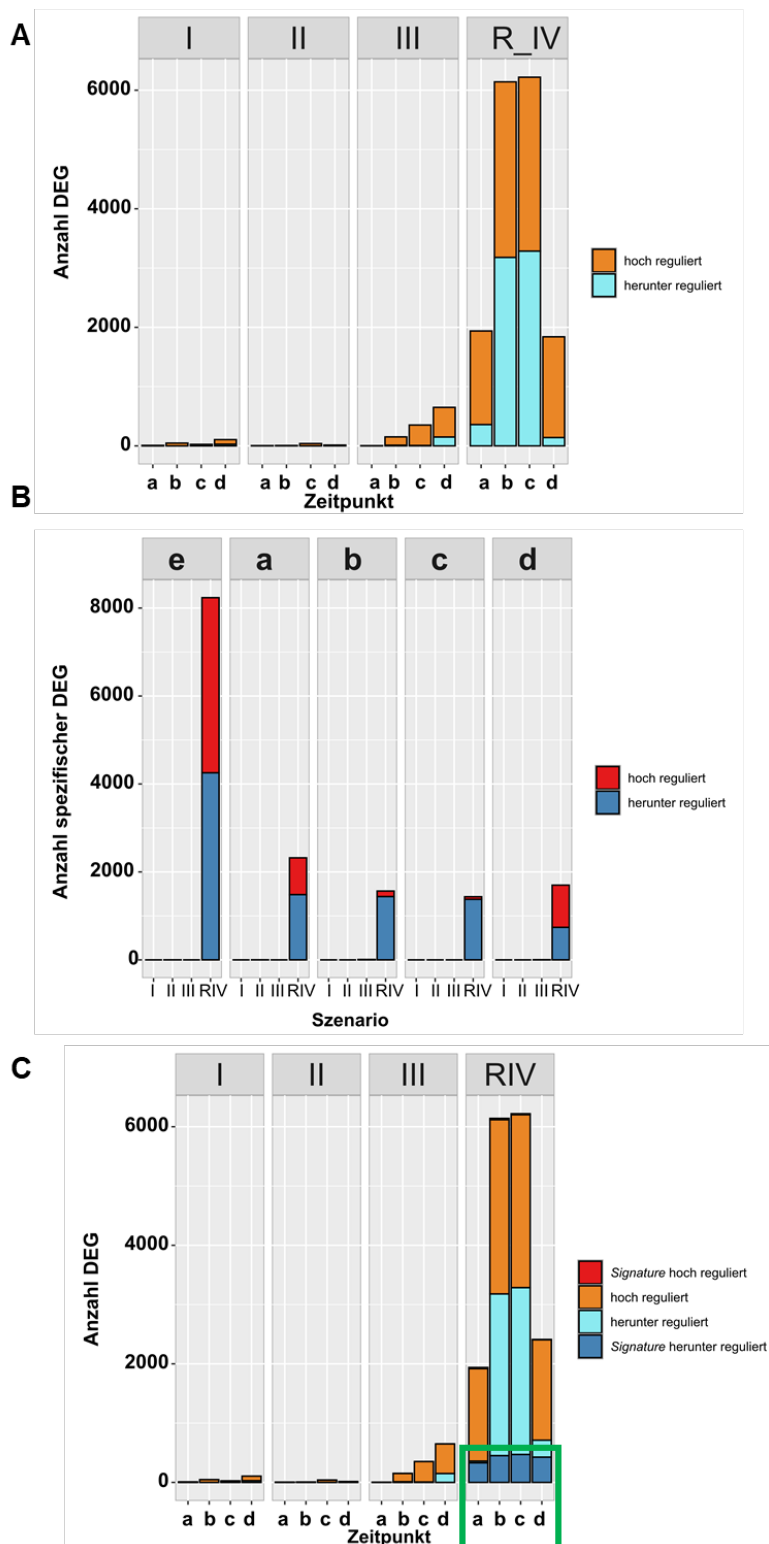
**Abbildung 3.5:** *Principal Component Analysis* (PCA) und hierarchisches *Clustering* der RNA-Sequenzierdaten der Szenarien I, II, III, und R\_IV mittels des *MultiRNAFlow*-Pakets in R. A) 3D-PCA-Plot mit HPCP-Clustern der RNA-Sequenzierdaten der Szenarien I, II, III, und R\_IV. B) Zuordnung der RNA-Proben zu den detektierten HPCP Clustern.

Die Separierung der RNA-Proben aus Szenario R\_IV wird hier etwas besser deutlich als in dem vorherigen MDS-Plot (Abb. 3.4). Durch das gleichzeitige *Clustern* anhand der *Principal Components* sieht man, dass es insgesamt 3 *Cluster* gibt. In *Cluster 1* fallen alle Proben der Szenarien I, II, und III. Dies deutet erneut darauf hin, dass diese Proben sehr ähnlich sind. Die Proben des Szenarios R\_IV bilden 2 *Cluster*, die sich grob in die Zeitpunkte e, a, d (*Cluster 3*) und b, c (*Cluster 2*) aufteilen. Die Zuordnung

der RNA-Proben zu den *Clustern* mit Angabe der Zeitpunkte und Szenarien ist in Abb. 3.5B direkt dargestellt.

Anschließend wurden differenziell exprimierte Gene bestimmt. Das *MultiRNAFlow*-Paket erlaubt es, ähnlich unserer vorangegangenen Analysen, differenziell exprimierte Gene zwischen experimentellen Bedingungen zu ermitteln und auch zwischen verschiedenen Zeitpunkten innerhalb der experimentellen Bedingungen. Dabei wird das DESeq2-Paket aus der Bioconductor Suite von R verwendet (Love et al., 2014). Gegensätzlich zu unserer anfänglichen Analyse gehen hier Zeitpunkt und biologische Bedingung als unabhängige Faktoren ins Modell zur Berechnung von differenziell exprimierten Genen ein.

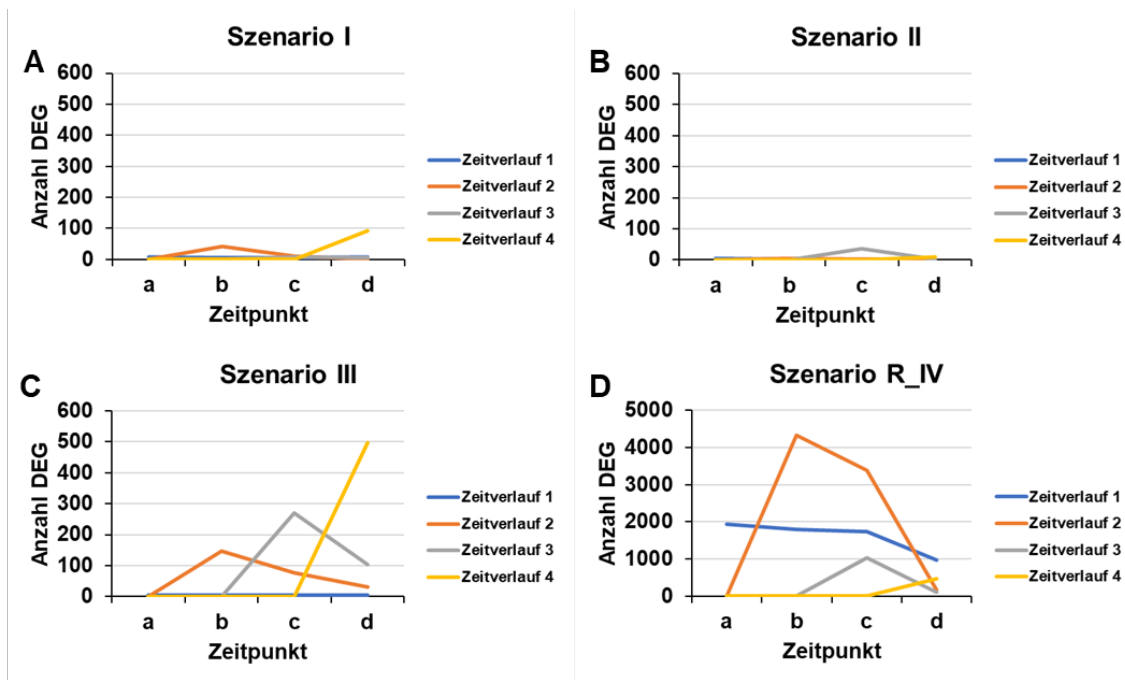
Dabei werden zuerst differenziell exprimierte Gene für jeden Zeitpunkt im Vergleich zum Kontrollzeitpunkt T0 (in unserem Fall Zeitpunkt e) für jedes Szenario ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.6A dargestellt. Auch hier zeigt sich, dass Szenario R\_IV die meisten differenziell exprimierten Gene aufweist. Das Software-Paket ermittelt zusätzlich für jedes Szenario spezifische Gene. Ein Gen wird als spezifisch für ein Szenario X deklariert, wenn es zu einem bestimmten Zeitpunkt zwischen dem Szenario X und jedem beliebigen anderen Szenario differenziell exprimiert ist, nicht aber zwischen anderen Szenarien-Kombinationen. Beispiel: Gen 1 ist zu Zeitpunkt a in den Vergleichen R\_IV gegen I und R\_IV gegen II differenziell exprimiert. Gen 2 auf der anderen Seite ist zu Zeitpunkt a auch in den Vergleichen R\_IV gegen I und R\_IV gegen II, zusätzlich aber auch in den Vergleichen I gegen II und III gegen II differenziell exprimiert. Gen 1 wird deswegen als spezifisch für Szenario R\_IV eingestuft, Gen 2 nicht. Die Anzahl spezifischer Gene für die verschiedenen Szenarien ist in Abbildung 3.6B dargestellt. Auch hier wird die Sonderstellung von Szenario R\_IV deutlich. Bereits zum Kontrollzeitpunkt (Zeitpunkt e = unexponierte Kontrolle) sind mehrere 1000 Gene spezifisch im Szenario R\_IV differenziell reguliert, was erneut zeigt, dass sich hier das Transkriptom bereits vor Exposition deutlich von den Transkriptomen der anderen Szenarien unterscheidet.



**Abbildung 3.6:** Differenzielle Genexpressionsanalyse mit dem R-Paket *MultiRNAFlow*. A) Darstellung der Anzahl der differentiell exprimierten Gene zu jedem Zeitpunkt (a – d) im Vergleich zur unexponierten Kontrolle (Zeitpunkt e) für jedes der getesteten Szenarien (I, II, III, R\_IV). B) Anzahl der spezifischen Gene für jeden Zeitpunkt (a – e) in den einzelnen getesteten Szenarien (I, II, III, R\_IV). Spezifische Gene sind zu einem bestimmten Zeitpunkt differentiell regulierte Gene zwischen einem bestimmten Szenario und einem beliebigen anderen Szenario, aber nicht zwischen anderen Szenarien-Kombinationen (für eine genaue Definition mit Beispiel siehe Text). C) Darstellung der differentiell exprimierten Gene aller Szenarien, wie in A, mit zusätzlicher Kennzeichnung sogenannter *Signature*-Gene. Für eine Definition von „Signature-Gen“ sei auf den Text verwiesen. Die Signatur-Gene sind durch die grüne Box zusätzlich kenntlich gemacht. DEG = differentiell exprimierte Gene.

Neben den spezifischen Genen wurden für jeden Zeitpunkt innerhalb eines Szenarios sogenannte Signatur-Gene (*Signature-Gene*) bestimmt. Ein Gen ist ein Signatur-Gen für ein Szenario zu einem bestimmten Zeitpunkt  $i$ , wenn es spezifisch für das Szenario ist und zu dem Zeitpunkt  $i$  differenziell exprimiert zum Kontrollzeitpunkt (Zeitpunkt e) ist. In unseren Daten wurden ausschließlich für Szenario R\_IV Signatur-Gene detektiert (Abb. 3.6C). Das ist auch nicht verwunderlich, da es zwischen und innerhalb der anderen Szenarien nur wenig differenziell exprimierte Gene gab. Diese Signatur-Gene waren alle im Vergleich zum Kontrollzeitpunkt herunterreguliert.

In einem nächsten Schritt ermittelt das Softwarepaket die Anzahl der differenziell exprimierten Gene über verschiedene Zeitverläufe. Dabei wird pro Zeitpunkt ein Zeitverlauf bestimmt, in unserem Fall wurden also vier Zeitverläufe ermittelt. In Zeitverlauf 1 werden alle Gene bestimmt, die mindestens am Zeitpunkt a differenziell exprimiert sind (sie können müssen aber nicht gleichzeitig zu Zeitpunkt b, c, oder d differenziell exprimiert sein). Zeitverlauf 2 beinhaltet alle Gene, die zu Zeitpunkt a nicht differenziell exprimiert sind, dafür aber mindestens am Zeitpunkt b (wieder können aber müssen diese Gene nicht gleichzeitig zu den Zeitpunkten c oder d differenziell exprimiert sein). Zeitverlauf 3 beinhaltet alle Gene, die zu den Zeitpunkten a und b nicht differenziell exprimiert sind, aber mindestens zu Zeitpunkt c. Zeitverlauf d beinhaltet alle Gene, die zu den Zeitpunkten a, b, c nicht differenziell exprimiert sind, sondern ausschließlich zu Zeitpunkt d. Die Ergebnisse dieser Zeitverläufe für die einzelnen Szenarien sind in Abbildung 3.7 dargestellt.



**Abbildung 3.7:** Anzahl der differenziell exprimierten Gene für die getesteten Szenarien (I, II, III, und R\_IV) in unterschiedlichen Zeitverläufen (bestimmt mit dem *MultiRNAFlow*-Paket aus R). A) Szenario I. B) Szenario II. C) Szenario III. D) Szenario R\_IV. Zeitverlauf 1 = alle mindestens am Zeitpunkt a differenziell exprimierten Gene. Zeitverlauf 2 = alle Gene, die zum Zeitpunkt a nicht differenziell exprimiert sind, aber mindestens zum Zeitpunkt b. Zeitverlauf 3 = alle Gene, die zu den Zeitpunkten a und b nicht differenziell exprimiert sind, aber mindestens zum Zeitpunkt c. Zeitverlauf 4 = alle Gene, die zu den Zeitpunkten a, b, c nicht differenziell exprimiert sind, aber mindestens zum Zeitpunkt d. DEG = differenziell exprimierte Gene.

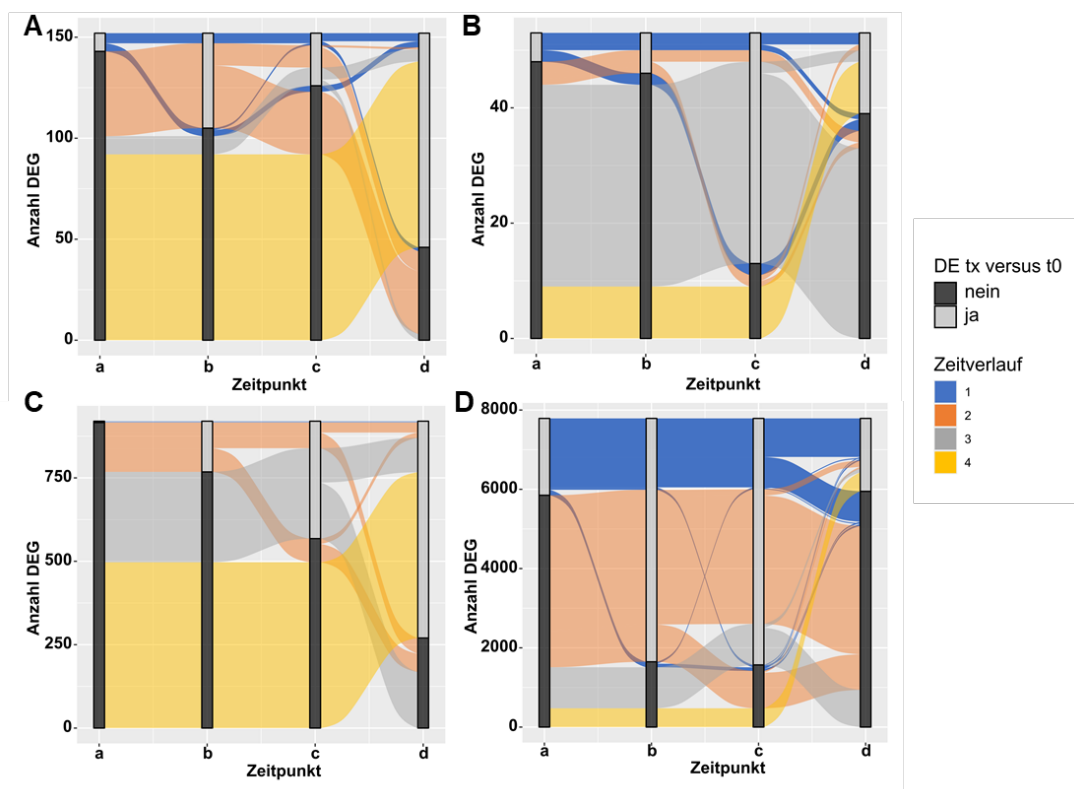
Zusätzlich sind die Zahlen der differenziell exprimierten Gene in den einzelnen Zeitverläufen für jedes Szenario in Tabelle 3.10 angegeben.

**Tabelle 3.10:** Anzahl der differenziell exprimierten Gene in den unterschiedlichen Zeitverläufen für die getesteten Szenarien (I, II, III, R\_IV). Zeitverlauf 1 = alle mindestens am Zeitpunkt a differenziell exprimierten Gene. Zeitverlauf 2 = alle Gene, die zum Zeitpunkt a nicht differenziell exprimiert sind, aber mindestens zum Zeitpunkt b. Zeitverlauf 3 = alle Gene, die zu den Zeitpunkten a und b nicht differenziell exprimiert sind, aber mindestens zum Zeitpunkt c. Zeitverlauf 4 = alle Gene, die zu den Zeitpunkten a, b, c nicht differenziell exprimiert sind, aber mindestens zum Zeitpunkt d. DEG = differenziell exprimierte Gene.

Szenario	Gesamt DEG im Vergleich zu Zeitpunkt e	Zeitverlauf 1	Zeitverlauf 2	Zeitverlauf 3	Zeitverlauf 4
Szenario I	152	9	42	9	92
Szenario II	53	5	4	35	9
Szenario III	920	4	148	271	497
Szenario R_IV	7789	1939	4340	1036	474

Aus Abbildung 3.7 wird ersichtlich, dass gerade Szenario III und Szenario R\_IV charakteristische Zeitverläufe haben. In Szenario III scheint es für jeden Zeitpunkt spezielle Gene zu geben, die hauptsächlich zu diesem Zeitpunkt differenziell

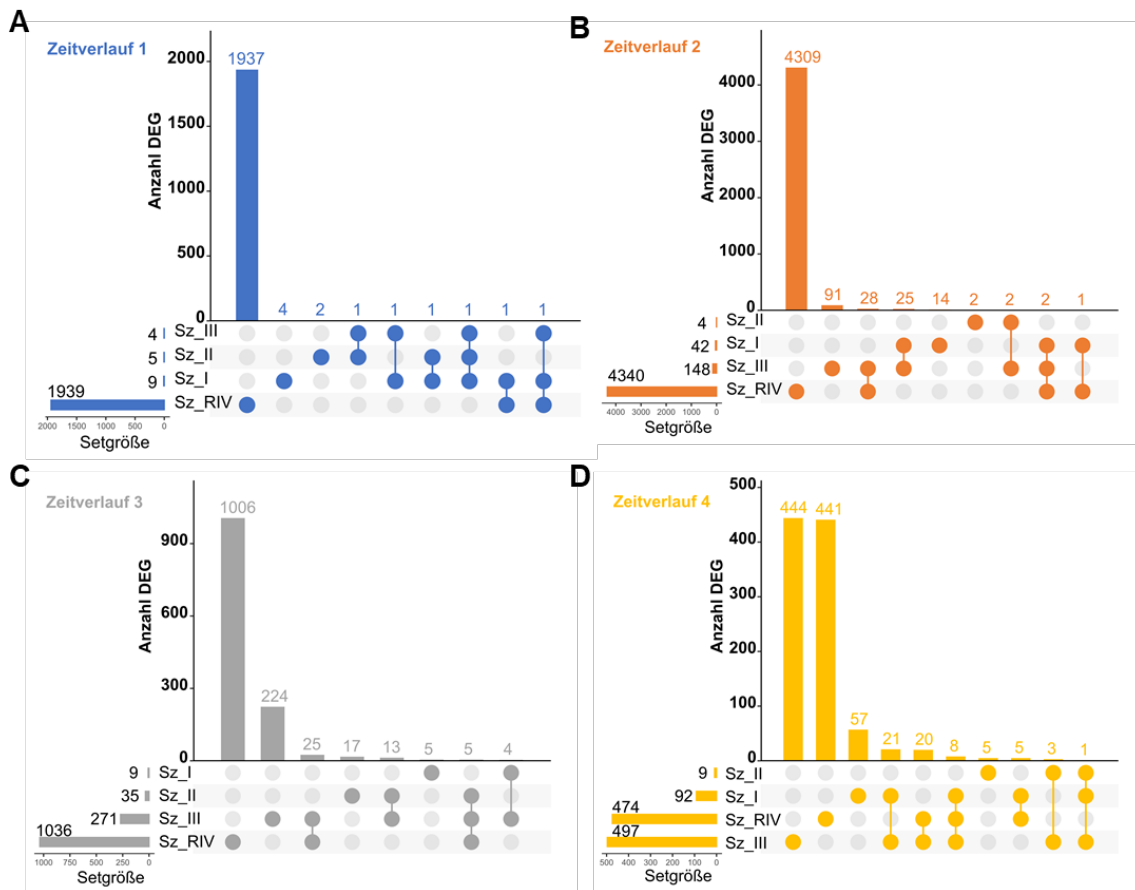
exprimiert sind (Abb. 3.7C). In Szenario R\_IV fällt auf, dass viele der Gene des Zeitverlaufs<sup>1</sup> nicht nur zum Zeitpunkt a, sondern auch an allen anderen Zeitpunkten differenziell exprimiert sind. Zusätzlich erscheint der Zeitverlauf 2 des Szenarios R\_IV interessant, da hier Gene speziell zu den Zeitpunkten b und c differenziell exprimiert sind (Abb. 3.7D). Die detaillierten Zeitverläufe lassen sich mit alluvialen Plots genauer darstellen. Ein alluvialer Plot ist ein Diagramm, das verwendet wird, um Veränderungen oder Ströme zwischen verschiedenen Kategorien im Laufe der Zeit oder zwischen verschiedenen Gruppen darzustellen. Die "Alluvionen" (also die Ströme) in einem solchen Plot zeigen die Verlagerung von Werten oder Kategorien zwischen verschiedenen Zeitpunkten oder Gruppen. Diese Art von Plot ist somit nützlich für die Darstellung mehrerer Kategorien, die sich über die Zeit hinweg ändern. Die alluvialen Plots für die Anzahl der differenziell exprimierten Gene über den Zeitverlauf von Zeitpunkt a zu Zeitpunkt d für die einzelnen getesteten Szenarien (I, II, III, R\_IV) sind in Abbildung 3.8 gezeigt.



**Abbildung 3.8:** Alluviale Plots der differenziell exprimierten Gene über die einzelnen Zeitpunkte (a – d) gegenüber der unexponierten Kontrolle für die getesteten Szenarien (I, II, III, R\_IV). A) Szenario I. B) Szenario II. C) Szenario III. D) Szenario R\_IV. Zeitverlauf 1 = alle mindestens am Zeitpunkt a differenziell exprimierten Gene. Zeitverlauf 2 = alle Gene, die zum Zeitpunkt a nicht differenziell exprimiert sind, aber mindestens zum Zeitpunkt b. Zeitverlauf 3 = alle Gene, die zu den Zeitpunkten a und b nicht differenziell exprimiert sind, aber mindestens zum Zeitpunkt c. Zeitverlauf 4 = alle Gene, die zu den Zeitpunkten a, b, c nicht differenziell exprimiert sind, aber mindestens zum Zeitpunkt d. DEG = differenziell exprimierte Gene, DE tx versus t0 = differenziell exprimiert zum angegebenen Zeitpunkt tx gegenüber der unexponierten Kontrolle (t0 = Zeitpunkt e).

In Abbildung 3.8 zeigt sich, dass die Zeitverläufe für Szenarien I und III (Abb. 3.8A und 3.8C) relativ ähnlich sind. Für Szenario II zeigt sich, dass die Mehrzahl der differenziell exprimierten Gene in diesem Szenario spezifisch zu Zeitpunkt c differenziell exprimiert ist. Für Szenario R\_IV erscheinen speziell die Zeitverläufe 1 und 2 charakteristisch. Diese Zeitverläufe beinhalten hauptsächlich Gene, die entweder über den gesamten Verlauf des Experiments differenziell exprimiert sind oder ganz spezifisch zu den Zeitpunkten b und c (Abb. 3.8D). Weiterhin zeigt sich bei Szenario R\_IV, ähnlich zu Szenario II, eine bedeutende Anzahl an Genen, die nur zu Zeitpunkt c differenziell exprimiert ist.

Anschließend wurden mit Hilfe von *UpSet-Plots* die Schnittmengen an differenziell exprimierten Genen bestimmt, die für die einzelnen Zeitverläufe (1 - 4) zwischen den Szenarien gleich waren (Schnittmenge  $A \cap B$ ). Bei Darstellungen von Schnittmengen aus mehr als drei Datensätzen sind *UpSet-Plots* den gebräuchlicheren Venn-Diagrammen vorzuziehen, da Sie eine bessere Übersichtlichkeit bieten. *UpSet-Plots* wurden mit dem UpSetR-Paket (Version 1.4.0) in R erstellt (Conway et al., 2017). Die *UpSet-Plots* für die einzelnen Zeitverläufe sind in Abbildung 3.9 dargestellt.



**Abbildung 3.9:** UpSet-Plots der einzelnen Zeitverläufe (1 – 4) aus der Zeitverlaufs-Analyse mit dem *MultiRNAFlow*-Paket aus R für die getesteten Szenarien (I, II, III, und R\_IV). A) Zeitverlauf 1 = alle mindestens am Zeitpunkt a differenziell exprimierten Gene. B) Zeitverlauf 2 = alle Gene, die zum Zeitpunkt a nicht differenziell exprimiert sind, aber mindestens zum Zeitpunkt b. C) Zeitverlauf 3 = alle Gene, die zu den Zeitpunkten a und b nicht differenziell exprimiert sind, aber mindestens zum Zeitpunkt c. D) Zeitverlauf 4 = alle Gene, die zu den Zeitpunkten a, b, c nicht differenziell exprimiert sind, aber mindestens zum Zeitpunkt d. DEG = differenziell exprimierte Gene, Sz = Szenario.

In Abbildung 3.9 sieht man, dass die Schnittmengen der Zeitverläufe der einzelnen Szenarien relativ gering sind, was bedeutet, dass die Gene, die zu den einzelnen Zeitpunkten differenziell exprimiert werden in den verschiedenen Szenarien relativ unterschiedlich sind.

Um im Weiteren gezielte Analysen durchzuführen, wurde daraufhin die Verblindung für dieses Arbeitspaket aufgelöst.

#### 3.2.5.3.4. Auflösung der Verblindung

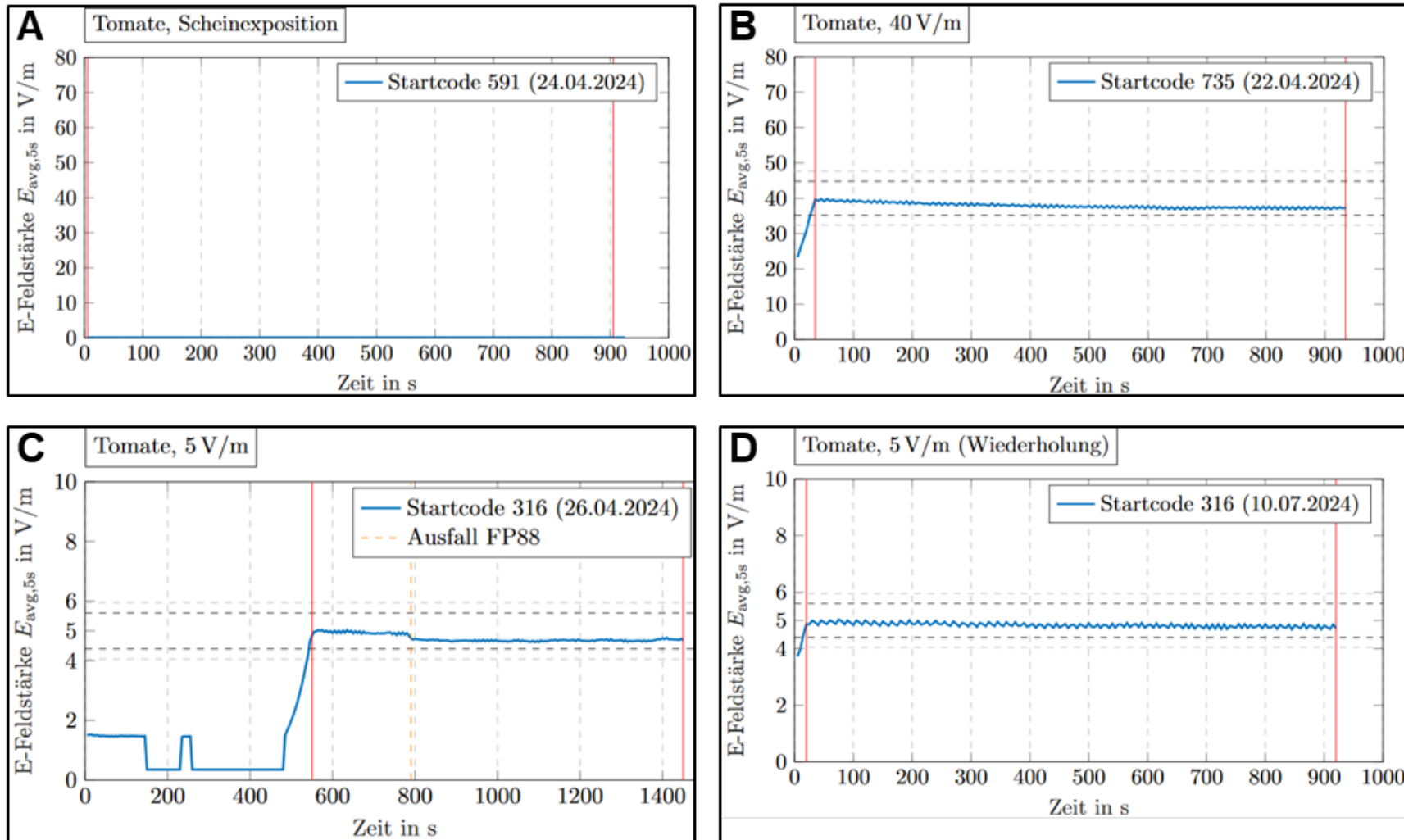
Die Auflösung der Verblindung wurde an der TU Braunschweig durchgeführt, indem die Startcodes den zu testenden Expositionsszenarien zugeordnet wurden (Tabelle 3.11).

**Tabelle 3.11:** Auflösung der Verblindung der Expositionsszenarien.

Szenario	Startcode	Exposition
I	735	40 V/m
III	591	0 V/m
IV	316	5 V/m
R_IV	316	5 V/m

Die Auflösung der Verblindung zeigte, dass Szenario IV und das Wiederholungsszenario R\_IV, welche die größten Unterschiede in der differentiellen Genexpression zeigten, das Expositionsszenario mit der Feldstärke 5 V/m war. Dies erschien erst einmal überraschend, da das Szenario mit der höheren Feldstärke (Szenario I = 40 V/m) einen weitaus geringeren Effekt auf das Transkriptom hatte.

Daraufhin wurden die Plots der zeitlichen Verläufe der Expositionsfeldstärken aus den mit allen 8 Feldsonden aufgenommenen Rohdaten erstellt. Die Plots sind in Abbildung 3.10 dargestellt. Die Aufzeichnung erfolgte mit einer Abtastrate von 100 *Samples/sek*. Für jeden Feldsensor ist zunächst für jeden Zeitpunkt der Absolutbetrag aus den Beiträgen der drei einzelnen Feldstärkewerte je kartesischer Raumdimension berechnet worden. Dargestellt ist die statistische Feldstärke, gebildet als arithmetisches Mittel über einen Betrachtungszeitraum von 5 sek je Datenpunkt, sowie über alle acht Feldsondenpositionen.



**Abbildung 3.10:** Plots der zeitlichen Verläufe der Expositionsfeldstärke für die einzelnen Versuchstage. A) Szenario III (Scheinexposition = 0 V/m). B) Szenario I (Exposition mit 40 V/m). C) Szenario IV (Exposition mit 5 V/m) und D) Szenario R\_IV (Wiederholungs-Tag IV = Exposition mit 5 V/m).

Aus Abbildung 3.10 ist ersichtlich, dass die angestrebte Feldstärke für alle Expositionen innerhalb des Toleranzniveaus geblieben ist und somit die Versuchspflanzen über den Zeitraum von 15 Minuten einem homogenen Feld mit der angestrebten Feldstärke ausgesetzt waren. Aus dem *Plot* des ersten Szenario IV (5 V/m) sind zudem die technischen Schwierigkeiten, die aufgetreten sind, ersichtlich (Abbrechen des Einregelungsvorgangs nach ungefähr drei Minuten, Neustart nach ungefähr vier Minuten, und erneuter Neustart nach *Resetting* des gesamten Systems nach acht Minuten; Abb. 3.10C).

Da die Versuchsdurchführung des Wiederholungstags fehlerfrei lief wurden im Folgenden nur noch die Daten dieses Tages berücksichtigt (Szenario R\_IV). Da bereits die unexponierte Kontrolle an diesem Tag (Zeitpunkt e) allerdings so deutliche Unterschiede zu den anderen Versuchstagen zeigte, wurde Szenario R\_IV gesondert betrachtet und ausschließlich zur unexponierten Kontrolle (Zeitpunkt e) verglichen.

Szenario I (40 V/m) und Szenario II (mechanischer Stress) wurden, wie in der Leistungsbeschreibung angegeben, jeweils zur Scheinexposition (Szenario III = 0 V/m) verglichen. Da Szenario R\_IV einzeln betrachtet wurde, wurde die differenzielle Genexpressionsanalyse erneut durchgeführt und die Daten von R\_IV aus dem Input-Datensatz entfernt. Anschließend wurden aus dem neuen Datensatz erneut die schwach exprimierten Gene entfernt und die differenziell exprimierten Gene, wie unter 3.2.5.3.2 angegeben, ermittelt. Somit ergaben sich die in Tabelle 3.12 dargestellten Zahlen an differenziell exprimierten Genen.

**Tabelle 3.12:** Anzahl der differenziell exprimierten Gene für die gezielten Analysen zwischen den Szenarien I (40 V/m), II (mechanischer Stress), und III (Scheinexposition 0 V/m), sowie für die gesonderte Analyse von Szenario R\_IV (5 V/m) zur unexponierten Kontrolle (Zeitpunkt e).

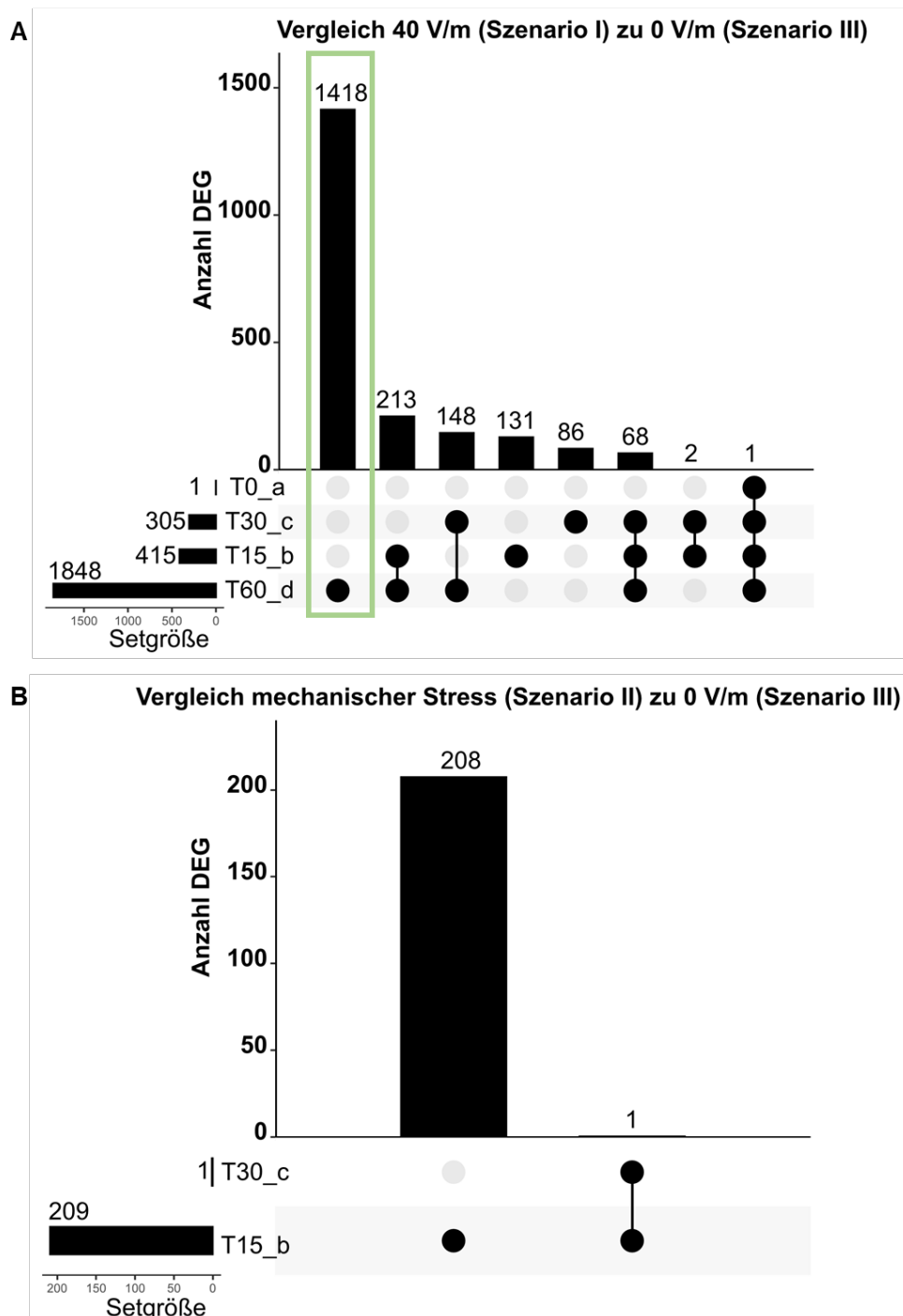
Vergleich entblendet	Vergleich (Szenarien)	Anzahl differenziell exprimierter Gene
40 V/m zu 0 V/m: Zeitpunkt 0 min	I_III_a	1
40 V/m zu 0 V/m: Zeitpunkt 15 min	I_III_b	415
40 V/m zu 0 V/m: Zeitpunkt 30 min	I_III_c	305
40 V/m zu 0 V/m: Zeitpunkt 60 min	I_III_d	1848
Mechanischer Stress zu 0 V/m: Zeitpunkt 0 min	II_III_a	0
Mechanischer Stress zu 0 V/m: Zeitpunkt 15 min	II_III_b	209
Mechanischer Stress zu 0 V/m: Zeitpunkt 30 min	II_III_c	1
Mechanischer Stress zu 0 V/m: Zeitpunkt 60 min	II_III_d	0
40 V/m zum mechanischen Stress: Zeitpunkt 0 min	I_II_a	0
40 V/m zum mechanischen Stress: Zeitpunkt 15 min	I_II_b	0
40 V/m zum mechanischen Stress: Zeitpunkt 30 min	I_II_c	0
40 V/m zum mechanischen Stress: Zeitpunkt 60 min	I_II_d	109
5 V/m: Zeitpunkt 0 min zu Zeitpunkt vor Exposition	R_IV_a_e	1679
5 V/m: Zeitpunkt 15 min zu Zeitpunkt vor Exposition	R_IV_b_e	5989
5 V/m: Zeitpunkt 30 min zu Zeitpunkt vor Exposition	R_IV_c_e	6068
5 V/m: Zeitpunkt 60min zu Zeitpunkt vor Exposition	R_IV_d_e	864

### 3.2.5.3.5. Darstellung von Schnittmengen mit *Upset Plots*

In einem ersten Schritt wurden hier nun auch mit Hilfe von *UpSet-Plots* die Schnittmengen an differenziell exprimierten Genen bestimmt, die zwischen Zeitpunkten und zwischen Szenarien gleich waren (Schnittmenge  $A \cap B$ ). Die *Upset-Plots* für die Vergleiche zwischen der 40 V/m-Exposition (Szenario I) und dem mechanischen Stress (Szenario II) jeweils zur Scheinexposition (0 V/m = Szenario III) sind in Abbildung 3.11 dargestellt.

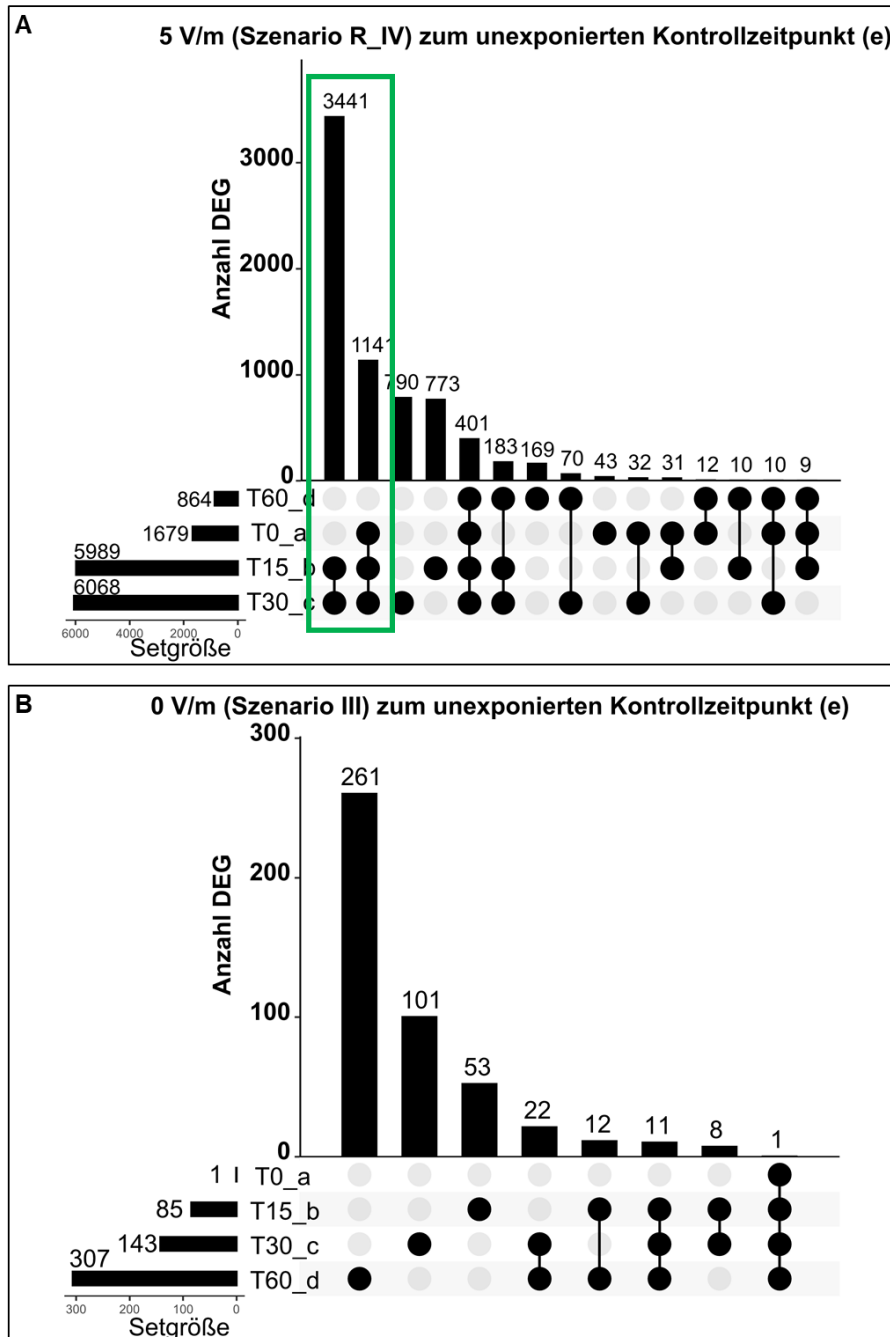
Abbildung 3.11A zeigt, dass die Exposition von Tomatenpflanzen mit 40 V/m zu zeitlich-spezifischen Genexpressionsänderungen im Vergleich zur Scheinexposition (0 V/m) führt. Die meisten differenziell exprimierten Gene lassen sich 60 Minuten nach Expositionsende feststellen und der Großteil der Gene taucht nur an diesem Zeitpunkt als differenziell exprimiert auf. Die nächstgrößeren Schnittmengen zeigen Überlappungen zwischen 15 Minuten und 30 Minuten nach Expositionsende mit dem Zeitpunkt 60 Minuten nach Expositionsende. Demnach sind die Gene, die nach 15 und 30 Minuten nach Expositionsende differenziell reguliert werden auch noch nach 60 Minuten differenziell reguliert, allerdings werden 60 Minuten nach Expositionsende nochmal deutlich mehr Gene differenziell reguliert. Es kommt also zu einem Anstieg

an differenziell exprimierten Genen im Zeitverlauf bis 60 Minuten nach Expositionsende. Basierend auf dieser Analyse (Vergleich mit der Scheinexposition) kommt es beim mechanischen Stress lediglich kurz nach Stressinduktion (15 Minuten nach Stressende) zur differenziellen Expression mehrerer hundert Gene (Abb. 3.11B).



**Abbildung 3.11:** Darstellung der Schnittmengen der differenziell exprimierten Gene (DEG) in den unterschiedlichen Zeitpunkten zwischen der 40 V/m-Exposition (Szenario I) oder dem mechanischen Stress (Szenario II) zur Scheinexposition (0 V/m; Szenario III). A) 40 V/m (Szenario I) im Vergleich zur Scheinexposition (0 V/m; Szenario III). B) Mechanischer Stress (Szenario II) zur Scheinexposition (0 V/m; Szenario III).

Die Schnittmengen der differenziell exprimierten Gene zu den verschiedenen Zeitpunkten nach der 5 V/m Exposition (Szenario R\_IV) im Vergleich zur unexponierten Kontrolle sind in Abbildung 3.12A dargestellt.



**Abbildung 3.12:** Schnittmengen der differenziell exprimierten Gene (DEG) der verschiedenen Zeitpunkte nach Exposition mit 5 V/m (Szenario R\_IV) im Vergleich zur unexponierten Kontrolle (Zeitpunkt e) und die Schnittmengen der differenziell exprimierten Gene der verschiedenen Zeitpunkte der Scheinexposition (0 V/m; Szenario III) im Vergleich zum Zeitpunkt e. A) 5 V/m. B) 0 V/m.

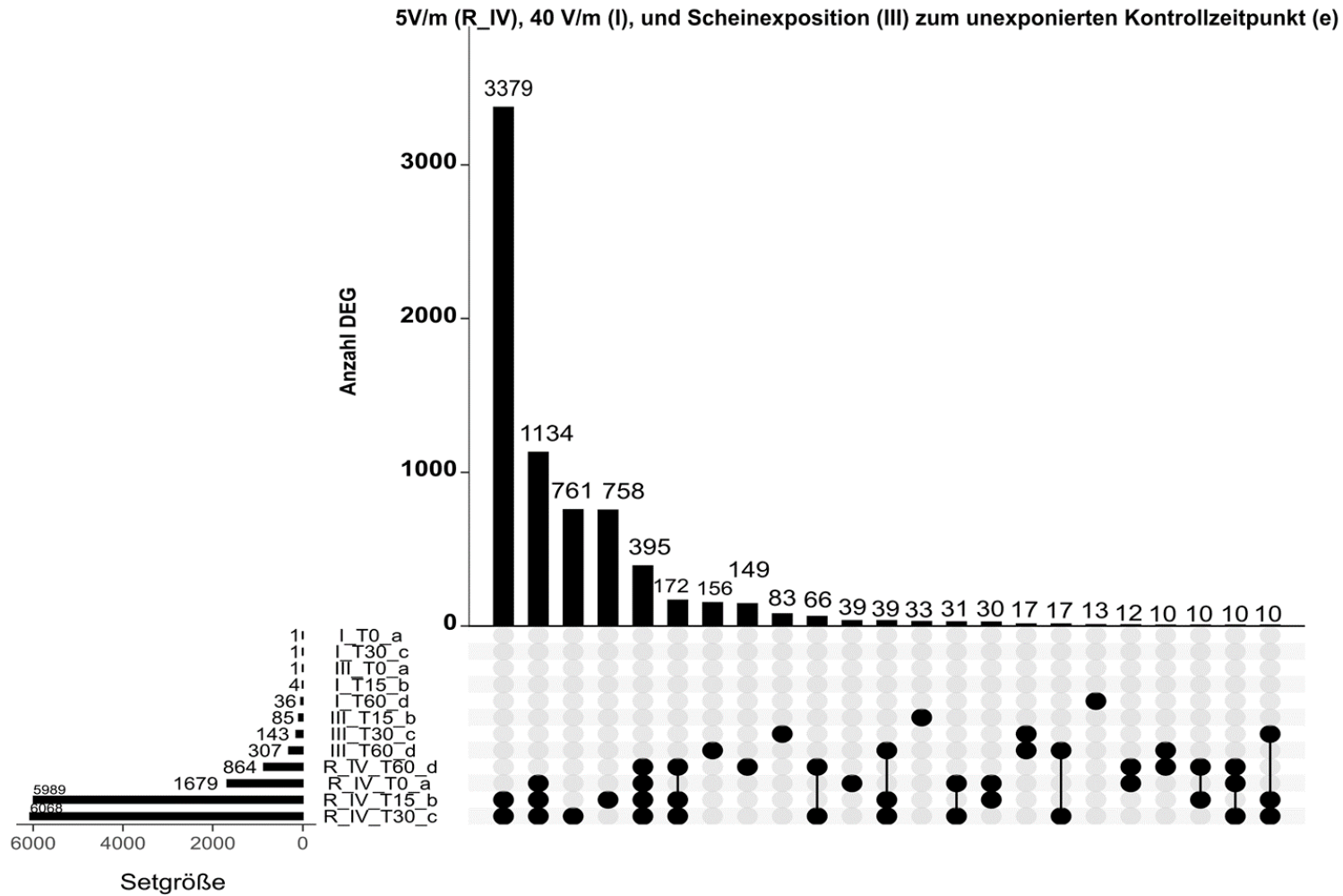
Bei der 5 V/m Exposition ist zu beobachten, dass es einen massiven Überlapp an Genen gibt, die vor allem früh nach Expositionsende differenziell reguliert sind (Abb. 3.12A = T0, T15, T30). Die zeitspezifischen, differenziell exprimierten Gene sind von

der Anzahl nachgestellt. Zudem kommt es zu keinem Anstieg an differenziell exprimierten Genen 60 Minuten nach Exposition, sondern es ergibt sich eher das Bild, dass es zu einer schnellen Änderung der Genexpression kommt, die dann über die Zeit wieder „abflaut“.

Im Vergleich sind zudem die Schnittmengen der differenziell exprimierten Gene nach Zeitpunkten der Scheinexposition (0 V/m = Szenario III) im Vergleich zur unexponierten Kontrolle gezeigt (Abb. 3.12B). Hieraus wird ersichtlich, dass es zu ganz spezifischen Genexpressionsänderungen über den Zeitverlauf von 60 Minuten kommt. Solche Schwankungen in der Genexpression spiegeln sehr wahrscheinlich die natürliche Genregulation der Tomaten im Laufe des Vormittags wieder (circadiane Rhythmik; Dwivedi *et al.*, 2024). Es fiel auf, dass diese Genregulation bei der 40 V/m Exposition (Szenario I) und bei dem mechanischen Stress (Szenario II) unterdrückt zu sein scheint, da es in diesen Szenarien im Vergleich zur unexponierten Kontrolle (Zeitpunkt e) zu einer sehr geringen Anzahl an differenziell exprimierten Genen kam (Tabelle 3.9, Szenario I und Szenario II).

Die Schnittmengen der differenziell exprimierten Gene aller Expositionsszenarien im Verlauf der unterschiedlichen Zeitpunkte im Vergleich zur jeweiligen unexponierten Kontrolle sind in Abbildung 3.13 dargestellt. Hierbei sei darauf hingewiesen, dass zur Übersichtlichkeit nur Schnittmengen mit mehr als 10 Genen dargestellt werden.

Auch aus Abbildung 3.13 wird ersichtlich, dass Schnittmengen an überlappenden Genen hauptsächlich in Szenario R\_IV zu finden sind. Interessant erscheint, dass es keine signifikanten Schnittmengen (mit mehr als 10 Genen) des Expositionsszenarios 40 V/m (Szenario I) mit anderen Szenarien oder Zeitpunkten gibt, wenn mit der unexponierten Kontrolle (Zeitpunkt e) verglichen wird. Dies deutet erneut darauf hin, dass Gene, die normalerweise im Tagesverlauf differenziell exprimiert werden (wie aus der Scheinkontrolle, 0 V/m = Szenario III, ersichtlich) unterdrückt zu werden scheinen.



**Abbildung 3.13:** Schnittmengen der differenziell exprimierten Gene (DEG) aller Zeitpunkte aller Expositionsszenarien (Szenario III = 0 V/m, Szenario R\_IV = 5 V/m, Szenario I = 40 V/m) im Vergleich zur unexponierten Kontrolle (Zeitpunkt e) des jeweiligen Versuchstages. Dargestellt sind nur Schnittmengen, bei denen mehr als 10 differenziell exprimierte Gene detektiert wurden.

3.2.5.3.6. Gen-Ontologie-Analyse- Differenziell exprimierte Gene  
aus 3.2.5.3.2

Im nächsten Schritt wurde analysiert, in welchen biologischen Prozessen die differenziell exprimierten Gene (aus 3.2.5.3.2) eine Rolle spielen. Dazu wurden Gen-Ontologie-Analysen durchgeführt (GO-Analyse). Diese wurden über die Panther-Datenbank durchgeführt ([Link zur Panther-Datenbank](#)) und anschließend mit dem ggplot2-Paket in R als *Bubbleplots* visualisiert (Wickham, 2016). Dabei spiegelt sich das Maß der Anreicherung (*Fold-Enrichment*) in der Größe der dargestellten Kreise wider. Zur Übersichtlichkeit wurden maximal 30 statistisch signifikante GO-Begriffe visualisiert. Dazu wurden die Ergebnislisten nach dem Maß der Anreicherung sortiert und gefiltert. Das Filterkriterium ist in den einzelnen *Plots* direkt angegeben. Statistisch überrepräsentierte biologische Prozesse im Vergleich zur genomweiten Repräsentation für den Vergleich zwischen 40 V/m (Szenario I) und 0 V/m (Szenario III) 60 Minuten nach Expositionsende zeigten, dass vor allem Gene, die Zellzyklus-relevante Prozesse (GO: 0007049 = *cell cycle*) und den Transmembrantransport (GO: 0055085 = *transmembrane transport*) betreffen, überrepräsentiert sind (Abb.3.14A). In Tabelle 3.13 sind die differenziell exprimierten Gene gelistet, die diesen zwei GO-Kategorien zuzuordnen sind.

**Tabelle 3.13:** Liste an Genen, die zwischen Szenario I (40 V/m) und Szenario III (0 V/m) zum Zeitpunkt 60 Minuten nach Expositionsende differenziell exprimiert sind und den signifikant angereicherten Genontologien GO:0007049 (*cell cycle*) und GO:0055085 (*transmembrane transport*) zugeordnet werden können. FC = *fold change*, GO = Genontologie, min = Minuten.

GO-Term	Gene	Gen-Beschreibung	logFC_60min
GO:0007049 cell cycle	Solyc08g066050	Aurora kinase	1.528835309
	Solyc01g096840	Protein endosperm defective 1-related	1.626155886
	Solyc03g007550	Treslin	1.176130628
	Solyc02g091870	Tubulin alpha chain	-1.408509387
	Solyc09g010060	Kinesin family member 11	1.624488759
	Solyc12g095870	Serine_threonine-protein kinase aurora-1-related	1.444220263
	Solyc11g011370	Condensin complex subunit 3	1.249646025
	Solyc08g082670	Cellulose synthase-like protein g1-related	-1.190666805
	Solyc07g053820	Bub1 kinase, isoform a-related	1.625039476
	Solyc02g082820	G2_mitotic-specific cyclin-2-like	1.779825226
	Solyc07g053790	TPX2 c-terminal domain-containing protein	1.690015765
	Solyc04g078310	Cyclin-a3-1	1.06775958
	Solyc03g120440	Cyclin-a2-4	1.043389111
	Solyc07g049680	Condensin complex subunit 2	1.20456434
	Solyc01g097110	Fanconi anemia group d2 protein	1.132747581

GO-Term	Gene	Gen-Beschreibung	logFC_60min
	Solyc04g072790	Cellulose synthase a catalytic subunit 6 [udp-forming]-related	2.041740857
	Solyc01g056990	Spindle and kinetochore-associated protein 3	1.152963884
	Solyc10g083310	125 kda Kinesin-related protein-like	1.533420387
	Solyc06g065680	Cyclin-a2-1-related	1.171103966
	Solyc03g044020	Condensin-2 complex subunit g2	1.173160836
	Solyc06g051040	Os11g0128700 protein	1.712876253
	Solyc03g115050	Replication protein a 70 kda dna-binding subunit b-related	1.025573729
	Solyc12g015850	Sugar phosphate transporter domain-containing protein	1.034705643
	Solyc08g082530	Inactive atp-dependent zinc metalloprotease ftshi 1, chloroplastic-related	1.180305067
	Solyc10g076480	Ammonium transporter 2	-1.817671844
	Solyc02g087280	Protein nrt1_ptr family 5.8	-1.279204946
	Solyc06g076750	Peptide transporter	-1.113433091
	Solyc02g077270	Calcium-binding ef-hand family protein	-1.094101664
	Solyc10g084950	Protein NRT1_ptr family 5.6	-1.046339717
	Solyc03g097840	Mitochondrial phosphate carrier protein	-1.453035341
	Solyc09g074230	Sugar transporter erd6-like 7	-1.178623821
	Solyc05g006920	Protein nrt1_ptr family 2.13	-1.038205073
	Solyc12g011070	Vacuolar cation_proton exchanger	-1.034088259
	Solyc05g005920	Major facilitator superfamily (mfs) profile domain-containing protein	-1.133359193
GO:0055085	Solyc04g082020	a_tm021b04.14 protein	-1.067061292
transmembrane	Solyc10g076710	Phosphoinositide phospholipase c	-1.249765847
transport	Solyc12g099070	Inositol transporter 4-like	2.2970944
	Solyc04g005790	Protein nrt1_ptr family 4.6	-1.244512166
	Solyc06g050800	Sodium-coupled neutral amino acid transporter 6 isoform x1-related	-1.033769017
	Solyc09g005250	Vacuolar cation_proton exchanger	1.35010691
	Solyc05g009500	Protein NRT1_ptr family 3.1	-1.105905846
	Solyc11g066800	GABA transporter 1	-2.091019323
	Solyc06g050900	Protein NRT1_ptr family 5.1	-1.055962678
	Solyc05g045670	Glucose-6-phosphate_phosphate translocator 2, chloroplastic-related	-3.764865959
	Solyc04g070970	ABC transporter g family member 22-like isoform x1	3.699312171
	Solyc03g116990	Protein transport protein sec61 subunit beta	-1.438136359
	Solyc01g060070	outer envelope pore protein 16-2, chloroplastic	-1.417339539
	Solyc03g007690	ABCc transporter g family member 8	2.895525298

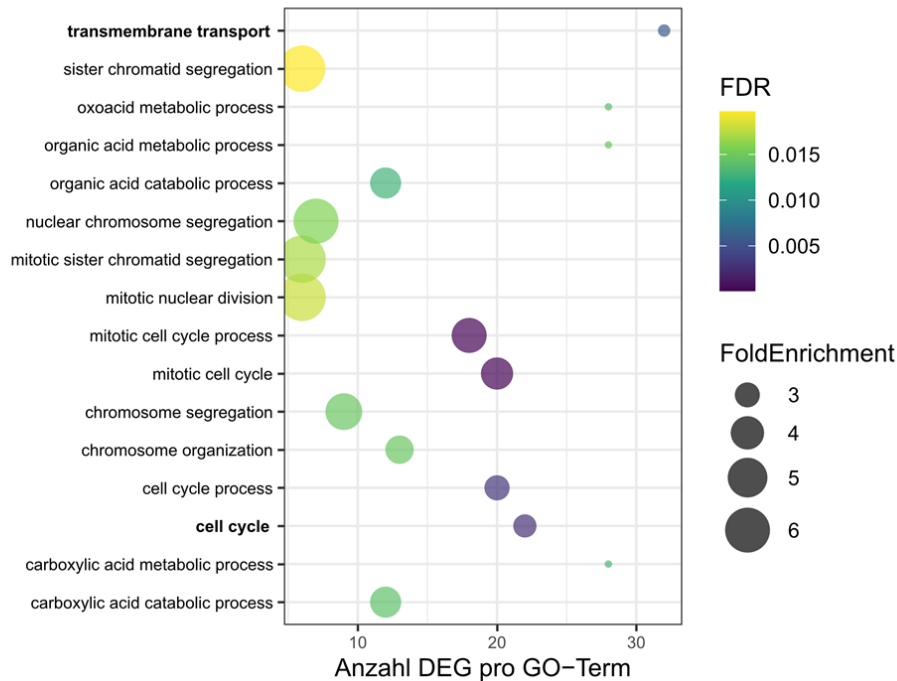
GO-Term	Gene	Gen-Beschreibung	logFC_60min
	Solyc01g098560	Sugar transporter erd6-like 5	-1.042073053
	Solyc03g121350	Anoctamin	-1.56761383
	Solyc12g088190	low quality protein: amino acid permease 6-like	-1.103885249
	Solyc09g098380	Amino acid transporter avt1h	-3.221649006
	Solyc07g066020	Amino acid permease 7-related	-1.342537907
	Solyc06g072330	Os03g0776900 protein	-1.0713123

Im Gegensatz dazu waren biologische Prozesse wie „Antwort auf Lichtstimulus“ (GO:0009416 = *response to light stimulus*), „Antwort auf Strahlung“ (GO:0009314 = *response to radiation*), und „rRNA-Prozessierung“ (GO: 0006304 = *rRNA processing*) in der differenziellen Genliste der 5 V/m Exposition zum Zeitpunkt 60 Minuten nach Exposition im Vergleich zur unexponierten Kontrolle (= Zeitpunkt e) überrepräsentiert. Der GO-Term „*response to light stimulus*“ ist eine untergeordnete Kategorie des GO-Terms „*response to radiation*“, der sich, wie folgt, definiert: „Jeder Prozess, der zu einer Veränderung des Zustands oder der Aktivität einer Zelle oder eines Organismus führt (in Bezug auf Bewegung, Sekretion, Enzymproduktion, Genexpression usw.) als Ergebnis eines elektromagnetischen Strahlungsreizes. Elektromagnetische Strahlung ist eine sich ausbreitende Welle im Raum mit elektrischen und magnetischen Komponenten. Diese Komponenten oszillieren senkrecht zueinander und zur Ausbreitungsrichtung“ ([Link zur GO-Kategorie Response to Radiation](#)). Es sei darauf hingewiesen, dass sich „Strahlung“ auf elektromagnetische Strahlung jeder Wellenlänge bezieht. Die gesamte Liste an überrepräsentierten GO-Termen (Kategorie biologischer Prozess) ist in Abbildung 3.14B visualisiert. In Tabelle 3.14 sind die differenziell exprimierten Gene gelistet, die den GO-Kategorien „*response to radiation*“ und „*rRNA processing*“ zuzuordnen sind.

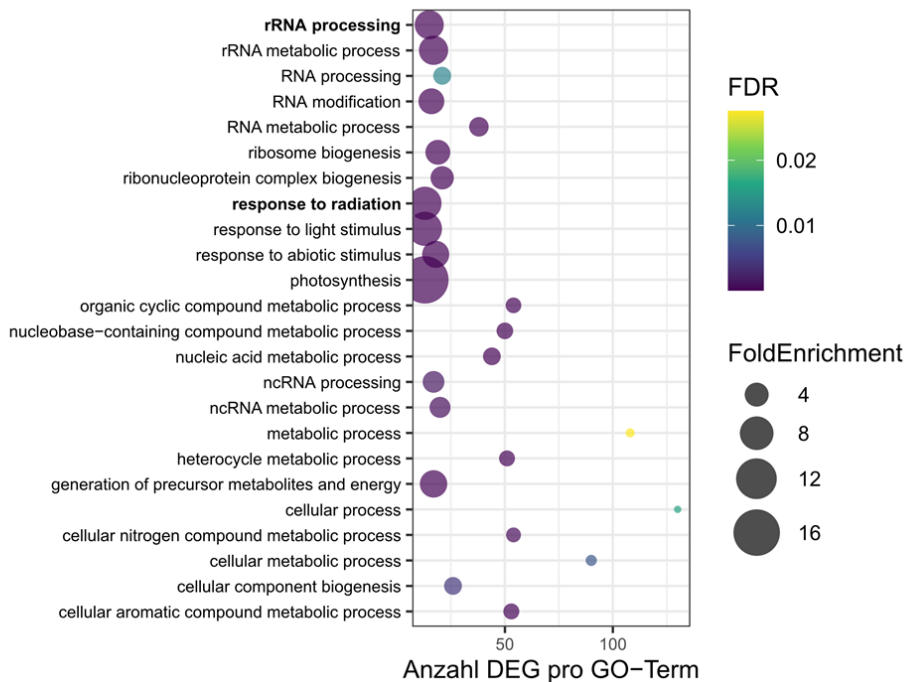
**Tabelle 3.14:** Liste an Genen, die in Szenario R\_IV (5 V/m) zum Zeitpunkt 60 Minuten nach Expositionsende zum Kontrollzeitpunkt (Zeitpunkt e) differenziell exprimiert sind und den signifikant angereicherten Genontologien GO:0009314 (*response to radiation*) und GO:0006364 (*rRNA processing*) zugeordnet werden können. FC = *fold change*, GO = Genontologie, min = Minuten.

GO-Term	Gen	Gen-Beschreibung	logFC_60min
GO: 0009314 response to radiation	Solyc09g014520	Chlorophyll a-b binding protein cp29.1	1.758992369
	Solyc05g056050	Chlorophyll a-b binding protein 6	1.684385565
	Solyc03g005760	Chlorophyll a-b binding protein 1c	2.761102319
	Solyc01g105030	Chlorophyll a-b binding protein cp24 10a	1.550863343
	Solyc12g011280	Photosystem i chlorophyll a_b-binding protein 3-1	1.170653801
	Solyc07g063600	Chlorophyll a-b binding protein	1.948210572
	Solyc11g072310	Oxygenase	-2.525229099
	Solyc03g115900	Chlorophyll a-b binding protein	1.853076021
	Solyc10g006230	Photosystem i chlorophyll a_b-binding protein 2	1.128652751
	Solyc12g006140	Chlorophyll a-b binding protein	2.018084892
	Solyc12g011450	Chlorophyll a-b binding protein 13	1.332299557
	Solyc07g047850	Chlorophyll a-b binding protein 4	1.592746782
	Solyc03g005770	Chlorophyll a-b binding protein 1c	3.536070015
GO: 0006364 rRNA processing	Solyc09g074090	Exosome complex component rrp4	-1.268037245
	Solyc03g025270	rrna 2'-o-methyltransferase fibrillarin 1-related	-1.133831652
	Solyc01g087670	WD repeat-containing protein 36	-1.017969241
	Solyc07g009350	U3 small nucleolar rna-associated protein 25 homolog	-1.158783568
	Solyc02g085230	Nucleolar protein 6	-1.646859181
	Solyc01g111420	Ribosomal l1 domain-containing protein 1	-1.108968203
	Solyc01g007250	U3 small nucleolar ribonucleoprotein protein imp4	-1.016096089
	Solyc03g120080	Periodic tryptophan protein 2 homolog	-1.309721583
	Solyc03g093480	Heat repeat-containing protein 1	-1.053624188
	Solyc10g083600	Ribosome production factor 2 homolog	-1.060349592
	Solyc02g081810	H_aca ribonucleoprotein complex subunit dkc1	-1.283984944
	Solyc06g072250	18s rRNA (guanine-n(7))-methyltransferase-related	-1.068863253
	Solyc04g015940	Ribosomal rna-processing protein 12-like conserved domain-containing protein	-1.469060932
	Solyc05g011990	Nucleolar protein 14	-1.08615374
	Solyc01g100430	Dimethyladenosine transferase-related	-1.065156613

**A** 40 V/m (I) gegenüber 0 V/m (III) nur T\_60 (GO BP)

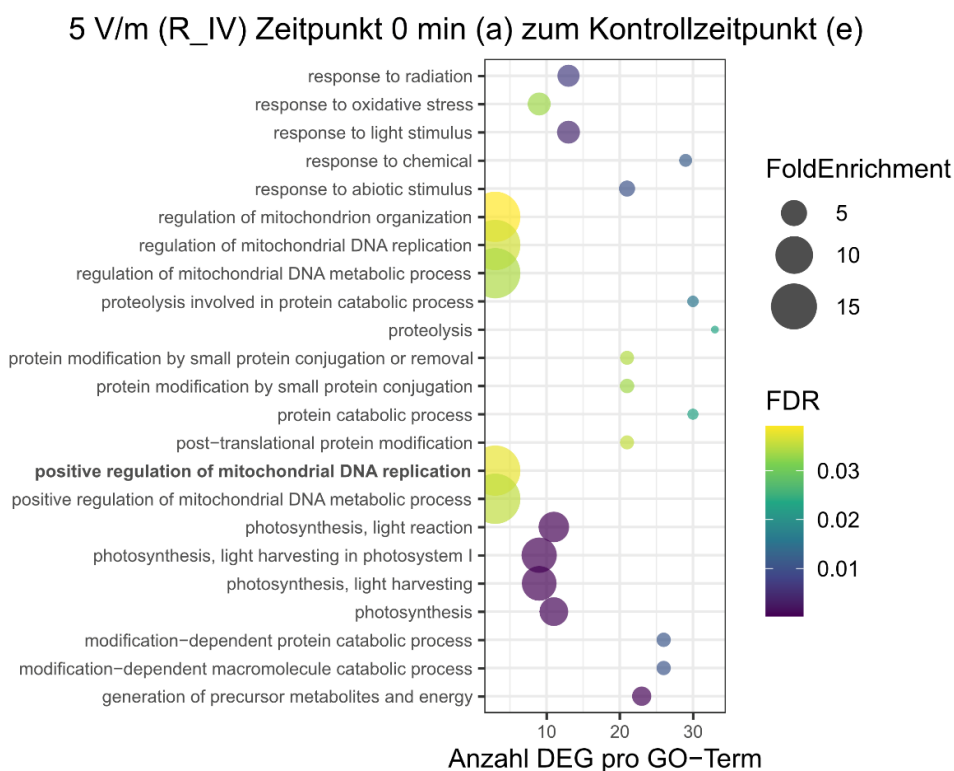


**B** 5 V/m (R\_IV) 60 Minuten nach Exposition (d) zum Kontrollzeitpunkt (e)



**Abbildung 3.14:** Genontologie Analysen (GO-Analysen) für ausgewählte Sets an differenziell exprimierten Genen (DEG). A) GO-Analyse in der Kategorie biologischer Prozess aller Gene, die bei 40 V/m (Szenario I) im Vergleich zur Scheinexposition (0 V/m = Szenario III) ausschließlich zum Zeitpunkt d (60 Minuten nach Expositionsende) differenziell exprimiert sind (siehe auch Hervorhebung durch die grüne Box in Abb. 3.11A). B) GO-Analyse in der Kategorie biologischer Prozess aller Gene, die bei 5 V/m zum Zeitpunkt d (60 Minuten nach Expositionsende) im Vergleich zum Kontrollzeitpunkt (Zeitpunkt e = vor Exposition) differenziell exprimiert sind. Die Größe der Kreise in A und B gibt die Anreicherung der in unseren Datensätzen detektierten Gene zu dem jeweiligen biologischen Prozess im Vergleich zur Anzahl der im Genom vorkommenden Gene zum jeweiligen biologischen Prozess an. Die Farbe der Kreise zeigt die statistische Signifikanz (FDR) der Anreicherung. Der Datensatz in A wurde vorab nach *FoldEnrichment* > 2,8 gefiltert. In B sind alle detektierten GO-Terme visualisiert. BP = Biologischer Prozess, DEG = differenziell exprimierte Gene, FDR = *False Discovery Rate*, GO = Genontologie.

Die überrepräsentierten biologischen Prozesse in der differentiellen Genliste der 5 V/m Exposition zum Zeitpunkt 0 Minuten nach Exposition im Vergleich zur unexponierten Kontrolle (Zeitpunkt e) sind in Abbildung 3.15 dargestellt. Hier tauchten auch die Begriffe „Antwort auf Lichtstimulus“ (*response to light stimulus*) und „Antwort auf Strahlung“ (*response to radiation*) auf. Zusätzlich erschienen Begriffe wie „positive regulation of mitochondrial DNA replication“, „Photosynthese“, und „Antwort auf oxidativen Stress“ als statistisch überrepräsentiert. Zellzyklus-relevante Gene, die in der Liste der differentiell exprimierten Gene zwischen 40 V/m und 0 V/m auftraten (Abb. 3.14), wurden hier nicht detektiert.



**Abbildung 3.15:** Genontologie Analysen (GO-Analysen) der differentiell exprimierten Gene (DEG) zum Zeitpunkt 0 Minuten nach Exposition (Zeitpunkt a) in der 5 V/m Exposition (Szenario R\_IV) im Vergleich zur unexponierten Kontrolle (Zeitpunkt e). Dargestellt ist die GO-Analyse in der Kategorie biologischer Prozess. Die Größe der Kreise zeigt die Anreicherung der in unserem Datensatz detektierten Gene zu dem jeweiligen biologischen Prozess im Vergleich zur Anzahl der im Genom vorkommenden Gene zum jeweiligen biologischen Prozess. Die Farbe der Kreise zeigt die statistische Signifikanz (FDR) der Anreicherung. Der Datensatz wurde vorab nach *FoldEnrichment* > 2,0 gefiltert. BP = Biologischer Prozess, DEG = differentiell exprimierte Gene, FDR = *False Discovery Rate*, GO = Genontologie.

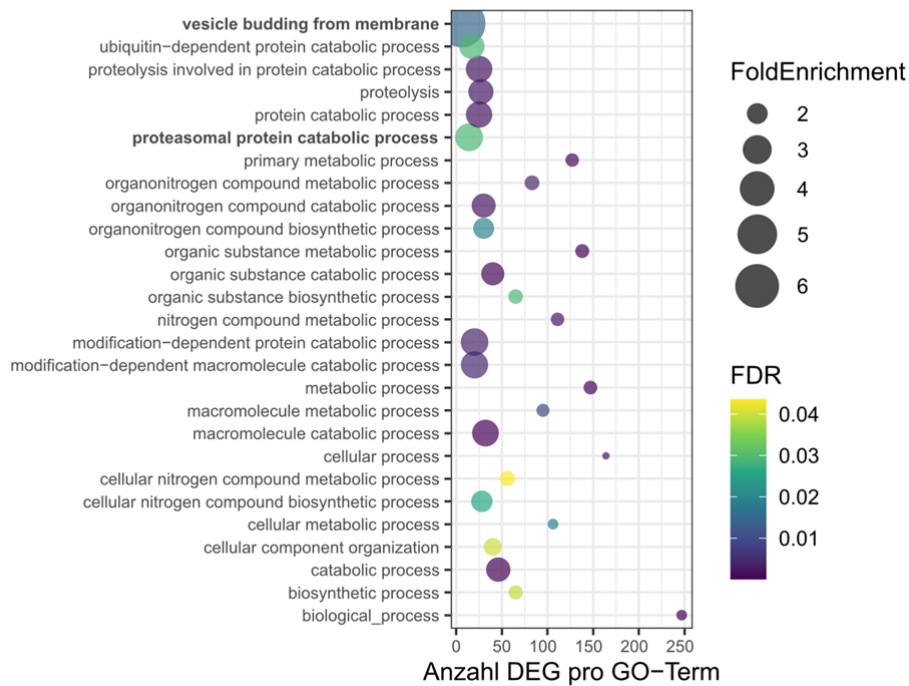
Die Gene, die in die Kategorie „*positive regulation of mitochondrial DNA replication*“ fielen, sind in Tabelle 3.15 aufgelistet.

**Tabelle 3.15:** Liste an Genen, die in Szenario R\_IV (5 V/m) 0 Minuten nach Expositionsende zum Kontrollzeitpunkt (Zeitpunkt e) differenziell exprimiert sind und der signifikant angereicherten Genontologie GO:00090297 (*positive regulation of mitochondrial DNA replication*) zugeordnet werden können. FC = *fold change*, GO = Genontologie, min = Minuten.

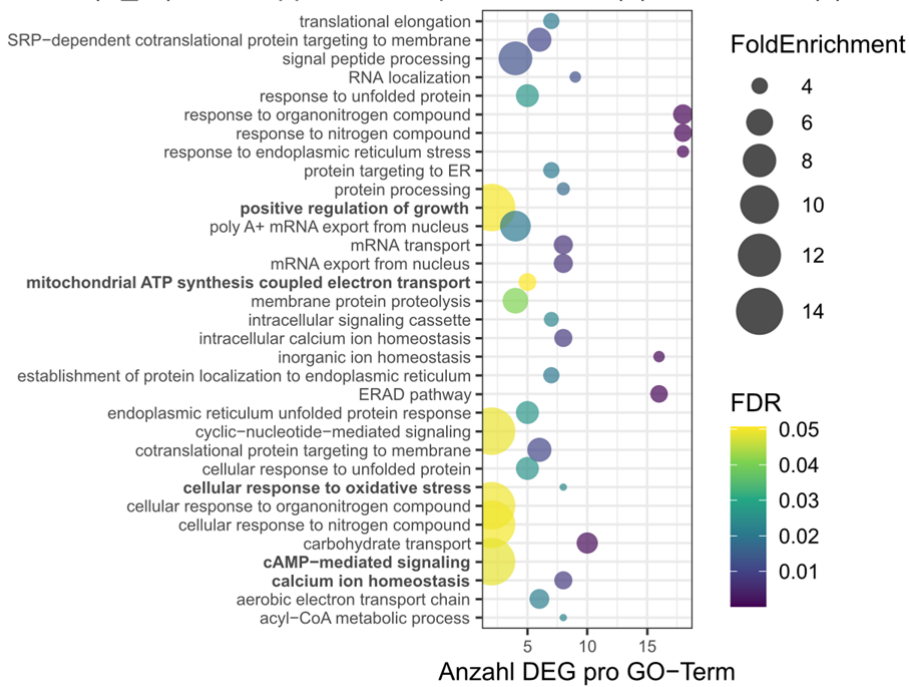
GO-Term	Gene	Annotation	logFC_0min (a)
GO: 0090297 positive regulation of mitochondrial DNA replication	Solyc12g038370	nucleic acid-binding, ob-fold-like protein	2.16
	Solyc09g007430	protein osb4, chloroplastic	-1.32
	Solyc09g065840	single-stranded dna-binding protein, mitochondrial	-1.11

Die Genontologie-Analysen der differenziell exprimierten Gene der 5 V/m Exposition (R\_IV), die entweder sowohl nach 0 Minuten, nach 15 Minuten, und nach 30 Minuten differenziell exprimiert waren oder die nur nach 15 Minuten und nach 30 Minuten differenziell exprimiert waren (zur Klärung der Genlisten siehe auch Abb. 3.12A) sind in Abbildung 3.16 dargestellt.

**A** 5 V/m (R\_IV): Überlapp Zeitpunkt 0 min (a), 15 min (b), und 30 min (c)



**B** 5 V/m (R\_IV): Überlapp DEG Zeitpunkt 15 min (b) und 30 min (c)



**Abbildung 3.16:** Genontologie Analysen (GO-Analysen) für ausgewählte Sets an differenziell exprimierten Genen. A) GO-Analyse in der Kategorie biologischer Prozess aller Gene, die bei 5 V/m (Szenario R\_IV) sowohl nach 0 Minuten (Zeitpunkt a), nach 15 Minuten (Zeitpunkt b), und nach 30 Minuten (Zeitpunkt c) differenziell exprimiert sind im Vergleich zur unexponierten Kontrolle (Zeitpunkt e). B) GO-Analyse in der Kategorie biologischer Prozess aller Gene, die bei 5 V/m (Szenario R\_IV) sowohl nach 15 Minuten (Zeitpunkt b) als auch nach 30 Minuten (Zeitpunkt c) differenziell exprimiert sind im Vergleich zur unexponierten Kontrolle (Zeitpunkt e). Die Größe der Kreise in A und B gibt die Anreicherung der in unseren Datensätzen detektierten Gene zu dem jeweiligen biologischen Prozess im Vergleich zur Anzahl der im Genom vorkommenden Gene zum jeweiligen biologischen Prozess wieder. Die Farbe der Kreise zeigt die statistische Signifikanz (FDR) der Anreicherung. Der Datensatz in B wurde vorab nach *FoldEnrichment* > 3,4 gefiltert. In A sind alle detektierten GO-Terme visualisiert. BP = Biologischer Prozess, DEG = differenziell exprimierte Gene, FDR = *False Discovery Rate*, GO = Genontologie.

Gerade die Gene, die sowohl 15 Minuten als auch 30 Minuten nach der 5 V/m Exposition (Szenario R\_IV) differenziell exprimiert waren, waren biologischen Prozessen, wie „zelluläre Antwort auf oxidativen Stress“ (*cellular response to oxidative stress* = GO:0034599), „positive Regulierung von Wachstum“ (*positive regulation of growth* = GO:0045927), „cAMP-vermittelte Signalprozesse“ (*cAMP mediated signaling* = GO: 0019933), „Kalzium-Ionen Homöostase“ (*calcium ion homeostasis* = GO: 0055074), und „An mitochondrialem ATP-gekoppelter Elektronentransport“ (*mitochondrial ATP synthesis coupled electron transport* = GO:0042775) zuzuordnen. Die einzelnen Gene, die unter diese Prozesse fallen, sind in Tabelle 3.16 aufgelistet. Für genaue Definitionen der einzelnen GO-Terme sei auf die Webseite QuickGo verwiesen ([Link zur QuickGO Webseite](#)).

**Tabelle 3.16:** Liste an Genen, die in Szenario R\_IV (5 V/m) 15 Minuten und 30 Minuten nach Expositionsende zum Kontrollzeitpunkt (Zeitpunkt e) differenziell exprimiert sind und den signifikant angereicherten Genontologien GO:0045927 (*positive regulation of growth*), GO:0019933 (*cAMP mediated signaling*), GO:0055074 (*calcium ion homeostasis*), GO:0042775 (*mitochondrial ATP synthesis coupled electron transport*), und GO:0034599 (*cellular response to oxidative stress*) zugeordnet werden können. FC = *fold change*, GO = Genontologie, min = Minuten.

GO-Term	Gen	Annotation	logFC_15min (b)	logFC_30min (c)
GO:0045927 positive regulation of growth	Solyc09g014780	Regulatory-associated protein of mtor	1.489716939	1.406325043
	Solyc10g076270	Regulatory-associated protein of mtor	1.17705635	1.021073376
GO:0019933 cAMP mediated signaling	Solyc10g051340	Adenylyl cyclase-associated protein	1.226190501	1.201329022
	Solyc01g109580	Cyclase-associated protein 1-like	1.576738434	1.601164166
GO:0055074 calcium ion homeostasis	Solyc06g006110	Vacuolar cation_proton exchanger	-1.543066476	-1.464238139
	Solyc03g006260	EF-hand domain-containing protein	-1.343361168	-1.407404506
	Solyc08g081770	Protein pam71	1.400889558	1.558162646
	Solyc10g083200	Calcium homeostasis endoplasmic reticulum protein	1.528659362	1.353171405
	Solyc06g082780	Calcium uniporter protein	-1.237457409	-1.002282445
	Solyc02g014560	Calcium uptake protein 1	-1.147108252	-1.341604832
	Solyc12g014110	Sodium_calcium exchanger membrane region domain- containing protein	1.543842818	1.296861812
	Solyc01g096830	Endoplasmic reticulum transmembrane helix translocase	1.080008399	1.097269498

GO-Term	Gen	Annotation	logFC_15min (b)	logFC_30min (c)
GO:0042775 mitochondrial ATP synthesis coupled electron transport	Solyc02g093900	Cytochrome c1-2	1.387712171	1.398785752
	Solyc11g039840	Cytochrome b-c1 complex subunit rieske-1 mitochondrial related	1.141447531	1.322260349
	Solyc12g042900	Cytochrome c oxidase subunit 5b-like	1.090611655	1.332247351
	Solyc03g097010	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 6	1.364992338	1.279329082
	Solyc12g042920	Cytochrome c domain- containing protein	1.31823563	1.4688003
GO:0034599 cellular response to oxidative stress	Solyc02g063250	Peptide-methionine (s)-s- oxide reductase	-1.483094916	-1.387269829
	Solyc03g062890	Superoxide dismutase [cu- zn] 3	1.619272672	1.470986412
	Solyc09g007270	L-ascorbate peroxidase 2 cytosolic	2.072610098	2.215083185
	Solyc06g005160	Cytosolic ascorbate peroxidase 1	1.36228454	1.427096912
	Solyc06g060260	L-ascorbate peroxidase s chloroplastic	-1.32920343	-1.171816754
	Solyc02g083620	L-ascorbate peroxidase 5 peroxisomal	1.169172937	1.103234984
	Solyc08g079830	Copper chaperone for superoxide dismutase	1.213423659	1.221840311
	Solyc07g020860	Peroxiredoxin-2a-related	1.476721521	1.704034072

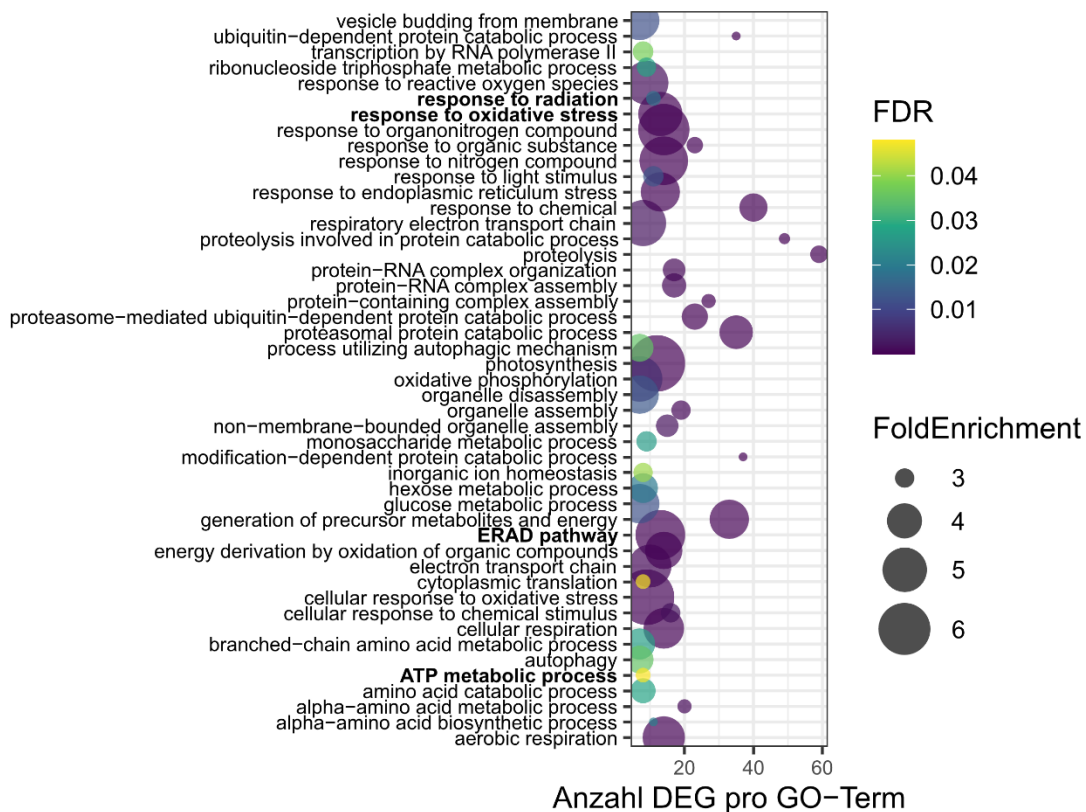
Die Analyse der überrepräsentierten biologischen Prozesse der Gene, die als differenziell zwischen mechanischem Stress und der Scheinexposition zum Zeitpunkt 15 Minuten nach Stressende detektiert wurden, ergab keine Treffer. Dies ist allerdings nicht verwunderlich, da diese Genliste nur 209 Gene abdeckte. Eine manuelle Annotation der Genliste (auch über die Panther-Datenbank) zeigte allerdings, dass viele der hier gelisteten Gene mit mechanischer Verwundung in der Literatur in Verbindung gebracht wurden (Bowles, 1998; Wasternack et al., 2006), sodass die Positivkontrolle zwar schwach ausfiel, aber durchaus funktioniert hat.

### 3.2.5.3.7. Gen-Ontologie-Analyse für die Zeitverlaufsanalyse

#### (3.2.5.3.3)

GO-Analysen wurden auch für die differenziell exprimierten Gene aus der Zeitverlaufsanalyse (siehe 3.2.5.3.3) durchgeführt. In den Abbildungen 3.17 bis 3.19 sind die Ergebnisse für Szenario R\_IV (Zeitverlauf 1, 2, und 3, siehe dazu auch Abb. 3.9) gezeigt. In den anderen Szenarien konnten keine statistisch überrepräsentierten GO-Terme ermittelt werden, was auf die geringe Anzahl an differenziell exprimierten Genen in den Zeitverläufen der anderen Szenarien zurückzuführen ist. Ähnliches gilt für die differenziell exprimierten Gene aller Expositionsszenarien für den Zeitverlauf 4. Für die GO-Analyse wurde erneut die Panther-Datenbank verwendet und das ggplot2-Paket aus R für die Visualisierung benutzt.

#### R\_IV Zeitverlauf1 (GO-Biologischer Prozess)



**Abbildung 3.17:** Genontologie Analysen (GO-Analysen) der in der 5 V/m Exposition (R\_IV) mindestens zu Zeitpunkt a (0 Minuten nach Expositionsende) differenziell exprimierten Gene (Zeitverlauf 1). Dargestellt sind ausgewählte GO-Terme in der Kategorie biologischer Prozess (BP). Die Größe der Kreise gibt die Anreicherung der in unserem Datensatz detektierten Gene zu dem jeweiligen biologischen Prozess im Vergleich zur Anzahl der im Genom vorkommenden Gene zum jeweiligen biologischen Prozess wieder. Die Farbe der Kreise zeigt die statistische Signifikanz (FDR) der Anreicherung. Der Datensatz wurde vorab nach *FoldEnrichment* > 2,8 und Genanzahl > 6 gefiltert. BP = Biologischer Prozess, DEG = differenziell exprimierte Gene, FDR = *False Discovery Rate*, GO = Genontologie.

In Abbildung 3.17 ist ersichtlich, dass in Zeitverlauf 1 besonders Gene zu finden sind, die den GO-Termen „Antwort auf Strahlung“ (GO:0009314= *response to radiation*), „Antwort auf oxidativen Stress“ ( GO:0006979= *response to oxidative stress*), „ERAD pathway“ (GO:0036503= *Endoplasmatic Reticulum Associated protein Degradation pathway*), und „ATP metabolischer Prozess“ (GO:0046034= *ATP metabolic pathway*) angehören. Die Gene aus Zeitverlauf 1, die unter die genannten GO-Terme fallen, sind in Tabelle 3.17 aufgelistet.

**Tabelle 3.17:** Liste an Genen, die in Szenario R\_IV (5 V/m) dem Zeitverlauf 1 folgen (d.h. Gene, die mindestens am Zeitpunkt 0 Minuten nach Expositionsende differenziell exprimiert sind im Vergleich zur unexponierten Kontrolle = Zeitpunkt e) und den signifikant angereicherten Genontologien GO:0009314 (*response to radiation*), GO:0006979 (*response to oxidative stress*), GO:0036503 (*ERAD pathway*), und GO:0046034 (*ATP metabolic process*) zugeordnet werden können. FC = *fold change*, GO = Genontologie, min = Minuten, DEG = differenziell exprimiertes Gen.

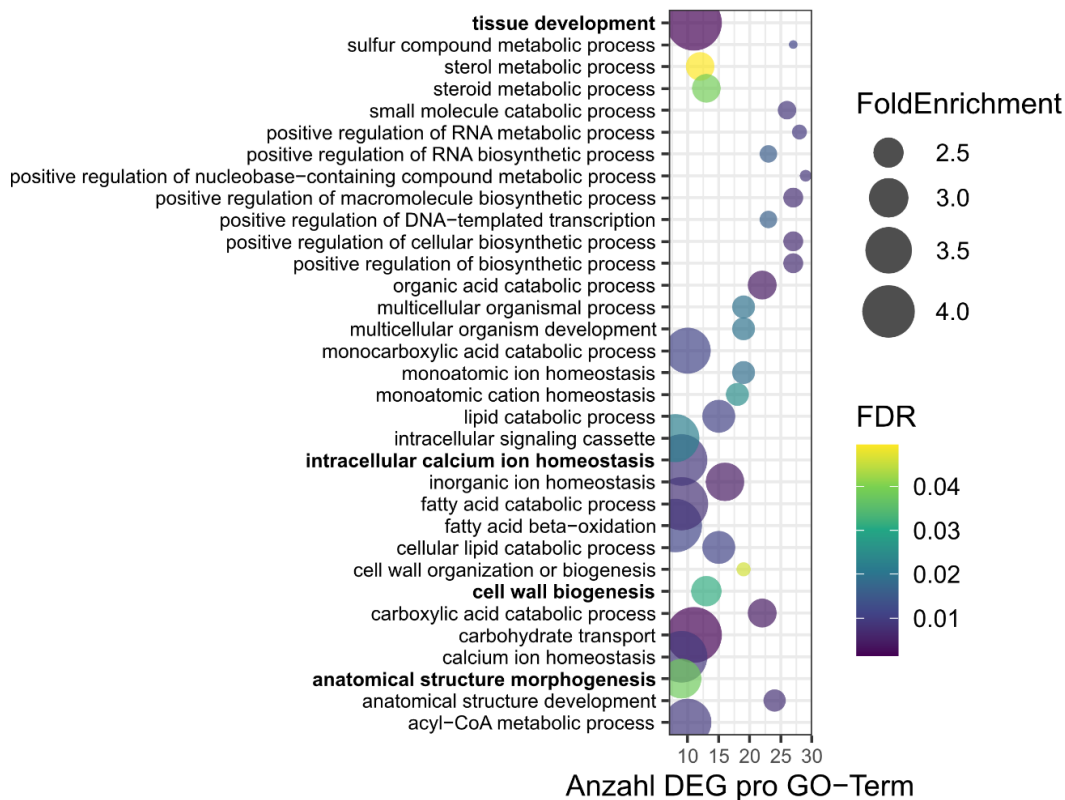
GO-Term	Gen	Gen-Beschreibung	logFC_0min	logFC_15min	logFC_30min	logFC_60min
GO:0009314 response to radiation	Solyc09g014520	Chlorophyll a-b binding protein cp29.1, chloroplastic	2.028	2.175	2.722	3.449
	Solyc05g056050	Chlorophyll a-b binding protein 6, chloroplastic	1.17	1.309	1.457	2.181
	Solyc03g005760	Chlorophyll a-b binding protein 1c, chloroplastic	2.353	1.571	2.546	5.812
	Solyc12g011280	Photosystem i chlorophyll a_b-binding protein 3-1, chloroplastic	1.085	1.478	2.072	1.606
	Solyc07g063600	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	2.413	2.697	3.573	2.998
	Solyc03g115900	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	2.668	2.938	3.293	2.873
	Solyc12g006140	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	1.671	1.591	2.471	3.124
	Solyc07g056670	Gibberellin 2-beta-dioxygenase 1-like	-1.6	kein DEG	kein DEG	kein DEG
	Solyc12g011450	Chlorophyll a-b binding protein 13, chloroplastic	1.608	1.088	1.639	2.41
	Solyc07g047850	Chlorophyll a-b binding protein 4, chloroplastic	1.764	1.365	1.729	3.395

GO-Term	Gen	Gen-Beschreibung	logFC_0min	logFC_15min	logFC_30min	logFC_60min
	Solyc03g005770	Chlorophyll a-b binding protein 1c, chloroplastic	3.19	3.305	4.023	7.242
GO: 0006979 response to oxidative stress	Solyc04g082460	Catalase-2	1.312	1.988	2.115	kein DEG
	Solyc03g093690	Mitochondrial peptide methionine sulfoxide reductase	1.854	2.255	2.256	1.801
	Solyc06g076570	18.1 kda class i heat shock protein	1.289	1.923	1.672	1.002
	Solyc03g112770	Glutaredoxin-c1	1.541	2.027	1.757	1.308
	Solyc01g100630	Catalase-2	1.906	2.158	2.463	1.428
	Solyc03g062890	Superoxide dismutase [cu-zn] 3	1.022	1.647	1.586	kein DEG
	Solyc09g007270	l-ascorbate peroxidase 2, cytosolic	1.788	2.361	2.359	1.429
	Solyc06g005160	Cytosolic ascorbate peroxidase 1	1.409	1.45	1.557	2.205
	Solyc03g111720	Peptide-methionine (s)-s-oxide reductase	1.29	1.42	1.616	2.589
	Solyc06g034020	Peptide-methionine (s)-s-oxide reductase	1.294	1.597	1.276	kein DEG
	Solyc01g067740	Superoxide dismutase [cu-zn]	1.334	1.09	1.253	1.276
	Solyc12g094620	Catalase isozyme 1	1.766	2.297	2.233	1.514
	Solyc01g111510	l-ascorbate peroxidase 3	1.498	2.046	2.054	1.278

GO-Term	Gen	Gen-Beschreibung	logFC_0min	logFC_15min	logFC_30min	logFC_60min
GO: 0036503 ERAD pathway	Solyc07g048120	Ubiquitin fusion degradation ufd1 family protein	1.28	1.907	1.654	1.128
	Solyc06g068700	Calnexin 14d-related	1.531	2.078	2.273	1.096
	Solyc06g074980	Cell division control protein 48 homolog e	1.065	1.502	1.429	kein DEG
	Solyc03g112590	Cell division control protein 48 homolog a-like	1.486	2.182	2.112	kein DEG
	Solyc02g080380	Derlin-2.2	1.261	1.588	1.495	1.23
	Solyc02g065540	Ring-type e3 ubiquitin transferase	1.319	1.559	1.526	1.44
	Solyc08g008510	Plant ubx domain-containing protein 10-like	1.092	1.351	1.446	1.083
	Solyc08g082820	Luminal-binding protein	1.361	2.031	2.21	kein DEG
	Solyc08g082970	Fas-associated factor 2	1.283	1.807	1.717	1.595
	Solyc01g100380	Calreticulin	2.263	3.075	3.047	1.298
	Solyc10g084050	Cell division cycle protein 48 homolog	1.784	2.403	2.327	1.527
	Solyc10g006960	E3 ubiquitin-protein ligase rma	1.235	1.192	kein DEG	kein DEG
Solyc01g109940	26s proteasome regulatory subunit 10b	1.14	1.626	1.596	kein DEG	
GO: 0046034 ATP metabolic process	Solyc06g071920	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1.398	2.039	2.496	kein DEG

GO-Term	Gen	Gen-Beschreibung	logFC_0min	logFC_15min	logFC_30min	logFC_60min
	Solyc03g095190	ATP synthase subunit delta, mitochondrial	1.274	1.197	1.582	1.817
	Solyc03g121070	Hexokinase-1	1.07	1.796	1.849	kein DEG
	Solyc06g005490	Os01g0841600 protein	1.204	1.689	1.728	0.913
	Solyc05g008600	Fructose-bisphosphate aldolase	4.461	4.45	5.189	4.791
	Solyc04g007550	ATP synthase subunit beta-1, mitochondrial-related	1.422	1.899	2.197	1.172
	Solyc04g011510	Triosephosphate isomerase, cytosolic	1.616	2.273	2.429	1.737
	Solyc03g111010	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1.72	2.237	2.011	1.468

## R\_IV Zeitverlauf2 (GO-Biologischer Prozess)



**Abbildung 3.18:** Genontologie Analysen (GO-Analysen) der in der 5 V/m Exposition (R\_IV) mindestens zu Zeitpunkt b (15 Minuten nach Expositionsende) differenziell exprimierten Gene (Zeitverlauf 2). Dargestellt sind ausgewählte GO-Terme in der Kategorie biologischer Prozess (BP). Die Größe der Kreise gibt die Anreicherung der in unserem Datensatz detektierten Gene zu dem jeweiligen biologischen Prozess im Vergleich zur Anzahl der im Genom vorkommenden Gene zum jeweiligen biologischen Prozess wieder. Die Farbe der Kreise zeigt die statistische Signifikanz (FDR) der Anreicherung. Der Datensatz wurde vorab nach *FoldEnrichment* > 2,0 und Genanzahl > 6 gefiltert. BP = Biologischer Prozess, DEG = differenziell exprimierte Gene, FDR = *False Discovery Rate*, GO = Genontologie.

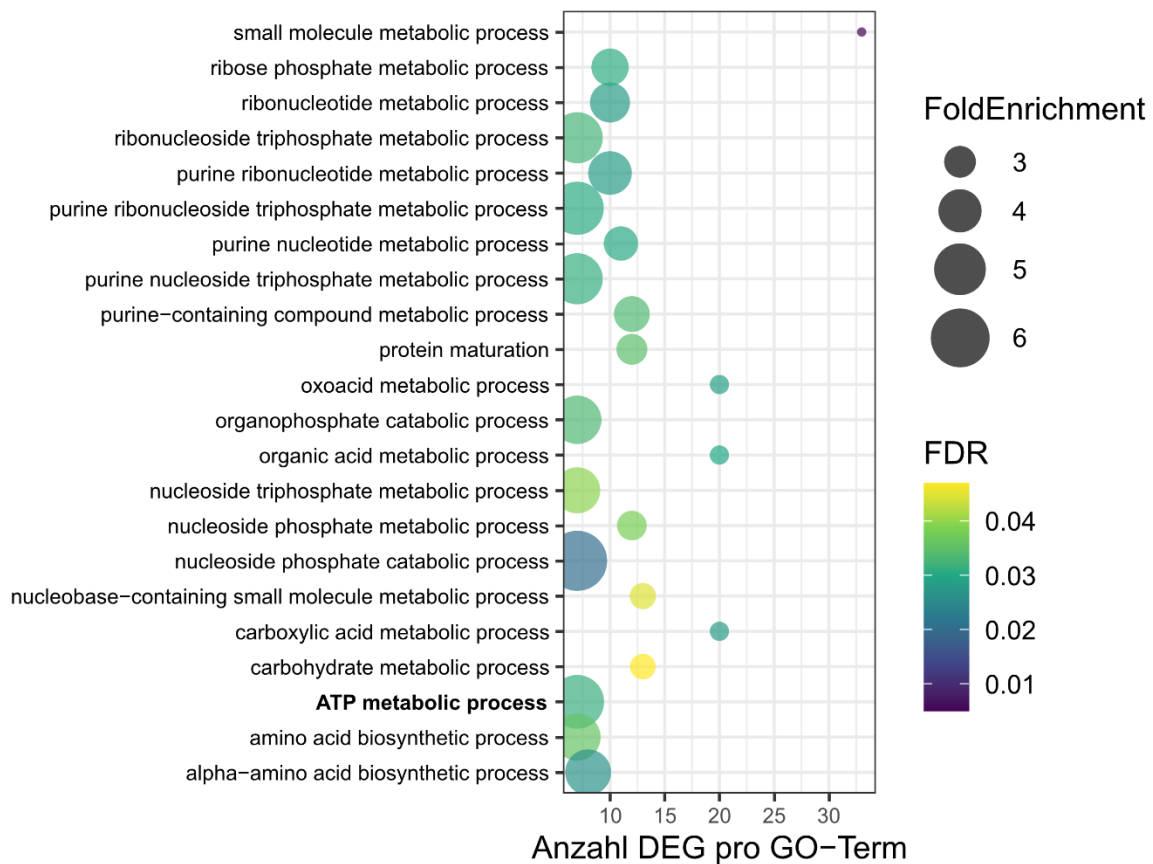
Im Zeitverlauf 2 der 5 V/m Exposition (Szenario R\_IV) sind Gene zu finden, die beispielsweise den GO-Termen "Gewebeentwicklung" (GO:0009888 = *tissue development*), „Intrazelluläre Kalzium-Ionen Homöostase“ (GO:0006874 = *intracellular calcium ion homeostasis*), „Zellwand-Biogenese“ (GO: 0042546 = *cell wall biogenesis*), und „Morphogenese anatomischer Strukturen“ (GO:0009653 = *anatomical structure morphogenesis*) zuzuordnen sind (Abb. 3.18). Die einzelnen Gene aus unserem Datensatz, die diesen biologischen Prozessen zuzuordnen sind, sind in Tabelle 3.18 gelistet.

**Tabelle 3.18:** Liste an Genen, die in Szenario R\_IV (5 V/m) dem Zeitverlauf 2 folgen (d.h. Gene, die mindestens zum Zeitpunkt 15 Minuten nach Expositionsende differenziell exprimiert sind im Vergleich zur unexponierten Kontrolle = Zeitpunkt e) und den signifikant angereicherten Genontologien GO:0009888 (*tissue development*), GO:0006874 (*intracellular calcium ion homeostasis*), GO:0042546 (*cell wall biogenesis*), und GO: 0009653 (*anatomical structure morphogenesis*) zugeordnet werden können. FC = *fold change*, GO = Genontologie, min = Minuten, DEG = differenziell exprimiertes Gen.

GO-Term	Gen	Gen-Beschreibung	logFC_0min	logFC_15min	logFC_30min	logFC_60min
GO:0009888 tissue development	Solyc09g065590	Van3-binding protein-like	kein DEG	-1.04	-1.126	kein DEG
	Solyc08g015940	Epidermal patterning factor-like protein	kein DEG	1.553	kein DEG	kein DEG
	Solyc09g091760	Transcription factor fama-like isoform x1	kein DEG	-2.131	-2.265	kein DEG
	Solyc08g078500	Van3-binding protein-like	kein DEG	-1.385	-1.428	kein DEG
	Solyc07g047780	Protein oberon 2-like	kein DEG	1.115	1.055	kein DEG
	Solyc01g080050	Transcription factor mute	kein DEG	-1.046	kein DEG	kein DEG
	Solyc04g077170	Epidermal patterning factor-like protein	kein DEG	-1.532	-2.038	kein DEG
	Solyc04g072490	Epidermal patterning factor-like protein 7-related	kein DEG	-1.501	-1.408	kein DEG
	Solyc07g008205	Epidermal patterning factor-like protein	kein DEG	-1.925	-2.296	kein DEG
	Solyc03g121790	Epidermal patterning factor-like protein	kein DEG	-2.618	-1.965	-1.528
Solyc01g087490	Protein oberon 4	kein DEG	1.291	1.172	kein DEG	
GO:0006874 intracellular calcium ion homeostasis	Solyc06g006110	Vacuolar cation_proton exchanger	kein DEG	-1.479	-1.313	kein DEG
	Solyc03g006260	EF-hand domain-containing protein	kein DEG	-1.278	-1.25	kein DEG
	Solyc11g013100	Selenoprotein k	kein DEG	-1.476	-1.815	kein DEG
	Solyc10g083200	Calcium homeostasis endoplasmic reticulum protein	kein DEG	1.527	1.462	kein DEG
	Solyc11g008890	GDT1-like protein 3	kein DEG	1.02	1.046	kein DEG
	Solyc06g082780	Calcium uniporter protein, mitochondrial	kein DEG	-1.191	kein DEG	kein DEG
	Solyc02g014560	Calcium uptake protein 1, mitochondrial	kein DEG	-1.112	-1.214	kein DEG
	Solyc01g096830	Endoplasmic reticulum transmembrane helix translocase	kein DEG	1.143	1.241	kein DEG
Solyc11g072880	Calcium-transporting atpase 1, endoplasmic reticulum-type-related	kein DEG	1.088	1.06	kein DEG	
GO:0042546	Solyc03g114890	Cobra-like protein	kein DEG	1.557	kein DEG	kein DEG

GO-Term	Gen	Gen-Beschreibung	logFC_0min	logFC_15min	logFC_30min	logFC_60min
cell wall biogenesis	Solyc11g031950	Glucuronoxylan 4-o-methyltransferase 2-related	kein DEG	-1.428	-1.41	kein DEG
	Solyc07g053530	Fasciclin-like arabinogalactan protein 13-related	kein DEG	-1.604	-1.552	kein DEG
	Solyc08g076320	Cellulose synthase-like protein d3	kein DEG	1.018	1.123	kein DEG
	Solyc09g007660	Fasciclin-like arabinogalactan protein 12	kein DEG	-1.132	kein DEG	kein DEG
	Solyc07g005840	Cellulose synthase a catalytic subunit 7 [udp-forming]	kein DEG	1.272	1.301	kein DEG
	Solyc07g051820	Cellulose synthase-like protein b1-related	kein DEG	-1.249	-1.419	kein DEG
	Solyc08g082670	Cellulose synthase-like protein g1-related	kein DEG	-1.377	-1.548	kein DEG
	Solyc01g103360	Glucuronoxylan 4-o-methyltransferase 1	kein DEG	-1.079	-1.055	kein DEG
	Solyc01g067520	Cellulose synthase-like protein d4	kein DEG	-2.462	-3.188	-4.23
	Solyc11g069250	Fasciclin-like arabinogalactan protein 11	kein DEG	-1.201	-1.036	kein DEG
	Solyc09g007420	Beta-1,4-xylosyltransferase irx9	kein DEG	-1.513	-1.305	kein DEG
	Solyc03g097050	Cellulose synthase-like protein d3	kein DEG	1.592	2.184	kein DEG
GO:0009653 anatomical structure morphogenesis	Solyc08g015940	Epidermal patterning factor-like protein	kein DEG	1.553	kein DEG	kein DEG
	Solyc03g006880	Gibberellin 20 oxidase 1	kein DEG	-1.24	kein DEG	kein DEG
	Solyc07g047780	Protein oberon 2-like	kein DEG	1.115	1.055	kein DEG
	Solyc04g077170	Epidermal patterning factor-like protein	kein DEG	-1.532	-2.038	kein DEG
	Solyc04g072490	Epidermal patterning factor-like protein 7-related	kein DEG	-1.501	-1.408	kein DEG
	Solyc07g008205	Epidermal patterning factor-like protein	kein DEG	-1.925	-2.296	kein DEG
	Solyc03g121790	Epidermal patterning factor-like protein	kein DEG	-2.618	-1.965	-1.528
	Solyc01g087490	Protein oberon 4	kein DEG	1.291	1.172	kein DEG
Solyc03g046450	Protein furry homolog isoform x1	kein DEG	1.056	1.105	kein DEG	

## R\_IV Zeitverlauf3 (GO-Biologischer Prozess)



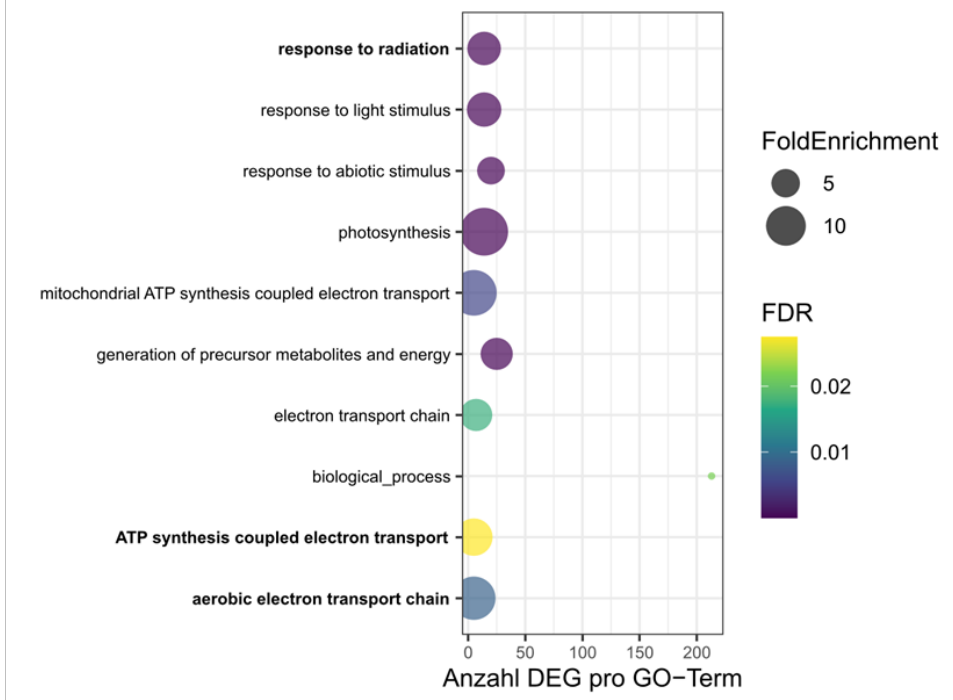
**Abbildung 3.19:** Genontologie Analysen (GO-Analysen) der in der 5 V/m Exposition (R\_IV) mindestens zu Zeitpunkt c (30 Minuten nach Expositionsende) differenziell exprimierte Gene (Zeitverlauf 3). Dargestellt sind ausgewählte GO-Terme in der Kategorie biologischer Prozess (BP). Die Größe der Kreise gibt die Anreicherung der in unserem Datensatz detektierten Gene zu dem jeweiligen biologischen Prozess im Vergleich zur Anzahl der im Genom vorkommenden Gene zum jeweiligen biologischen Prozess wieder. Die Farbe der Kreise zeigt die statistische Signifikanz (FDR) der Anreicherung. Der Datensatz wurde vorab nach *FoldEnrichment* > 2,0 und Genanzahl > 6 gefiltert. BP = Biologischer Prozess, DEG = differenziell exprimierte Gene, FDR = *False Discovery Rate*, GO = Genontologie.

Im Zeitverlauf 3 der 5 V/m Exposition (Szenario R\_IV) waren Gene zu finden, die unter anderem im GO-Term „ATP metabolischer Prozess“ (GO:0046034 = *ATP metabolic pathway*) angereichert waren.

Zusätzlich wurden auch die aus dem *MultiRNAFlow*-Paket ermittelten Signatur-Gene aus Szenario R\_IV (5 V/m) mittels GO-Analyse klassifiziert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.20 dargestellt. Ein Gen wird als Signatur-Gen für ein Szenario zu einem bestimmten Zeitpunkt *i* definiert, wenn es spezifisch für das Szenario ist und zu dem Zeitpunkt *i* differenziell exprimiert zum Kontrollzeitpunkt (Zeitpunkt e) ist (zur Definition der Signatur-Gene siehe 3.2.5.3.3). Für die GO-Analyse wurden die Signatur-Gene aller Zeitpunkte zusammengefasst.

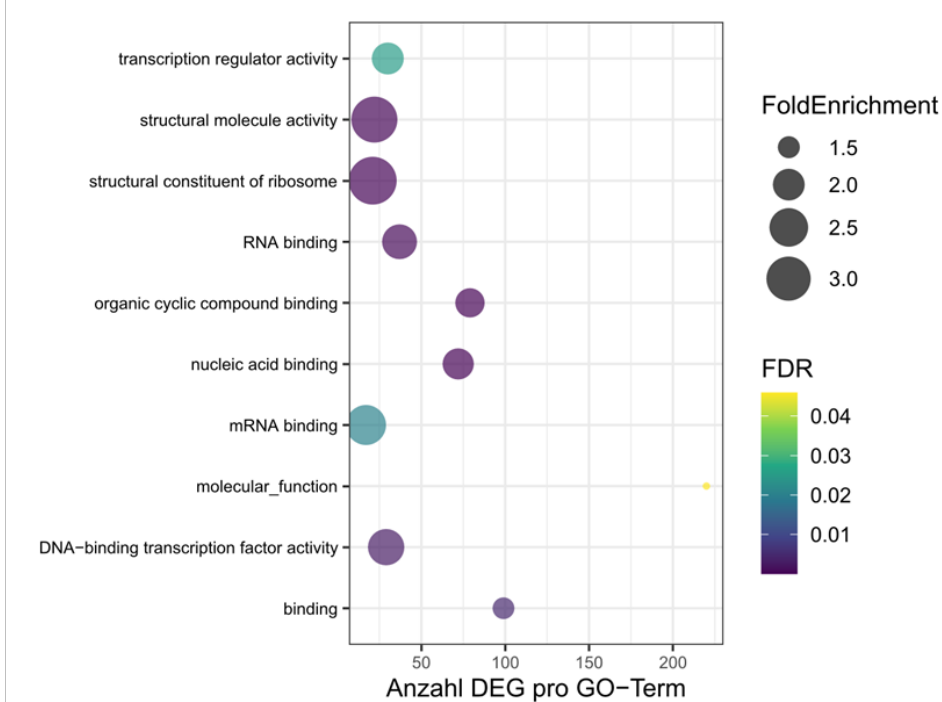
**A**

R\_IV Signature Genes (GO-Biologischer Prozess)



**B**

R\_IV Signature Genes (GO-Molekulare Funktion)



**Abbildung 3.20:** Genontologie Analysen (GO-Analysen) der 5 V/m Exposition (R\_IV) Signatur-Gene (*Signature-Genes*). Ein Gen wird als Signatur-Gen für ein Szenario zu einem bestimmten Zeitpunkt *i* definiert, wenn es spezifisch für das Szenario ist und zu dem Zeitpunkt *i* differenziell exprimiert zum Kontrollzeitpunkt (Zeitpunkt *e*) ist. A) GO-Terme in der Kategorie biologischer Prozess (BP). B) GO-Terme in der Kategorie molekulare Funktion. Die Größe der Kreise in A und B gibt die Anreicherung der in unserem Datensatz detektierten Gene zu dem jeweiligen biologischen Prozess beziehungsweise zur molekularen Funktion im Vergleich zur Anzahl der im Genom vorkommenden Gene zum jeweiligen biologischen Prozess/zur molekularen Funktion wieder. Die Farbe der Kreise in A und B zeigt die statistische Signifikanz (FDR) der Anreicherung. BP = Biologischer Prozess, DEG = differenziell exprimierte Gene, FDR = *False Discovery Rate*, GO = Genontologie, MF = molekulare Funktion.

Auch bei den Signatur-Genen wurden biologische Prozesse als angereichert detektiert, die einer „Antwort auf Strahlung“ (GO:0009314 = *response to radiation*) und verschiedenen GO-Termen zum Elektronentransport (GO: 0019646 = *aerobic electron transport chain* und GO: 0042773 = *ATP synthesis coupled electron transport*) zugeordnet werden können. Die einzelnen Gene dieser GO-Kategorien sind in Tabelle 3.19 aufgeführt.

**Tabelle 3.19:** Liste an Genen, die zu den Signatur-Genen gehören (Definition siehe Text) und den signifikant angereicherten GO-Termen GO:0009314 (*response to radiation*), GO:0019646 (*aerobic electron transport chain*), und GO:0042773 (*ATP synthesis coupled electron transport*) zugeordnet werden können. FC = *fold change*, GO = Genontologie, min = Minuten.

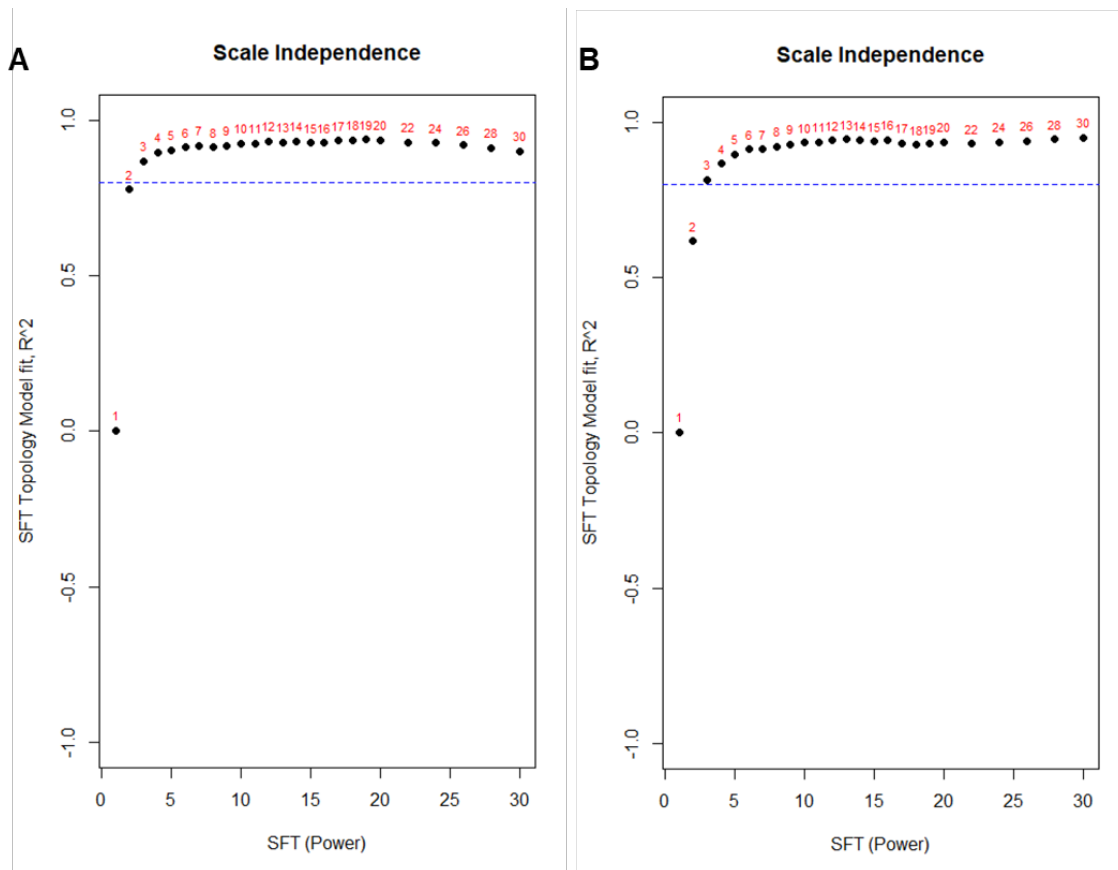
GO-Term	Gen	Gen-Beschreibung	logFC_0min	logFC_15min	logFC_30min	logFC_60min
GO:0009314 response to radiation	Solyc09g014520	Chlorophyll a-b binding protein cp29.1, chloroplastic	2.028	2.175	2.722	3.449
	Solyc05g056050	Chlorophyll a-b binding protein 6, chloroplastic	1.17	1.309	1.457	2.181
	Solyc01g105050	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	kein DEG	kein DEG	kein DEG	1.618
	Solyc03g005760	Chlorophyll a-b binding protein 1c, chloroplastic	2.353	1.571	2.546	5.812
	Solyc01g105030	Chlorophyll a-b binding protein cp24 10a, chloroplastic	kein DEG	kein DEG	1.118	3.407
	Solyc12g011280	Photosystem i chlorophyll a_b-binding protein 3-1, chloroplastic	1.085	1.478	2.072	1.606
	Solyc07g063600	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	2.413	2.697	3.573	2.998
	Solyc02g069510	Protein light-dependent short hypocotyls 4- like	kein DEG	-1.968	-4.24	2.331
	Solyc08g067320	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	kein DEG	kein DEG	kein DEG	1.059
	Solyc10g006230	Photosystem i chlorophyll a_b-binding protein 2, chloroplastic	kein DEG	1.253	1.593	1.619
	Solyc12g006140	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	1.671	1.591	2.471	3.124

GO-Term	Gen	Gen-Beschreibung	logFC_0min	logFC_15min	logFC_30min	logFC_60min
	Solyc12g011450	Chlorophyll a-b binding protein 13, chloroplastic	1.608	1.088	1.639	2.41
	Solyc07g047850	Chlorophyll a-b binding protein 4, chloroplastic	1.764	1.365	1.729	3.395
	Solyc03g005770	Chlorophyll a-b binding protein 1c, chloroplastic	3.19	3.305	4.023	7.242
GO:0019646 aerobic electron transport chain + GO:0042773 ATP synthesis coupled electron transport	Solyc11g039840	Cytochrome b-c1 complex subunit rieske-1, mitochondrial-related	1.148	1.272	1.6	1.337
	Solyc12g042900	Cytochrome c oxidase subunit 5b-like	kein DEG	1.139	1.569	1.428
	Solyc11g068400	Cytochrome b-c1 complex subunit 9	-1.182	-2.016	-2.003	kein DEG
	Solyc03g097010	Nadh dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 6, mitochondrial	1.104	1.413	1.45	1.225
	Solyc12g042920	Cytochrome c domain-containing protein	1.164	1.37	1.633	1.641

### 3.2.5.3.8. Weighted gene co-expression network analysis (WGCNA)

Um die Transkriptom-weite Beziehung aller Gene in den untersuchten Exposition- und Stressszenarien zu verstehen wurden zusätzlich gewichtete Genexpressionsnetzwerk-Analysen (*weighted gene co-expression network analysis* = WGCNA) durchgeführt. In der WGCNA wird ganz allgemein das Ziel verfolgt, Gene zu finden, die ähnliche Expressionsmuster aufweisen. Diese Gene werden dann in Module gruppiert. Gene, die stark miteinander korrelieren, werden also Teil eines spezifischen Moduls, was bedeutet, dass sie wahrscheinlich ähnliche biologische Funktionen haben oder in ähnlichen Prozessen involviert sind. Eine WGCNA dient somit als ergänzende Analyse zur differentiellen Genexpressionsanalyse und ermöglicht ein systemweites Verständnis von Expressionsmustern. Für unsere WGCNA wurden die gut vergleichbaren Datensätze der Szenarien I, II, und III verwendet. Es wurden insgesamt zwei WGCN-Analysen durchgeführt, einmal mit den Datensätzen I (40 V/m) und III (0 V/m), und einmal mit II (mechanischer Stress) und III (0 V/m). Eine solche Aufteilung der Datensätze wurde auch erfolgreich in Klaus et al. (2024) angewandt. Für die Implementierung wurde das R-Paket WGCNA (Version 1.73) verwendet (Langfelder and Horvath, 2008). Die *Gen-Counts* der RNA-Sequenzierung wurden prozessiert und gefiltert, sodass nur Gene mit mindestens 50 *reads* analysiert wurden. Genexpressionen wurden, analog des WGCNA-Manuals, mit einer varianzstabilisierenden Transformation (VST) normalisiert. Dazu wurde das DESeq2 Paket in R verwendet (Love et al., 2014). Die resultierende Ergebnismatrix wurde für die anschließende WGCNA transponiert. Für die Netzwerkkonstruktion wurde der passende Schwellwert (*Soft Threshold* oder auch *Soft Thresholding Power* genannt) mittels der *pickSoftThreshold()*-Funktion ermittelt, womit eine sogenannte *Adjacency Matrix* generiert wurde. Eine *Adjacency Matrix* ist eine Art Tabelle oder Matrix, die die Beziehungen (in diesem Fall die Korrelationen) zwischen den Genen in einem Netzwerk darstellt. Die *Adjacency Matrix* hilft also, ähnliche Expressionsmuster mathematisch zu erfassen. Die Wahl des *Soft Threshold* wiederum hat direkten Einfluss auf die Struktur des Netzwerks. Ein hoher *Soft Threshold* verstärkt nur die stärkeren Korrelationen und schwächt die schwächeren ab. Ein niedriger *Soft Threshold* führt dazu, dass auch schwächere Korrelationen einbezogen werden und somit mehr Verbindungen im Netzwerk entstehen. Die Ergebnisse der *pickSoftThreshold()*-Funktion für die beiden WGCNA sind in Abbildung 3.21 dargestellt. Ziel ist es den *Soft Threshold* so zu wählen, dass der  $R^2$ -Wert über 0,85

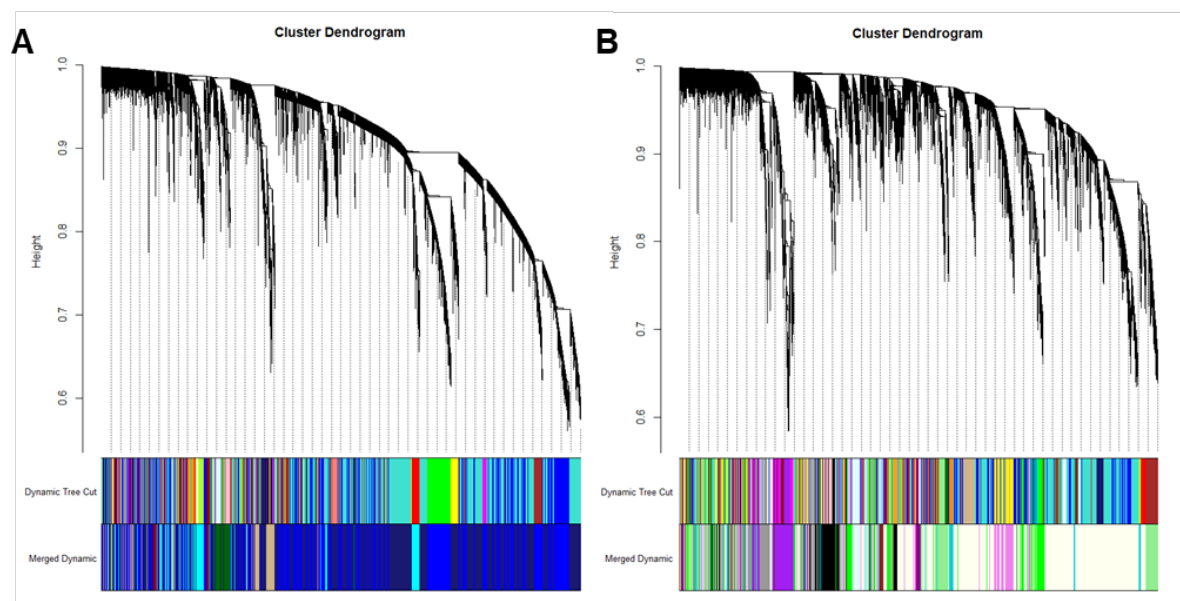
liegt, aber danach nicht mehr stark ansteigt. Der  $R^2$ -Wert liefert Hinweise über die Skalierbarkeit des Netzwerks, wobei ein  $R^2$ -Wert von 0,85 besagt, dass das Netzwerk eine hohe Robustheit und Stabilität aufweist (siehe blau gestrichelte Linie in Abb. 3.21A und B). Für beide WGCNA wurde deswegen ein *Soft Threshold* von 6 gewählt.



**Abbildung 3.21:** Ergebnisse der *pickSoftThreshold()*-Funktion des WGCNA-Pakets in R zur Ermittlung des *Soft Thresholds* zur Erstellung der *Adjacency*-Matrix. A) WGCNA mit den *Gen-Counts* von Szenario I (40 V/m) und Szenario III (0 V/m). B) WGCNA mit den *Gen-Counts* von Szenario II (mechanischer Stress) und Szenario III (0 V/m). SFT = *SoftThreshold*.

Aus den *Adjacency* Matrizen wurden topologische Überlappungsmatrizen (*topological overlap matrix* = TOM) berechnet und Gene mittels einer hierarchischen Clusteranalyse gruppiert (*hclust()*-Funktion). Die TOM misst, wie stark zwei Gene miteinander verbunden sind, unter Berücksichtigung der gesamten Netzwerkstruktur. Das bedeutet, dass auch indirekte Verbindungen zwischen Genen berücksichtigt werden, wenn sie durch andere Gene miteinander verbunden sind. Mit der TOM als Grundlage werden die Gene dann durch eine hierarchische Clusteranalyse gruppiert. In der hierarchischen Clusteranalyse wird ein Dendrogramm erstellt, welches die Gene basierend auf ihren Ähnlichkeiten im Netzwerk in *Cluster* (Module) gruppiert. Jedes *Cluster* im Dendrogramm repräsentiert ein Modul von Genen, die ähnliche

Expressionsmuster aufweisen und miteinander ko-reguliert werden. Der nächste Schritt besteht darin das Dendrogramm zu "durchschneiden", um die Gene in Module zu unterteilen. Dazu wird ein *Cut-Off*-Wert für den Korrelationen-Abstand gesetzt, um die Dendrogramm-Struktur in einzelne Module zu teilen. Dies bedeutet, dass Gene, die eng miteinander verbunden sind (also sehr hohe Korrelationen haben), in ein Modul gruppiert werden. Die Anzahl und Größe der Module hängen davon ab, wie der *Cut-Off*-Wert gesetzt wird. In unseren Analysen wurde ein *Cut-Off* von 0,3 gewählt. Die resultierenden Cluster-Dendrogramme und Modulzuordnungen sind in Abbildung 3.22 dargestellt. Jedes Modul erhält anschließend eine Farbe, um es im Netzwerk einfach zu identifizieren. Die Gene, die zu einem Modul gehören, werden der gleichen Modul-Farbe zugewiesen. Jedes Modul ist also eine Gruppe von Genen, die sehr hoch miteinander korreliert sind. Zusätzlich haben Gene innerhalb eines Moduls ähnliche Expressionsmuster und sind wahrscheinlich an ähnlichen biologischen Prozessen beteiligt. Für detaillierte Informationen zur Netzwerkbestimmung und Berechnung von Modulen sei auf die Originalarbeit des WGCNA-Pakets verwiesen (Langfelder and Horvath, 2008).



**Abbildung 3.22:** Cluster Dendrogramme und Modulzuordnungen der Gene aus Expositionsszenarien 40 V/m und 0 V/m, sowie der Gene aus dem mechanischen Stress und 0 V/m basierend auf den jeweiligen *topological overlap matrices*. A) Dendrogramm und Modulzuordnung von Genen aus Szenario I (40 V/m) und Szenario III (0 V/m) basierend auf ähnlichen Genexpressionsmustern. B) Dendrogramm und Modulzuordnung von Genen aus Szenario II (mechanischer Stress) und Szenario III (0 V/m) basierend auf ähnlichen Genexpressionsmustern.

Durch die Verbindung einheitlicher Module (Abb. 3.22, *Merged Dynamic*) wurden die Gene aus Szenarien I (40 V/m) und III (0 V/m) in 10 Module und die Gene aus Szenario II (mechanischer Stress) und III (0 V/m) in 14 Module aufgeteilt, die jeweils

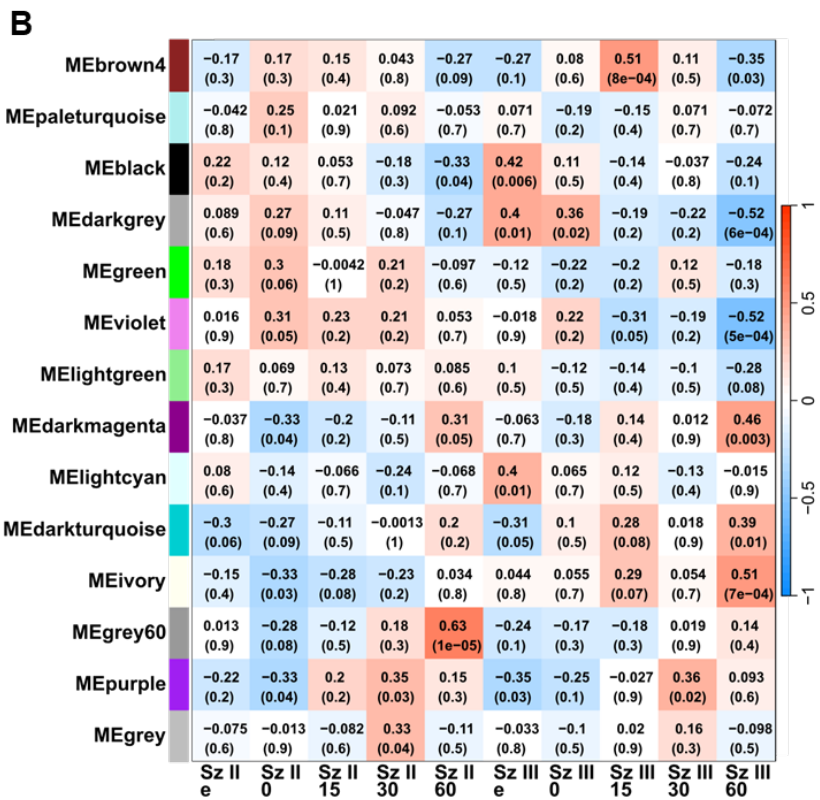
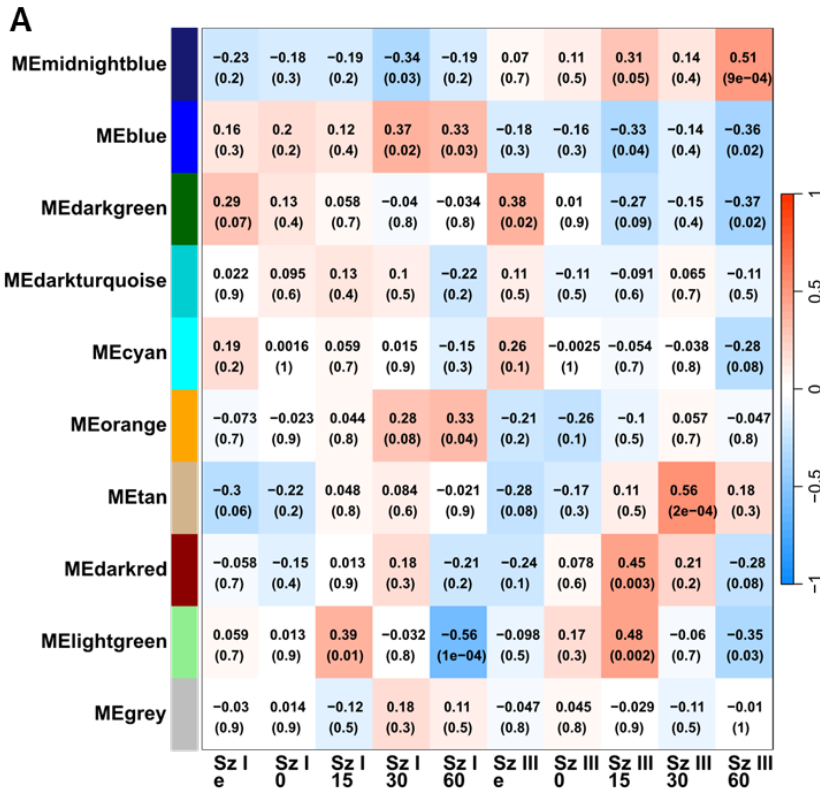
korrelierte Gene beinhalten. Diese Module werden von dem Software-Paket mit Farben beschrieben, sodass sich die in Tabelle 3.20 angegebenen Module ergaben.

**Tabelle 3.20:** Auflistung der Module mit der Anzahl der darin enthaltenen, korrelierten Gene für die unterschiedlichen Analysen (Datensatz 1: Szenario I (40 V/m) und Szenario III (0 V/m); Datensatz 2: Szenario II (mechanischer Stress) und Szenario III = 0 V/m).

Modulfarbe	Anzahl Gene	Datensatz
<i>Midnightblue</i>	10136	Datensatz 1: 40 V/m und 0 V/m
<i>Blue</i>	8836	Datensatz 1: 40 V/m und 0 V/m
<i>cyan</i>	1669	Datensatz 1: 40 V/m und 0 V/m
<i>Tan</i>	1188	Datensatz 1: 40 V/m und 0 V/m
<i>Darkgreen</i>	973	Datensatz 1: 40 V/m und 0 V/m
<i>Darkred</i>	244	Datensatz 1: 40 V/m und 0 V/m
<i>Lightgreen</i>	164	Datensatz 1: 40 V/m und 0 V/m
<i>Darkturquoise</i>	87	Datensatz 1: 40 V/m und 0 V/m
<i>Orange</i>	41	Datensatz 1: 40 V/m und 0 V/m
<i>Grey</i>	20	Datensatz 1: 40 V/m und 0 V/m
<i>Ivory</i>	10631	Datensatz 2: mechanischer Stress und 0 V/m
<i>Green</i>	2152	Datensatz 2: mechanischer Stress und 0 V/m
<i>Black</i>	2044	Datensatz 2: mechanischer Stress und 0 V/m
<i>Lightgreen</i>	1932	Datensatz 2: mechanischer Stress und 0 V/m
<i>Violet</i>	1838	Datensatz 2: mechanischer Stress und 0 V/m
<i>Purple</i>	1500	Datensatz 2: mechanischer Stress und 0 V/m
<i>Darkturquoise</i>	1011	Datensatz 2: mechanischer Stress und 0 V/m
<i>Grey60</i>	998	Datensatz 2: mechanischer Stress und 0 V/m
<i>lightcyan</i>	358	Datensatz 2: mechanischer Stress und 0 V/m
<i>Brown4</i>	357	Datensatz 2: mechanischer Stress und 0 V/m
<i>Darkmagenta</i>	232	Datensatz 2: mechanischer Stress und 0 V/m
<i>Darkgrey</i>	208	Datensatz 2: mechanischer Stress und 0 V/m
<i>Paleturquoise</i>	172	Datensatz 2: mechanischer Stress und 0 V/m
<i>Grey</i>	24	Datensatz 2: mechanischer Stress und 0 V/m

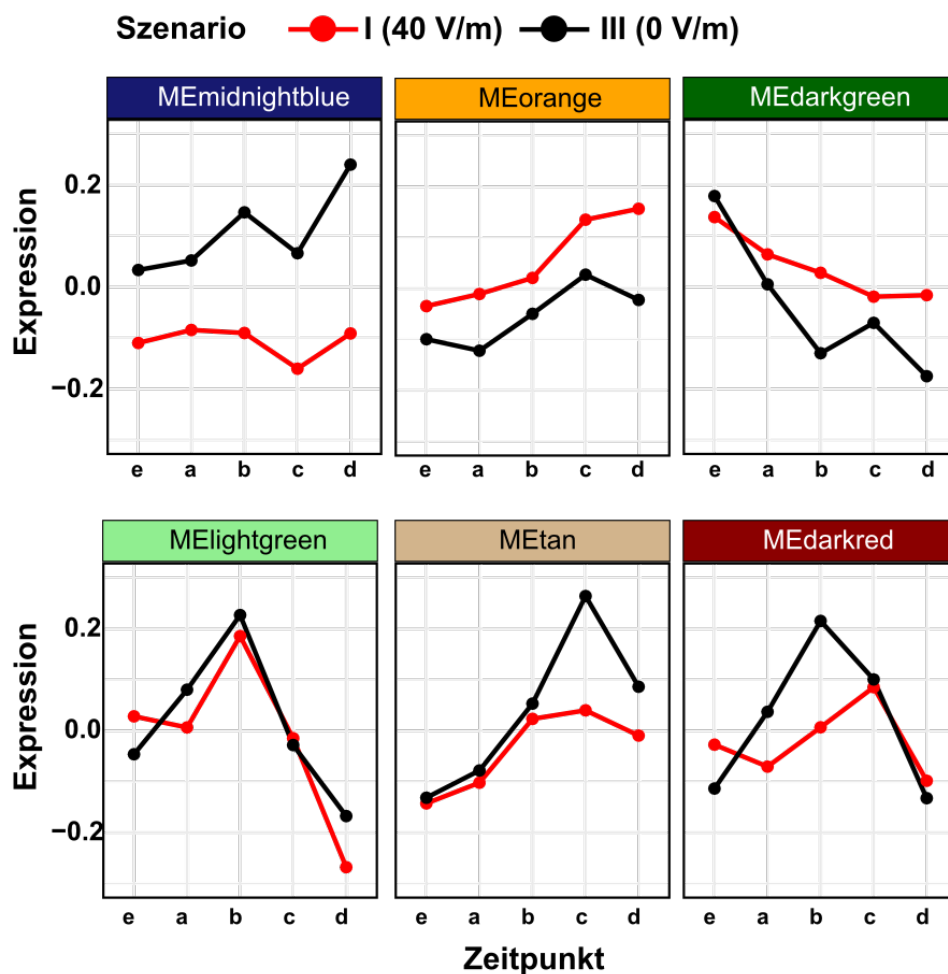
Anschließend wurde der *Output* auf einen Wert pro Modul vereinfacht, was mit der Bezeichnung *Eigengen* wiedergegeben wird. Ein *Eigengen* ist die erste Komponente einer Hauptkomponentenanalyse der Genexpression aller Gene im Modul. Das *Eigengen* repräsentiert somit den gewichteten Durchschnitt der Expressionsprofile der Gene innerhalb eines Moduls. Der Wert des *Eigengens* beschreibt die Durchschnittsaktivität aller Gene im Modul über die verschiedenen Proben hinweg. Wenn alle Gene in einem Modul zum Beispiel hoch exprimiert sind, wird das *Eigengen* ebenfalls einen hohen Wert haben. Mittels der *Eigengene* wurden daraufhin *Pearson-Korrelationen* zwischen den Modulen und verschiedenen *Szenario\_Zeitpunkt*

Kombinationen (*Traits*) berechnet (Abb. 3.23). Mögliche signifikante Korrelationen zwischen Eigengen und *Traits* zeigen, wie stark ein Modul mit den Szenario\_Zeitpunkt-Kombinationen zusammenhängt und geben Hinweise auf die Rolle des Moduls in den untersuchten Prozessen.



**Abbildung 3.23:** Pearson-Korrelationen zwischen den Modulen und verschiedenen Szenario\_zeitpunkt Kombinationen (Traits). A) Datensatz 1: Szenario I (40 V/m) und Szenario III (0 V/m). B) Datensatz 2: Szenario II (mechanischer Stress) und Szenario III (0 V/m). Dargestellt sind jeweils die Korrelationen zwischen den einzelnen Modulen und den Szenario\_zeitpunkt-Kombinationen und deren Signifikanz (angegeben in den Klammern). Das Farbschema spiegelt die Art der Korrelation wieder (blau = negativ korreliert, rot = positiv korreliert). 0, 15, 30, 60 = Minuten nach Expositionsende; e = Zeitpunkt vor Exposition; Sz = Szenario, ME = Modul-Eigenen.

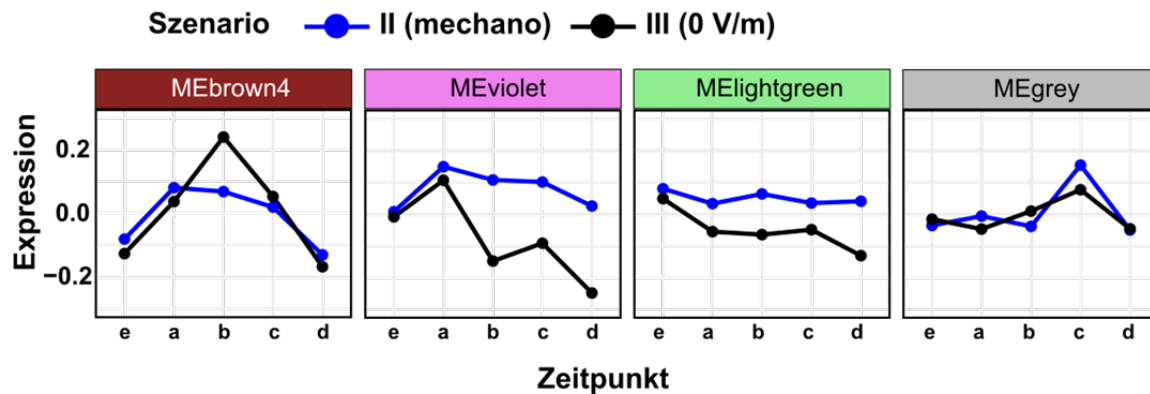
Aufgrund der ermittelten Signifikanzen (Abb. 3.23) wurden die Eigengenexpressionen ausgewählter Module über die verschiedenen Zeitpunkte und Szenarien im Folgenden geplottet. Für die WGCNA mit den Daten aus Szenario I (40 V/m) und Szenario III (0 V/m) wurden die Module *midnightblue*, *orange*, *darkgreen*, *lightgreen*, *tan*, und *darkred* ausgewählt (Abb. 3.24). Für die WGCNA mit den Daten aus Szenario II (mechanischer Stress) und Szenario III (0 V/m) wurden die Module *brown4*, *violet*, *lightgreen*, und *grey* ausgewählt (Abb. 3.25).



**Abbildung 3.24:** Expressionsverläufe der Eigengene für unterschiedliche Module, die sich aus den Datensätzen von Szenario I (40 V/m) und Szenario III (0 V/m) ergaben. Die Zeitpunkte waren e = vor Exposition, a = 0 Minuten, b = 15 Minuten, c = 30 Minuten, und d = 60 Minuten nach Expositionsende (Szenario I). ME = Moduleigene.

Aus Abbildung 3.24 ist ersichtlich, dass die Eigengenexpression im Modul *midnightblue* zu allen Zeitpunkten in Szenario III (0 V/m) höher ist als in Szenario II, einschließlich dem Zeitpunkt vor Exposition. Somit sind in diesem Modul vermutlich entwicklungspezifische Gene zu finden. Ähnliches gilt für die Eigengenexpression im Modul *orange*. Interessant erscheint die Eigengenexpression im Modul *darkgreen*, dass zu allen Zeitpunkten in der Stressbedingung (Szenario I = 40 V/m) höhere Werte

zeigt als in der Scheinexposition (0 V/m), ausgenommen dem Kontrollzeitpunkt, und lässt somit auf Expositions-relevante Gene schließen. Ähnliches trifft auf die Eigengenexpression im Modul *tan* zu.

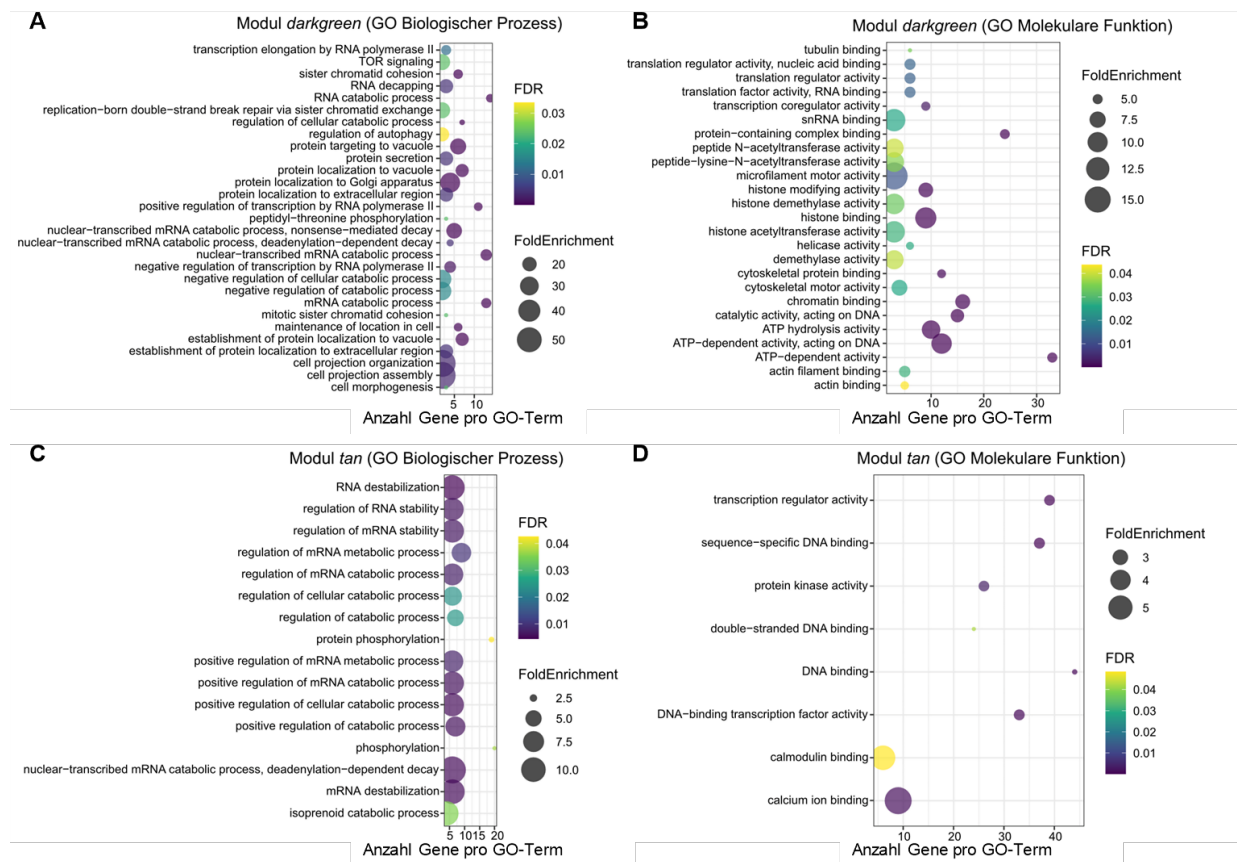


**Abbildung 3.25:** Expressionsverläufe der Eigengene für unterschiedliche Module, die sich aus den Datensätzen von Szenario II (mechanischer Stress) und Szenario III (0 V/m) ergaben. Die Zeitpunkte waren e = vor Exposition, a = 0 Minuten, b = 15 Minuten, c = 30 Minuten, und d = 60 Minuten nach Ende der Scheinexposition (Szenario III) beziehungsweise nach mechanischer Stressinduktion (Szenario II). ME = Moduleigengen, mechano = mechanischer Stress.

Für die Modul-Eigengenexpressionen der WGCNA mit den Daten aus Szenario II (mechanischer Stress) und Szenario III (0 V/m) erscheint das Modul *brown4* interessant, bei dem spezifisch zu Zeitpunkt b (15 Minuten nach Stressinduktion) höhere Expressionswerte in der Scheinexposition (0 V/m) im Vergleich zum mechanischen Stress auftreten. Die Module *violet* und *lightgreen* bilden Genexpressionen ab, die im mechanischen Stress höhere Eigengen-Expressionswerte über mehrere Zeitpunkte (mit Ausnahme des Kontrollzeitpunkts e) im Vergleich zur Scheinexposition zeigen, und Modul *grey* zeigt leicht erhöhte Eigengen-Expressionswerte zum Zeitpunkt c (30 Minuten nach Stressinduktion) im mechanischen Stress im Vergleich zur Scheinexposition.

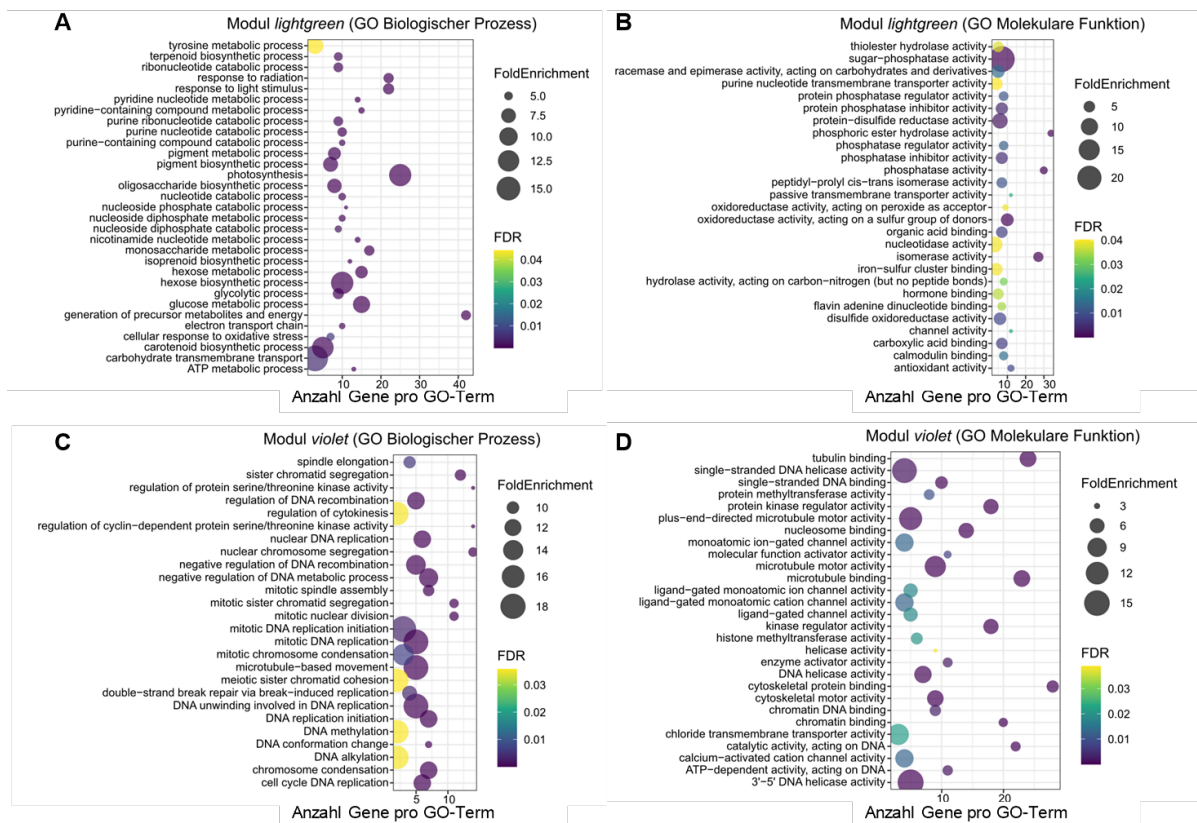
Um die biologischen Prozesse detaillierter zu beleuchten, denen die Gene in den ausgewählten Modulen (Abb. 3.24 und Abb. 3.25) zugeordnet werden können, wurden GO-Analysen bezüglich der GO-Kategorien „Biologischer Prozess“, „Molekulare Funktion“, und „Zelluläres Kompartiment“ durchgeführt. Die GO-Analysen wurden analog zu den vorherigen Analysen über die Panther-Datenbank durchgeführt und mittels ggplot2 aus R visualisiert. Für Module, die weniger als 400 Gene enthielten (Tabelle 3.20) wurden keine signifikanten GO-Terme detektiert. Die Ergebnisse für die Module *darkGreen* und *tan* (WGCNA mit Daten aus Szenario I = 40 V/m und Szenario III = 0 V/m), sowie die Ergebnisse der Module *lightGreen* und *violet* (WGCNA mit den

Daten aus Szenario II = mechanischer Stress und Szenario I = 0 V/m) sind in den Abbildungen 3.26 bis 3.28 dargestellt.



**Abbildung 3.26:** Genontologie (GO)-Analysen der Gene der Module *darkGreen* und *tan* aus der WGCN-Analyse der normalisierten Gen-Counts aus Szenario I (40 V/m) und Szenario III (0 V/m). A) GO-Terme des Moduls *darkGreen* in der Kategorie biologischer Prozess. Dargestellt sind nur Terme, deren *FoldEnrichment* > 10 sind. B) GO-Terme des Moduls *darkGreen* in der Kategorie molekulare Funktion. Dargestellt sind nur Terme, deren *FoldEnrichment* > 4,1 sind. C) GO-Terme des Moduls *tan* in der Kategorie biologischer Prozess. Dargestellt sind nur Terme, deren *FoldEnrichment* > 2 sind. D) GO-Terme des Moduls *tan* in der Kategorie molekulare Funktion. Dargestellt sind nur Terme, deren *FoldEnrichment* > 2 sind. Die Größe der Kreise gibt die Anreicherung der in unserem Datensatz detektierten Gene zu dem jeweiligen biologischen Prozess beziehungsweise zur molekularen Funktion im Vergleich zur Anzahl der im Genom vorkommenden Gene zum jeweiligen biologischen Prozess/zur molekularen Funktion wieder. Die Farbe der Kreise zeigt die statistische Signifikanz (FDR) der Anreicherung. FDR = *False Discovery Rate*, GO = Genontologie, WGCN = *weighted gene co-expression network*.

In Abbildung 3.26 (WGCNA der Daten aus Szenario I = 40 V/m und Szenario III = 0 V/m) erscheinen in Bezug auf die zu replizierenden Studien vor allem die GO-Analysen in der Kategorie „molekulare Funktion“ interessant (Abb. 3.26B und 3.26D). Im Modul *darkGreen* finden sich Gene, deren molekulare Funktion mit ATP-abhängigen Prozessen zusammenhängen und Modul *tan* beinhaltet Gene, die diverse „Binde“-Eigenschaften beeinflussen (*calcium-ion-binding*, *DNA-binding*) und Transkriptionsfaktor-Aktivität aufweisen (*transcription regulator activity*).



**Abbildung 3.27:** Genontologie (GO)-Analysen der Gene der Module *lightGreen* und *violet* aus der WGCN-Analyse der normalisierten Gen-Counts aus Szenario II (mechanischer Stress) und Szenario III (0 V/m). A) GO-Terme des Moduls *lightGreen* in der Kategorie biologischer Prozess. Dargestellt sind nur Terme, deren *FoldEnrichment* > 4,4 sind. B) GO-Terme des Moduls *lightGreen* in der Kategorie molekulare Funktion. Dargestellt sind nur Terme, deren *FoldEnrichment* > 2,6 sind. C) GO-Terme des Moduls *violet* in der Kategorie biologischer Prozess. Dargestellt sind nur Terme, deren *FoldEnrichment* > 8,4 sind. D) GO-Terme des Moduls *violet* in der Kategorie molekulare Funktion. Dargestellt sind nur Terme, deren *FoldEnrichment* > 2,8 sind. Die Größe der Kreise gibt die Anreicherung der in unserem Datensatz detektierten Gene zu dem jeweiligen biologischen Prozess beziehungsweise zur molekularen Funktion im Vergleich zur Anzahl der im Genom vorkommenden Gene zum jeweiligen biologischen Prozess/zur molekularen Funktion wieder. Die Farbe der Kreise zeigt die statistische Signifikanz (FDR) der Anreicherung. FDR = *False Discovery Rate*, GO = Genontologie, WGCN= *weighted gene co-expression network*.

In Abbildung 3.27 (WGCNA der Daten aus Szenario II = mechanischer Stress und Szenario III = 0 V/m) erscheinen die Ergebnisse für die Kategorie „Biologischer Prozess“ im Modul *lightGreen* erwähnenswert. Hier finden sich unter anderem die GO-Terme *response to radiation* („Antwort auf Strahlung“), *cellular response to oxidative stress* („zelluläre Antwort auf oxidativen Stress“), und *ATP metabolic process* („Metabolischer Prozess des ATP“). Die Gene des Moduls *lightGreen*, die dem Term *response to radiation* zugeordnet werden können sind in Tabelle 3.21 aufgelistet.

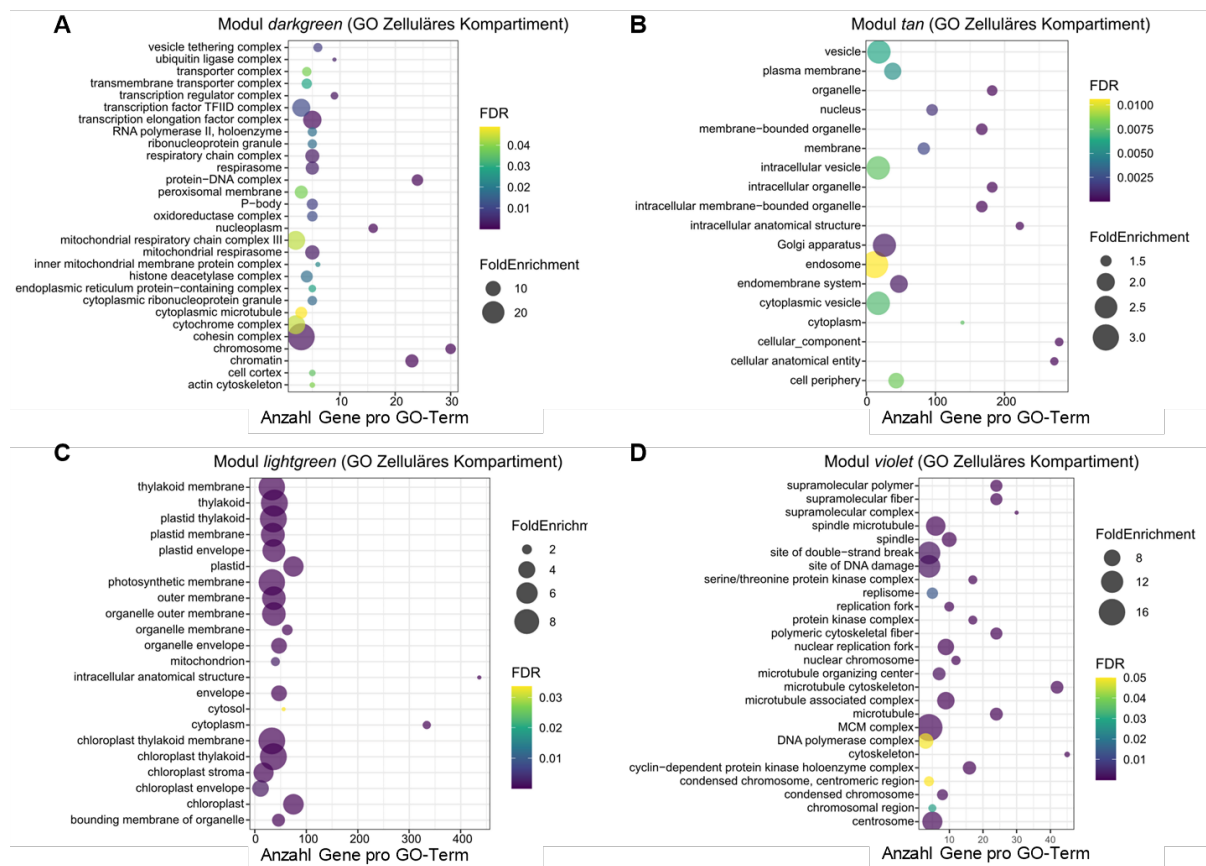
**Tabelle 3.21:** Liste an Genen, die dem signifikant angereicherten GO-Term GO:0009314 (*response to radiation*) aus dem Modul *lightGreen* (WGCNA mit den Daten aus Szenario II = Mechanischer Stress und III = 0 V/m) zugeordnet werden können.

Gen	Gen-Beschreibung
Solyc09g014520	Chlorophyll a-b binding protein cp29.1, chloroplastic
Solyc05g056050	Chlorophyll a-b binding protein 6, chloroplastic
Solyc03g115900	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic
Solyc01g105050	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic
Solyc09g090180	Protein light-dependent short hypocotyls 4
Solyc10g006230	Photosystem i chlorophyll a_b-binding protein 2, chloroplastic
Solyc03g005760	Chlorophyll a-b binding protein 1c, chloroplastic
Solyc12g006140	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic
Solyc07g022900	Photosystem i chlorophyll a_b-binding protein 5, chloroplastic
Solyc06g069730	Chlorophyll a-b binding protein 4, chloroplastic
Solyc06g073180	B-box zinc finger protein 24
Solyc01g105030	Chlorophyll a-b binding protein cp24 10a, chloroplastic
Solyc12g011280	Photosystem i chlorophyll a_b-binding protein 3-1, chloroplastic
Solyc12g011450	Chlorophyll a-b binding protein 13, chloroplastic
Solyc10g007690	Chlorophyll a-b binding protein 8, chloroplastic
Solyc04g082930	Chlorophyll a-b binding protein 7, chloroplastic
Solyc07g063600	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic
Solyc01g110370	B-box zinc finger protein 19
Solyc12g009200	Photosystem i chlorophyll a_b-binding protein 6, chloroplastic
Solyc07g047850	Chlorophyll a-b binding protein 4, chloroplastic
Solyc03g005770	Chlorophyll a-b binding protein 1c, chloroplastic
Solyc11g072310	Fe2og dioxygenase domain-containing protein

Es fällt auf, dass viele der in Tabelle 3.21 angegebenen Gene und der dazugehörige GO-Term auch in mehreren differenziell exprimierten Genlisten der 5 V/m Exposition (Szenario R\_IV) detektiert wurden, allerdings in keiner der Genlisten der 40 V/m Exposition. Zusammen mit den anderen GO-Termen in diesem Modul (*ATP metabolic process* oder *cellular response to oxidative stress*), die Prozesse widerspiegeln, die häufig mit mechanischem Stress in Verbindung gebracht werden (Bowles, 1998; Wasternack et al., 2006), beinhaltet dieses Modul wahrscheinlich stress-relevante Gene. Da diese Prozesse aber auch an anderen abiotischen Stressreaktionen beteiligt sind, was auch für die Gene gilt, die unter *response to radiation* fallen (Tabelle 3.21; Billah et al., 2024), spiegeln die detektierten Gene im Modul *lightGreen* wohl allgemeine Stressreaktionen wider.

Im Modul *violet* finden sich in der Kategorie „biologischer Prozess“ vor allem Zellzyklus-relevante Gene (Abb. 3.27C und 3.27D). Die Ergebnisse der GO-Analysen

bezüglich der Kategorie „Zelluläres Kompartiment“ (Abb. 3.28) zeigen, dass im Modul *darkGreen* (Abb. 3.28A) Gene vertreten sind, die bspw. an Transkriptionsfaktorkomplexen beteiligt sind (*transcription regulator complex*, *transcription factor TFIID complex*, *protein-DNA complex*). Das Modul *tan* (Abb. 3.28B) hingegen zeigt Gene, deren zelluläre Lokalisation Membranen oder membran-gebundene Organellen sind (*plasma membrane*, *endomembrane system*, *membrane-bound organelle*). Ähnliches trifft auf das Modul *lightGreen* zu (Abb. 3.28C), wobei hier hauptsächlich die Lokalisation zur Thylakoid-Membran zu finden ist. Gene im Modul *violet* (Abb. 3.28D) lassen sich Zellzyklus-relevanten Kompartimenten zuordnen, wie beispielsweise dem Spindelapparat.



**Abbildung 3.28:** Genontologie (GO)-Analysen der Gene in der Kategorie zelluläres Kompartiment der Module *darkGreen*, *tan*, *lightGreen*, und *violet* aus den WGCN-Analysen der normalisierten Gen-Counts aus Szenario I (40 V/m) und Szenario III (0 V/m) oder aus Szenario II (mechanischer Stress) und Szenario III (0 V/m). A) GO-Terme des Moduls *darkGreen*. Dargestellt sind nur Terme, deren *FoldEnrichment* > 4 sind. B) GO-Terme des Moduls *tan*. Dargestellt sind alle detektierten Terme. C) GO-Terme des Moduls *lightGreen*. Dargestellt sind nur Terme, deren *FoldEnrichment* > 1,5 sind. D) GO-Terme des Moduls *violet*. Dargestellt sind nur Terme, deren *FoldEnrichment* > 4 sind. Die Größe der Kreise gibt die Anreicherung der in unseren Datensätzen detektierten Gene zum jeweiligen zellulären Kompartiment im Vergleich zur Anzahl der im Genom vorkommenden Gene zum jeweiligen zellulären Kompartiment wieder. Die Farbe der Kreise zeigt die statistische Signifikanz (FDR) der Anreicherung. FDR = False Discovery Rate, GO = Genontologie, WGCN = *weighted gene co-expression network*.

Obwohl die GO-Analyse der Gene im Modul *brown4* keine statistisch signifikanten GO-Terme lieferte, zeigte eine manuelle Annotation, dass sich in diesem Modul Gene befinden, die bereits in der Literatur mit mechanischem Stress in Verbindung gebracht wurden, wie beispielsweise bZIP-Transkriptionsfaktoren, Proteinase-Inhibitoren, *Ethylen-Response* Faktoren, oder auch Abszissinsäure-relevante Gene (Bowles, 1998; Wasternack et al., 2006).

#### 3.2.5.4. Biologische Verifizierung über quantitative-Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR)

Für eine biologische Verifizierung einzelner Gene, die aus der RNA-Sequenzierung als differenziell exprimiert erschienen, wurde zunächst *complementary DNA (cDNA)* aus jeweils 500 ng der isolierten RNAs, die auch sequenziert wurden, erstellt. Dazu wurde das qScript cDNA Synthese Kit der Firma Quantabio verwendet. Quantitative Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR) wurde anschließend mit 9 Zielgenen, sowie den Genen *PROTEINASE INHIBITOR-II (PI)* und *BASIC LEUCINE ZIPPER 1 (bZIP)* durchgeführt. Da nur für Szenario I (40 V/m) und Szenario II (mechanischer Stress) differenziell exprimierte Gene zur Scheinexposition (Szenario III = 0 V/m) bestimmt wurden, für Szenario R\_IV (5 V/m) aber gegenüber dem Kontrollzeitpunkt e (vor Exposition), wurde auch für die biologische Verifizierung Szenario R\_IV (5 V/m) gesondert von den Szenarien I – III analysiert und für beide Analysen unterschiedliche Primer *designed*. Die zu testenden Gene für die Szenarien I – III wurden nach Expressionsstärkeänderungen basierend auf der differenziellen Genexpressionsanalyse im Vergleich zur Scheinexposition (0 V/m = Szenario III; siehe 3.2.5.3.2) ausgewählt und nach Vorkommen in mehreren Zeitpunkten (Tabelle 3.22). Für jedes Gen wurden mindestens 2 unterschiedliche Primerpaare anhand des Referenzgenoms *designed* und die zu erwartenden Größen der amplifizierten Fragmente wurden mittels reverser Transkription-PCR (RT-PCR) überprüft. Für die anschließende RT-qPCR wurden nur Primerpaare verwendet, deren Amplifikat der zu erwartenden Größe entsprach.

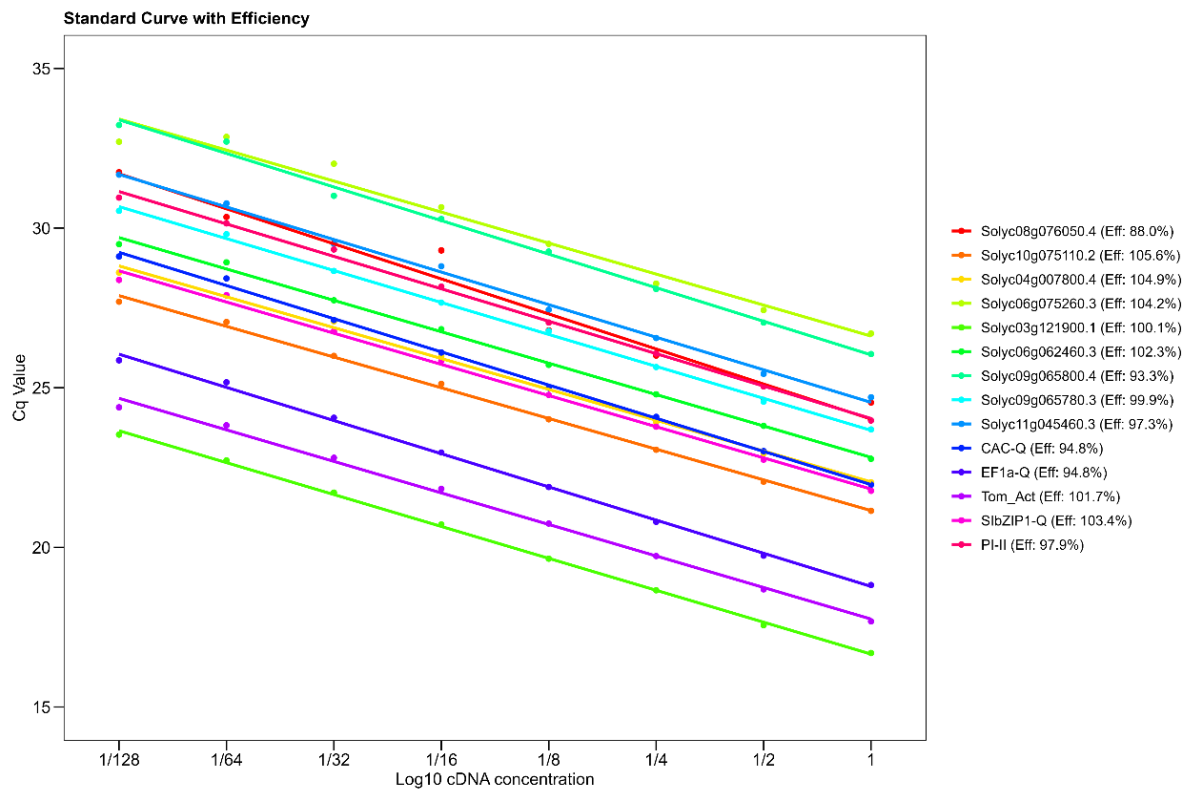
**Tabelle 3.22:** Liste an differenziell exprimierten Genen, für die RT-qPCR-Primer *designed* wurden mit Angabe des  $\log_2\text{-fold changes}$  zu jedem Zeitpunkt nach Exposition (40 V/m = Szenario I) oder nach dem mechanischen Stress (Szenario II) gegenüber der Scheinexposition (0 V/m = Szenario III). Zeitpunkte waren a = 0 Minuten, b = 15 Minuten, c = 30 Minuten, d = 60 Minuten. Differenziell exprimierte Gene wurde jeweils zur Scheinexposition (0 V/m = Szenario I) bestimmt. DEG = differenziell exprimiertes Gen.

Vergleich	Gen	Zeitpunkt a	Zeitpunkt b	Zeitpunkt c	Zeitpunkt d
40 V/m (Szenario I) gegenüber 0 V/m (Szenario III)	Solyc08g076050.4	kein DEG	-2,2	-2,59	-2,71
	Solyc10g075110.2	kein DEG	-2,13	-2,08	-2,25
	Solyc04g007800.4	kein DEG	-1,31	-1,12	-1,94
	Solyc06g075260.3	kein DEG	1,96	1,77	2,57
	Solyc03g121900.1	kein DEG	1,8	1,83	2,66
	Solyc06g062460.3	kein DEG	1,68	2,24	2,72
	Solyc09g065800.4	kein DEG	2,63	2,62	2,94
	Solyc09g065780.3	2,38	2,99	3,55	3,44
	Solyc11g045460.3	kein DEG	-1,57	-1,5	-2,03
mechanischer Stress (Szenario II) gegenüber 0 V/m (Szenario III)	Solyc08g076050.4	kein DEG	-2,06	kein DEG	kein DEG
	Solyc10g075110.2	kein DEG	-2,02	kein DEG	kein DEG
	Solyc04g007800.4	kein DEG	-1,4	kein DEG	kein DEG
	Solyc06g075260.3	kein DEG	2,2	kein DEG	kein DEG
	Solyc03g121900.1	kein DEG	1,74	kein DEG	kein DEG
	Solyc06g062460.3	kein DEG	1,2	kein DEG	1,93
	Solyc09g065800.4	kein DEG	kein DEG	kein DEG	kein DEG
	Solyc09g065780.3	kein DEG	1,95	2,28	2,05
	Solyc11g045460.3	kein DEG	kein DEG	kein DEG	kein DEG

Es wurden 3 *Housekeeping* Gene als Kontrolle verwendet (Aktin, *Clathrin adaptor complexes medium subunit/Endocytic pathway (CAC)* und *Elongation Factor 1 $\alpha$*  (*EF1 $\alpha$* )). Primersequenzen für die einzelnen Gene sind in Tabelle 3.23 aufgelistet. Vor Verwendung wurde jede *cDNA* 1:1 mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt. Die RT-qPCR wurde in 10  $\mu$ l Reaktionen durchgeführt und zwar mit dem *PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix* (Thermo Fisher Scientific, Niederlande) unter Verwendung eines *QuantStudio™ 5 Real-Time PCR-Systems* (Thermo Fisher Scientific, Niederlande). Für jedes biologische Replikat (n = 4) wurden drei technische Replikate verwendet. Um für potentielle Unterschiede zwischen einzelnen RT-qPCR-Läufen zu kalibrieren (*inter-run* Kalibrierung) wurden 2 Referenz-Gene in einem *cDNA-Mix* auf allen Platten mitgeführt.

Die Primer-Effizienz für jedes Primerpaar wurde über eine Verdünnungsreihe bestimmt (1 = unverdünnte *cDNA*,  $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{8}$ ,  $\frac{1}{16}$ ,  $\frac{1}{32}$ ,  $\frac{1}{64}$ , und  $\frac{1}{128}$ ). Für die Verdünnungsreihen wurde ein *Mix* aus allen *cDNAs* verwendet. Aus den erhaltenen

Daten wurde die Primer-Effizienz mittels der Steigung der sich ergebenden linearen Funktion ermittelt (Abb. 3.29).



**Abbildung 3.29:** Beispiele für Standardkurven für einige RT-qPCR-Primer.

Die Formel zur Berechnung der Primer-Effizienz ist nachfolgend angegeben:

$$\text{Primereffizienz} = -1 + 10^{\left(-\frac{1}{\text{Steigung}}\right)} \quad (6)$$

Die so ermittelten Primer-Effizienzen lagen zwischen 85% und 104% (Tabelle 3.23).

**Tabelle 3.23:** Primerinformationen aller getesteten Primerpaare zwischen den Szenarien I (40 V/m), II (mechanischer Stress), und III (Scheinexposition = 0 V/m), sowie Szenario R\_IV (5 V/m) mittels RT-qPCR. CAC = *Clathrin adaptor complexes medium subunit/Endocytic pathway*, EF1 $\alpha$  = *Elongation Factor 1 $\alpha$* , PI = Proteinase Inhibitor.

Gen	Probenart	Forward primer (3' - 5')	Reverse primer (3' - 5')	Primereffizienz
CAC	Referenzgen	CCTCCGTTGTGATGTAAGTGG	ATTGGTAAGTAACATCATCG	94,8%
EF1 $\alpha$	Referenzgen	TACTGGTGGTTTTGA AGCTG	AACTTCCTTCACGATTTTCATC	94,8%
Aktin	Referenzgen	TTAGCACCTTCCAGCAGATGT	AACAGACAGGACACTCGCACT	101,7%
bZIP	0 V/m, 5 V/m, 40 V/m, mechanischer Stress	GGGCTGATGCTAATGGACTTG	GCAGAGGCAGTAATGGGTTGA	103,4%
PI	0 V/m, 5 V/m, 40 V/m, mechanischer Stress	GACAAGGTACTAGTAATCAATTATCC	GGGCATATCCCGAACCCAAGA	97,9%
Solyc08g076050.4	0 V/m, 40 V/m, mechanischer Stress	CAAGAAGGAGCAACAGATAGG	TCAATGACAGTGATGGAACAG	88%
Solyc10g075110.2	0 V/m, 40 V/m, mechanischer Stress	CCCATGCAGAGGCATTAAC	CCCAACAGATTCTTAACACCAC	105,6%
Solyc04g007800.4	0 V/m, 40 V/m, mechanischer Stress	CAAAGGCATCAATTTACCACTC	GTGCAAGTGTCAATTCATCATC	104,9%
Solyc06g075260.3	0 V/m, 40 V/m, mechanischer Stress	TGAGAATGGTGAAGGGTGG	CAAGGTATTGAGGGATGAAGAG	104,2%
Solyc03g121900.1	0 V/m, 40 V/m, mechanischer Stress	TTAATATAGAGGTGGTGCGGG	TAGCAACGGGGAGGATTAGG	100,1%

<b>Gen</b>	<b>Probenart</b>	<b>Forward primer (3' - 5')</b>	<b>Reverse primer (3' - 5')</b>	<b>Primereffizienz</b>
Solyc06g062460.3	0 V/m, 40 V/m, mechanischer Stress	GCTTCCAAGTTCATCAAACATC	CTTATCTTTTCCCTCCTTCGTC	102,3%
Solyc09g065800.4	0 V/m, 40 V/m, mechanischer Stress	CTCCAAAACCGTCAATCATTTTC	TGCCATAATGTGTCTCCTTTTC	93,3%
Solyc09g065780.3	0 V/m, 40 V/m, mechanischer Stress	CTCTGCTCCTATCTAACAAACC	TCCTTCCACGTCTTCTTCC	99,9
Solyc11g045460.3	0 V/m, 40 V/m, mechanischer Stress	AAGCGATGACCAAATCGAC	ACCTACACAGAAACCTCCAC	97,3%
Solyc10g082060.1	5 V/m	GAGTTCGATGGATCCTTATGGG	TCCACAAATCACAAATGCACC	85,5%
Solyc05g008250.2	5 V/m	ATGGTGAAGGTTGCTGGAG	TTCATTATCCGTTTCGTCTGG	98,6%
Solyc11g042890.2	5 V/m	CGAAATCGGACTCAGTGGTTAC	TCATATTGTTTCGAGAGTGTGATGG	91,9%
Solyc03g061590.4	5 V/m	ACAAGTATGGCTCAATCCCCG	TGCAGTTGGCTCATTAGGAG	96,5%
Solyc06g007630.1	5 V/m	TCGATCCAGACGGTAACAAAC	TTCCTGAGCAATGTGTACCTC	96,3%
Solyc06g066540.1	5 V/m	TCGCCCAATTTCACTCTCAC	TCTTCCGACTCAAACTTCCG	96,9%
Solyc10g011880.1	5 V/m	CCTTGCCTTCCTCTTCCTC	GTCGTTTCTGCTTCCGTTTC	101,9%
Solyc01g112130.4	5 V/m	GTCAAAGGAAAACAAGTAGCCG	TGAAAGAGTTGTGGCGAGG	92,3%

Die Expression der einzelnen Gene wurde mittels der  $\Delta\Delta Ct$ -Methode ermittelt, wobei für jedes Gen die spezifisch ermittelte Primereffizienz verwendet wurde. Die Expression der untersuchten Gene wurde auf 3 Referenz-Gene normalisiert und entweder auf die Expression des jeweiligen Gens in der Scheinexposition (0 V/m = Szenario III; für die 40 V/m Exposition (Szenario I) und den mechanischen Stress = Szenario II)) oder auf die unexponierte Kontrolle (Zeitpunkt e; für die 5 V/m Exposition = Szenario R\_IV) kalibriert. Zusätzlich wurde die Variation zwischen einzelnen Platten bestimmt und die finale Expression dann bezüglich dieser Variation kalibriert.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels *Student's t-Test* oder einer Varianzanalyse (*Analysis of variance* = ANOVA) mit anschließender Korrektur für Mehrfachvergleiche (Post-hoc-Analyse) mittels des *Fisher's-Test*. Für die statistische Auswertung wurde Microsoft Excel (*t-Test*), sowie das *agricolae* Paket (ANOVA) in der statistischen Umgebung R verwendet (de Menidburu and Yaseen, 2020). Die Visualisierung der Daten erfolgte mittels ggplot2 in R (Wickham, 2016).

Die Expressionsergebnisse der getesteten Gene aus den Sequenzierdaten des Expositionsszenarios 40 V/m im Vergleich zur Scheinexposition, sowie des mechanischen Stresses im Vergleich zur Scheinexposition (0 V/m) sind in der Tabelle 3.24 dargestellt (Szenario I-III).

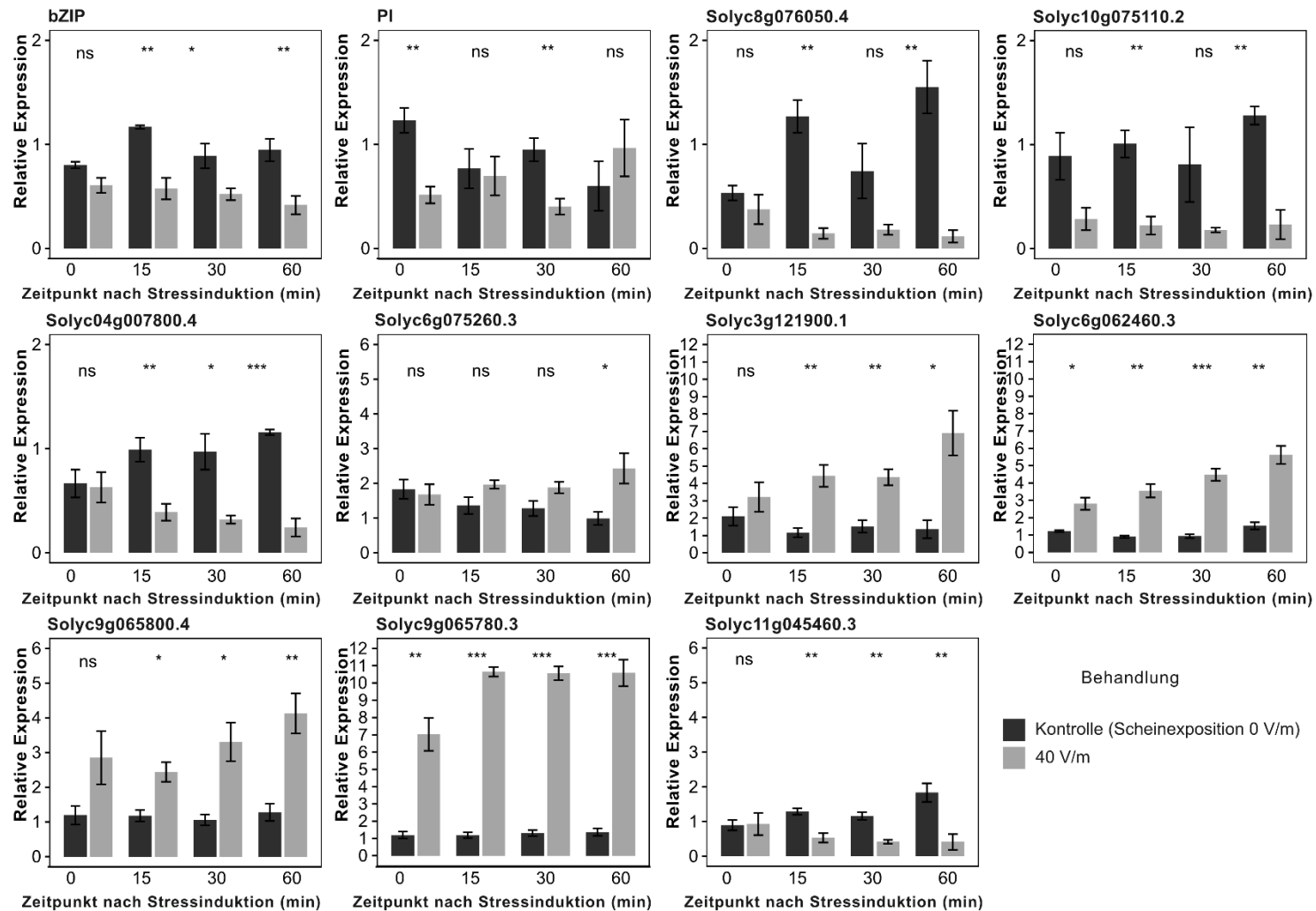
**Tabelle 3.24:** Detektierte Genexpressionsunterschiede, angegeben als  $\log_2$ -fold change, aus den RNA-Sequenzierdaten zu den unterschiedlichen Zeitpunkten in der 40 V/m Exposition (Szenario I), der Scheinexposition (0 V/m; Szenario III), und dem mechanischen Stress (Szenario II). Zeitpunkte waren a = 0 Minuten, b = 15 Minuten, c = 30 Minuten, und d = 60 Minuten nach Exposition oder nach mechanischer Stressinduktion. Mit magenta sind Expressionen markiert, die durch RT-qPCR nicht bestätigt werden konnten. Grün zeigt die bestätigten Genexpressionsunterschiede. DEG = differenziell exprimiertes Gen.

Vergleich	Gen	Zeitpunkt a	Zeitpunkt b	Zeitpunkt c	Zeitpunkt d
40 V/m (Szenario I) gegenüber 0 V/m (Szenario III)	Solyc08g076050.4	kein DEG	-2,2	-2,59	-2,71
	Solyc10g075110.2	kein DEG	-2,13	-2,08	-2,25
	Solyc04g007800.4	kein DEG	-1,31	-1,12	-1,94
	Solyc06g075260.3	kein DEG	1,96	1,77	2,57
	Solyc03g121900.1	kein DEG	1,8	1,83	2,66
	Solyc06g062460.3	kein DEG	1,68	2,24	2,72
	Solyc09g065800.4	kein DEG	2,63	2,62	2,94
	Solyc09g065780.3	2,38	2,99	3,55	3,44
	Solyc11g045460.3	kein DEG	-1,57	-1,5	-2,03
	bZIP	kein DEG	kein DEG	kein DEG	kein DEG
	PI	kein DEG	kein DEG	kein DEG	kein DEG

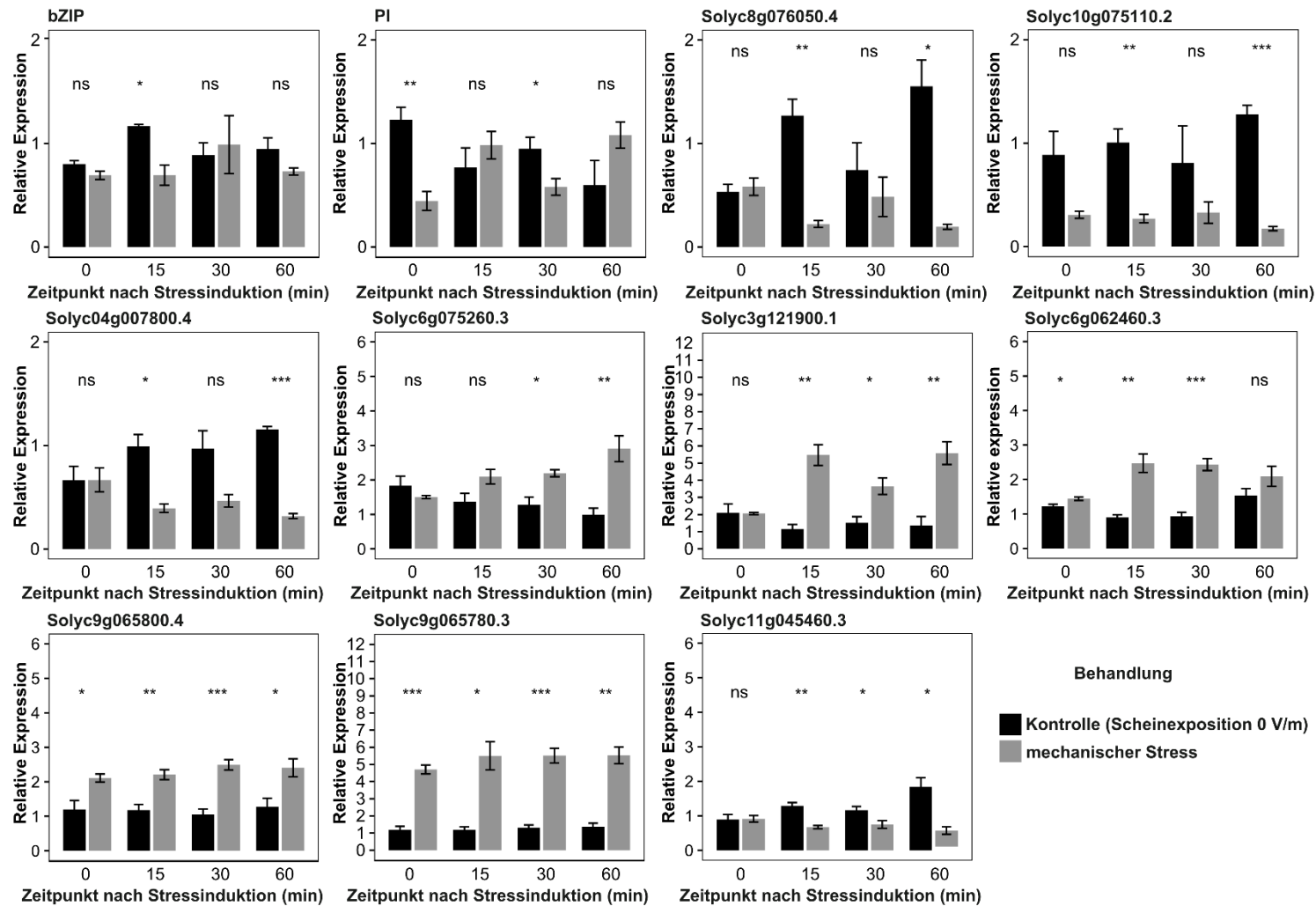
Vergleich	Gen	Zeitpunkt a	Zeitpunkt b	Zeitpunkt c	Zeitpunkt d
mechanischer Stress (Szenario II) gegenüber 0 V/m (Szenario III)	Solyc08g076050.4	kein DEG	-2,06	kein DEG	kein DEG
	Solyc10g075110.2	kein DEG	-2,02	kein DEG	kein DEG
	Solyc04g007800.4	kein DEG	-1,4	kein DEG	kein DEG
	Solyc06g075260.3	kein DEG	2,2	kein DEG	kein DEG
	Solyc03g121900.1	kein DEG	1,74	kein DEG	kein DEG
	Solyc06g062460.3	kein DEG	1,2	kein DEG	1,93
	Solyc09g065800.4	kein DEG	kein DEG	kein DEG	kein DEG
	Solyc09g065780.3	kein DEG	1,95	2,28	2,05
	Solyc11g045460.3	kein DEG	kein DEG	kein DEG	kein DEG
	<i>bZIP</i>	kein DEG	kein DEG	kein DEG	kein DEG
	<i>PI</i>	kein DEG	kein DEG	kein DEG	kein DEG

Die ermittelten relativen, normalisierten Expressionen für alle getesteten Gene zwischen dem Expositionsszenario 40 V/m (Szenario I) und der Scheinexposition (0 V/m = Szenario III) sind in Abb. 3.30 dargestellt.

Die ermittelten relativen, normalisierten Expressionen für alle getesteten Gene zwischen dem mechanischen Stress (Szenario II) und der Scheinexposition (0 V/m = Szenario III) sind in Abbildung 3.31 dargestellt.



**Abbildung 3.30:** RT-qPCR-Ergebnisse der getesteten Gene zwischen dem Expositionsszenario 40 V/m (Szenario I) und der Scheinexposition (0 V/m = Szenario III). Dargestellt sind Mittelwerte der normalisierten, relativen Expressionen ( $n = 4$ )  $\pm$  Standardfehler. Kalibriert wurde auf den Mittelwert der jeweiligen Zeitpunkte der Scheinexposition und normalisiert auf drei *Housekeeping*-Gene. Die statistische Signifikanz basiert auf dem *Student's t*-Test mit \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,005$ . bZIP = *BASIC LEUCINE ZIPPER 1*, ns = statistisch nicht signifikant unterschiedlich, PI = Proteinase Inhibitor.



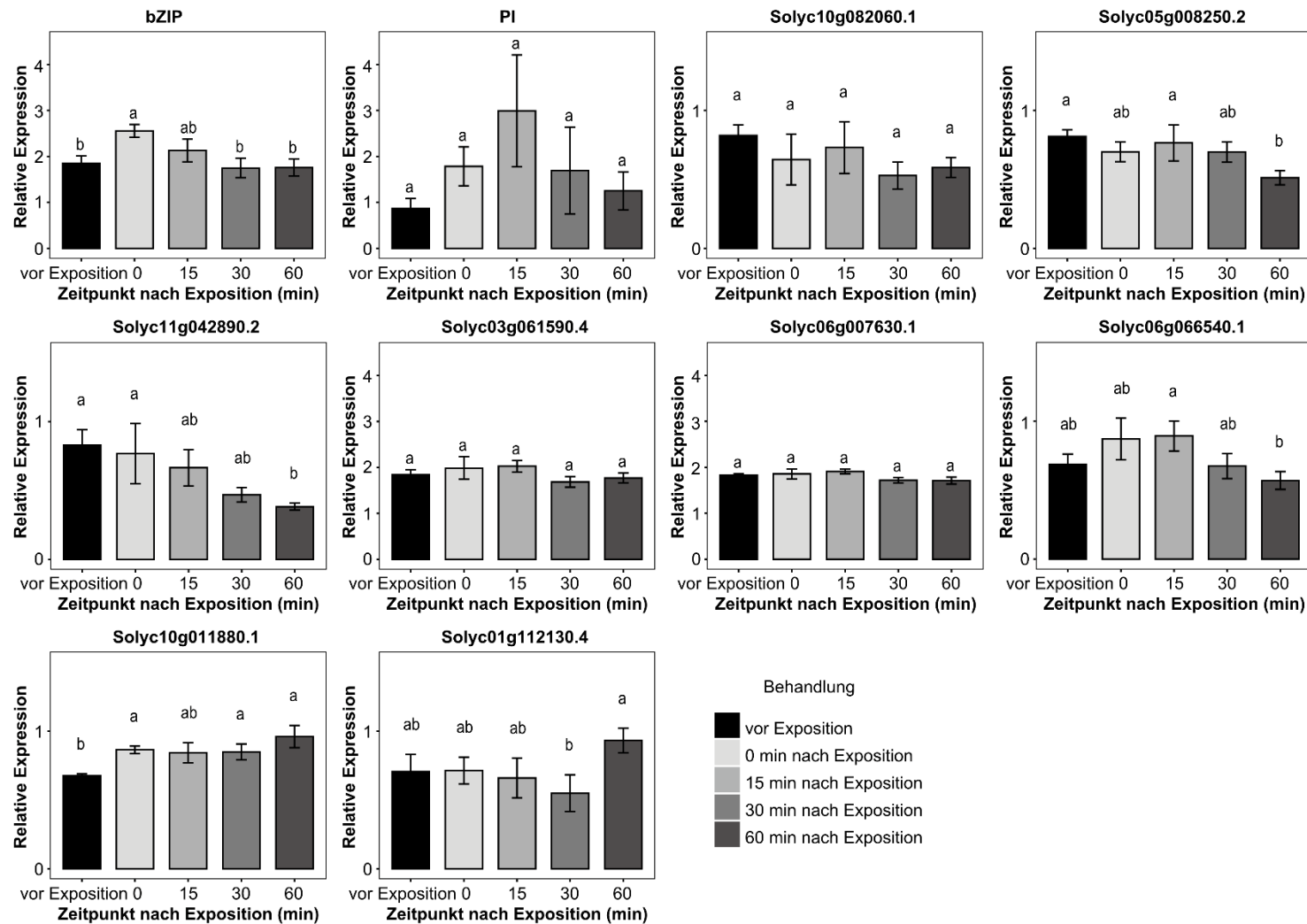
**Abbildung 3.31:** RT-qPCR-Ergebnisse der getesteten Gene zwischen dem mechanischen Stress (Szenario II) und der Scheinexposition (0 V/m = Szenario III). Dargestellt sind Mittelwerte der normalisierten, relativen Expressionen ( $n = 4$ )  $\pm$  Standardfehler. Kalibriert wurde auf den Mittelwert der jeweiligen Zeitpunkte der Scheinexposition und normalisiert auf drei *Housekeeping*-Gene. Die statistische Signifikanz basiert auf dem *Student's t*-Test mit \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,005$ . bZIP = *BASIC LEUCINE ZIPPER 1*, ns = statistisch nicht signifikant unterschiedlich, PI = Proteinase Inhibitor.

Die Expressionsergebnisse der getesteten Gene aus den Sequenzierdaten für das Expositions-Szenario 5 V/m (Szenario R\_IV) im Vergleich zur unexponierten Kontrolle (Zeitpunkt e) sind in der Tabelle 3.25 dargestellt. Auch hier wurden die zu testenden Gene primär nach Expressionsstärke und bezüglich differenzieller Expression über mehrere Zeitpunkte ausgewählt.

**Tabelle 3.25:** Detektierte Genexpressionsunterschiede aus den RNA-Sequenzierdaten im Expositionsszenario 5 V/m (Szenario R\_IV) zu den unterschiedlichen Zeitpunkten im Vergleich zur unexponierten Kontrolle (Zeitpunkt e). Die differentielle Genexpression ist als *log2-fold change* angegeben. Zeitpunkte (i) waren a = 0 Minuten, b = 15 Minuten, c = 30 Minuten, d = 60 Minuten nach Ende der Exposition. Zeitpunkt e = unexponierte Kontrolle, das heißt Zeitpunkt vor Exposition. Mit magenta sind Expressionen markiert, die durch RT-qPCR nicht bestätigt werden konnten. Grün zeigt die bestätigten Genexpressionsunterschiede. bZIP = *BASIC LEUCINE ZIPPER 1*, DEG = differenziell exprimiertes Gen, PI = Proteinase Inhibitor.

Vergleich	Gen	Zeitpunkt a	Zeitpunkt b	Zeitpunkt c	Zeitpunkt d
Zeitpunkt i gegenüber unexponierter Kontrolle (Zeitpunkt e)	Solyc10g082060.1	-3,67	-2,52	-3,16	-2,31
	Solyc05g008250.2	-2,4	-2,32	-2,54	-1,93
	Solyc11g042890.2	-2,23	-2,31	-2,68	-2,32
	Solyc03g061590.4	3,53	2,78	2,69	3,01
	Solyc06g007630.1	3,55	4,44	4,09	3,46
	Solyc06g066540.1	3,64	3,94	3,74	3,81
	Solyc10g011880.1	3,74	4,07	4,58	4,05
	Solyc01g112130.4	4,14	5,6	5,45	3,15
	bZIP	Kein DEG	Kein DEG	Kein DEG	Kein DEG
	PI	Kein DEG	Kein DEG	Kein DEG	Kein DEG

Die RT-qPCR-Ergebnisse der Vergleiche der einzelnen Gene für die Exposition 5 V/m (Szenario R\_IV) gegenüber der unexponierten Kontrolle (Zeitpunkt e = vor Exposition) sind in Abbildung 3.32 dargestellt.



**Abbildung 3.32:** RT-qPCR-Ergebnisse der getesteten Gene des Expositionsszenarios 5 V/m (Szenario R\_IV) für jeden Zeitpunkt im Vergleich zur unexponierten Kontrolle (Zeitpunkt e). Dargestellt sind Mittelwerte der normalisierten, relativen Expressionen ( $n = 4$ )  $\pm$  Standardfehler. Kalibriert wurde auf den Mittelwert der unexponierten Kontrolle und normalisiert auf drei *Housekeeping*-Gene. Unterschiedliche Buchstaben zeigen statistische Signifikanz ( $p < 0,05$ ) errechnet mit einer Varianzanalyse und anschließendem Fisher's-Test zur Korrektur der multiplen Testproblematik. bZIP = BASIC LEUCINE ZIPPER 1, PI = Proteinase Inhibitor.

Wie in Abbildung 3.32 ersichtlich, konnte von den getesteten Genen des Expositionsszenarios 5 V/m (Szenario R\_IV) nur eine höhere Expression des Gens Solyc10g011880 zu den Zeitpunkten 0 min, 30 min, und 60 min nach Ende der Exposition im Vergleich zur unexponierten Kontrolle (Zeitpunkt e) mittels RT-qPCR bestätigt werden und eine niedrigere Expression im Vergleich zur unexponierten Kontrolle (Zeitpunkt e) speziell an späten Zeitpunkten für Solyc05g008250 und Solyc11g042890.

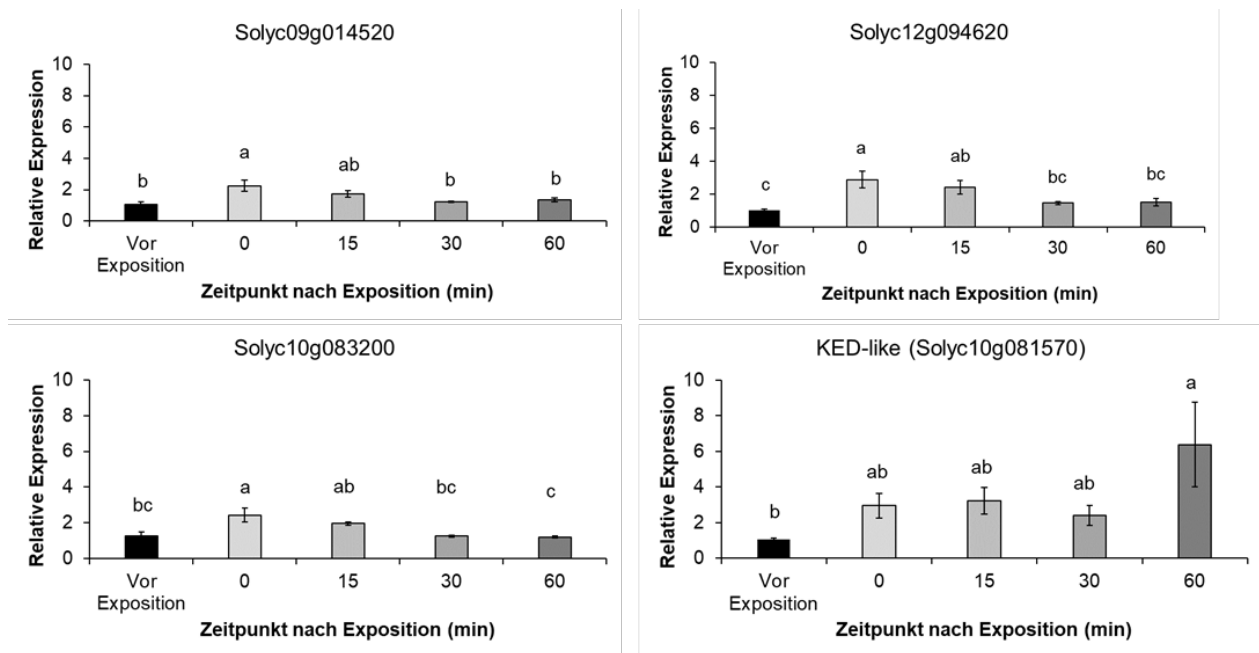
Deswegen wurden weitere Gene zur Verifikation mittels RT-qPCR ausgewählt. Dabei wurden die Zeitverlaufsanalysen und dort angereicherte GO-Terme berücksichtigt. Zusätzlich wurde ein *KED-like* Gen mit eingeschlossen, von dem kürzlich gezeigt wurde, dass es bei mechanischem Stress durch Verletzung in Tomaten hoch reguliert wird (Zhang et al., 2023).

Die Expressionsergebnisse dieser Gene aus den Sequenzierdaten mit Angabe des entsprechenden GO-Terms für das Expositionsszenario 5 V/m (Szenario R\_IV) im Vergleich zur unexponierten Kontrolle (Zeitpunkt e) sind in der Tabelle 3.26 dargestellt.

**Tabelle 3.26:** Detektierte Genexpressionsunterschiede aus den RNA-Sequenzierdaten im Expositionsszenario 5 V/m (Szenario R\_IV) zu den unterschiedlichen Zeitpunkten im Vergleich zur unexponierten Kontrolle (Zeitpunkt e). Die differentielle Genexpression ist als  $\log_2\text{-fold change}$  angegeben. Zeitpunkte (i) waren a = 0 Minuten, b = 15 Minuten, c = 30 Minuten, d = 60 Minuten nach Exposition. Zeitpunkt e = unexponierte Kontrolle, das heißt Zeitpunkt vor Exposition. Mit magenta sind Expressionen markiert, die durch RT-qPCR nicht bestätigt werden konnten. Grün zeigt die bestätigten Genexpressionsunterschiede. DEG = differenziell exprimiertes Gen, GO = Genontologie, na = kein GO-Term detektiert.

Vergleich	Gen	GO-Term	Zeitpunkt a	Zeitpunkt b	Zeitpunkt c	Zeitpunkt d
Zeitpunkt i gegenüber unexponierter Kontrolle (Zeitpunkt e)	Solyc09g014520 (Chlorophyll a-b binding protein cp29.1, chloroplastic)	GO:0009314 response to radiation	2,028	2,175	2,722	3,449
	Solyc12g094620 (Catalase isozyme 1)	GO: 0006979 response to oxidative stress	1,766	2,297	2,233	1,514
	Solyc10g083200 (Calcium homeostasis endoplasmic reticulum protein)	GO:0006874 intracellular calcium ion homeostasis	Kein DEG	1,527	1,462	kein DEG
	Solyc10g081570 (KED-like)	na	Kein DEG	Kein DEG	Kein DEG	Kein DEG

Die RT-qPCR-Ergebnisse der neu ausgewählten Gene (Tabelle 3.26) für die Exposition 5 V/m (Szenario R\_IV) gegenüber der unexponierten Kontrolle (Zeitpunkt e = vor Exposition) sind in Abbildung 3.33 dargestellt



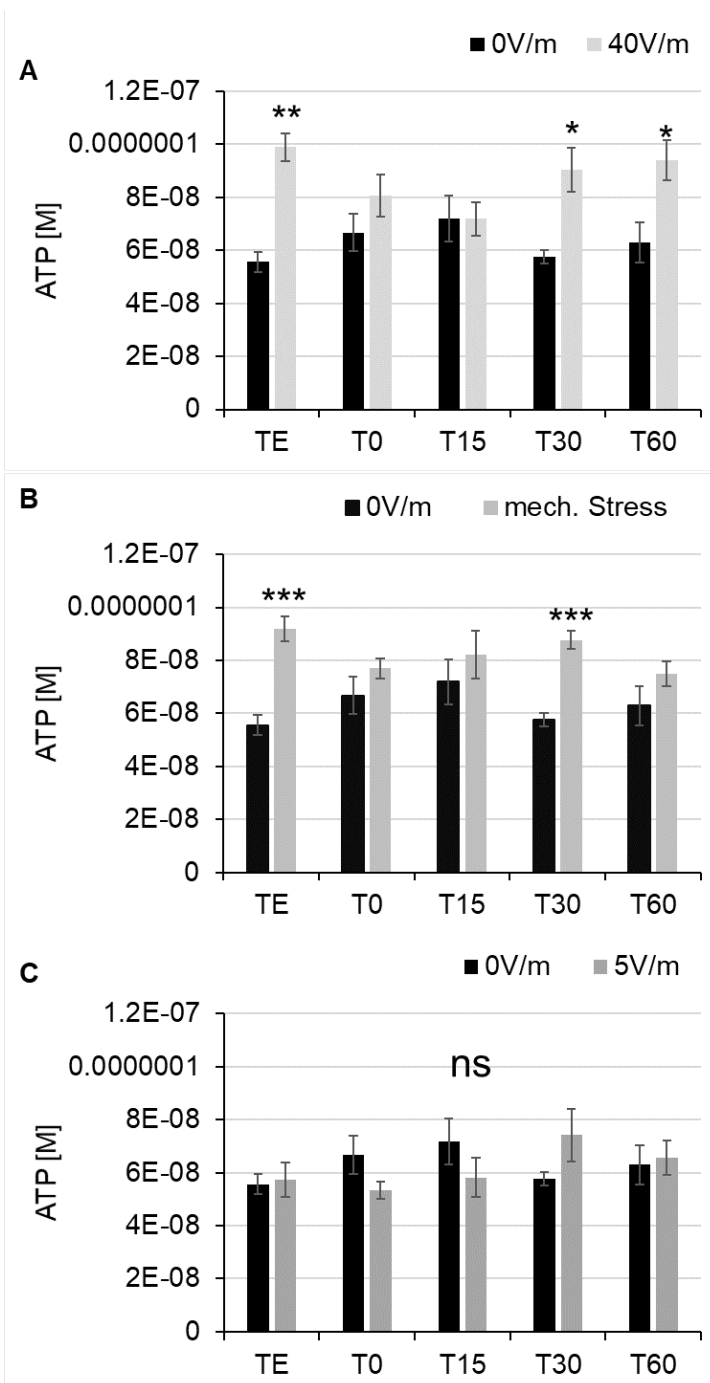
**Abbildung 3.33:** RT-qPCR-Ergebnisse weiterer, getesteter Gene des Expositionsszenarios 5 V/m (Szenario R\_IV) für jeden Zeitpunkt im Vergleich zur unexponierten Kontrolle (Zeitpunkt e). Dargestellt sind Mittelwerte der normalisierten, relativen Expressionen ( $n = 4$ )  $\pm$  Standardfehler. Kalibriert wurde auf den Mittelwert der unexponierten Kontrolle und normalisiert wurde auf drei *Housekeeping*-Gene. Unterschiedliche Buchstaben zeigen statistische Signifikanz ( $p < 0,05$ ) errechnet mit einer Varianzanalyse und anschließendem *Fisher's*-Test zur Korrektur der multiplen Testproblematik.

In Abbildung 3.33 wird ersichtlich, dass bei allen zusätzlich getesteten Genen des Expositionsszenarios 5 V/m (Szenario R\_IV) eine differenzielle Expression an zumindest einem Zeitpunkt nach HF-EMF-Exposition nachgewiesen werden konnte.

### 3.2.6. ATP-Quantifizierung

Laut Leistungsbeschreibung sollten die exponierten und mechanisch gestressten Proben zusätzlich bezüglich ihres ATP-Gehaltes analysiert werden. Auch diese Analysen zielten darauf ab, Ergebnisse einer Studie aus der Arbeitsgruppe Vian zu replizieren (Roux et al., 2008a). Dazu wurde ATP aus dem gefrorenen Blattmaterial nach einer aus der Literatur angepassten Methode extrahiert (Gaff and Ziegler, 1989; Bürstenbinder et al., 2010). Dazu wurden 100 mg gefrorenes und gemörstertes Blattmaterial (4. Blatt) abgewogen und mit 500  $\mu$ l 0,1 M HCl gemischt. Dieser Mix wurde für 5 Minuten bei 100°C und anschließend für 1 h bei 4 °C inkubiert. Nach den Inkubationen wurde 500  $\mu$ l 0,5 M BES-Puffer (pH 7,75 mit 4 M KOH eingestellt) dazugegeben und jeder Ansatz bei 16400 g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und anschließend ein weiteres Mal bei 16400 g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt. Mit 50  $\mu$ l des Überstands wurde der

ATP-Gehalt mittels des *ATP Bioluminescence Assay Kit CLSII* (Sigma-Aldrich, Bestellnummer: 11699695001) bestimmt. Der Assay läuft im 96-well Format ab. Pro Platte wurde jeweils eine frische Luciferase verwendet, sodass gewährleistet werden kann, dass potentielle Unterschiede nicht durch eine verminderte Aktivität der Luciferase zustande kommen. Zusätzlich wurde eine einheitliche Probe auf allen Platten mitgeführt, sodass eine *Interrun*-Kalibrierung möglich war. Eine ATP-Standardkurve ermöglichte die Bestimmung des ATP-Gehaltes in den jeweiligen Proben. 50 µl der Luciferase wurden automatisch pro *Sample* im Plattenlesegerät kurz vor der Messung dazugegeben. Gemessen wurde an unterschiedlichen Zeitpunkten nach Zugabe der Luciferase (1 – 10 Sekunden nach Hinzufügen der Luciferase). Pro Probe (vier biologische Replikate) wurden 3 technische Replikate auf einer Platte analysiert. Zur Auswertung wurden zuerst die Mittelwerte dieser Messungen über die Zeitpunkte und die technischen Replikate bestimmt. Anhand der Standardkurve wurde eine Funktion zur Ermittlung der ATP-Gehalte in Abhängigkeit der Konzentration erstellt. Mit Hilfe der Funktion wurde der ATP-Gehalt pro 100 mg Probe berechnet. Mittels der einheitlichen Proben auf allen Platten wurde ein *Interrun*-Kalibrator berechnet, mit dem die ATP-Gehalte normalisiert wurden. Die Vergleiche zwischen allen Expositionsszenarien sind in Abbildung 3.34 dargestellt.

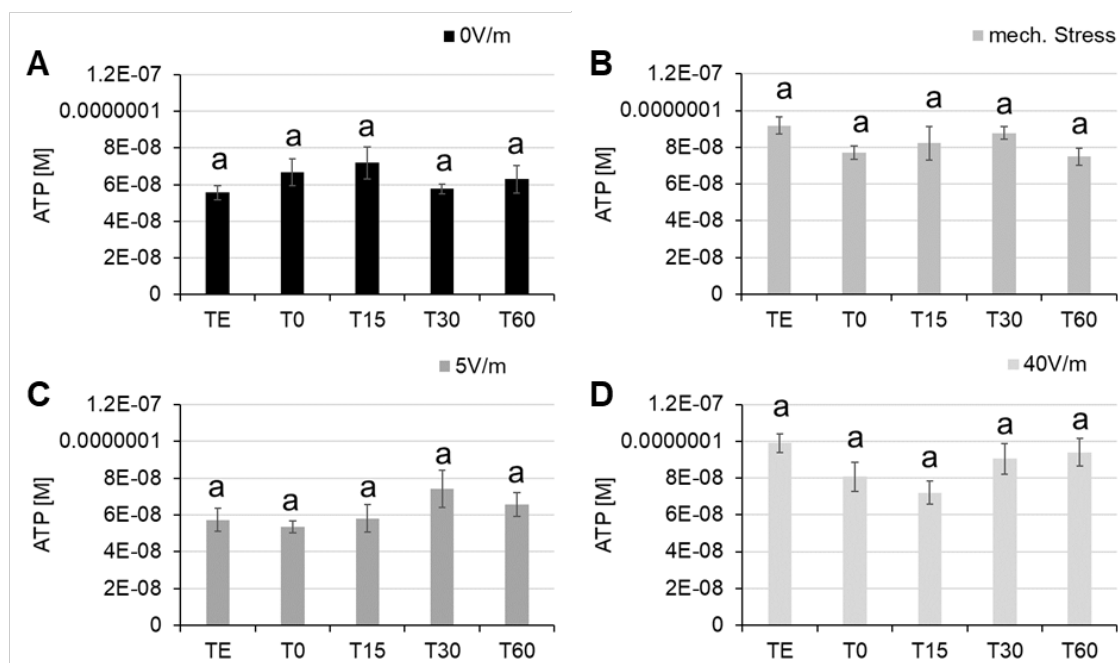


**Abbildung 3.34:** ATP-Messungen in den unterschiedlichen Expositionsszenarien und dem mechanischen Stress. A) 40 V/m (Szenario I) im Vergleich zur Scheinexposition (0 V/m = Szenario III). B) mechanischer Stress (Szenario II) im Vergleich zur Scheinexposition (0 V/m = Szenario III). C) 5 V/m (Szenario R\_IV) im Vergleich zur Scheinexposition (0 V/m = Szenario III). Dargestellt sind Mittelwerte ( $n = 4$ )  $\pm$  Standardfehler. Statistische Signifikanz wurde mit *Student's t-Test* innerhalb der jeweiligen Zeitpunkte und jeweils zwischen Stressszenario und der Scheinexposition (0 V/m) berechnet. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,005$ . mech. Stress = mechanischer Stress, ns = statistisch nicht signifikant unterschiedlich.

Auffällig ist, dass die Zeitpunkte vor Exposition (Zeitpunkt e) in den Vergleichen 40 V/m (Szenario I), Scheinexposition (0 V/m = Szenario II) und dem mechanischen Stress (Szenario II) bereits signifikante Unterschiede zeigten, was bedeutet, dass die ATP-Gehälter bereits vor Exposition signifikant unterschiedlich waren. Dies war im

Vergleich 5 V/m (Szenario R\_IV) gegenüber der Scheinexposition (0 V/m = Szenario I) nicht der Fall. Allerdings zeigten sich hier über den Zeitverlauf nach der Exposition auch keine signifikanten Unterschiede im ATP-Gehalt der Tomatenblätter. Dies zeigt, dass in unseren Studien keine Änderungen im ATP-Gehalt bei einer Exposition von 5 V/m (R\_IV) über 15 Minuten bestätigt werden konnten.

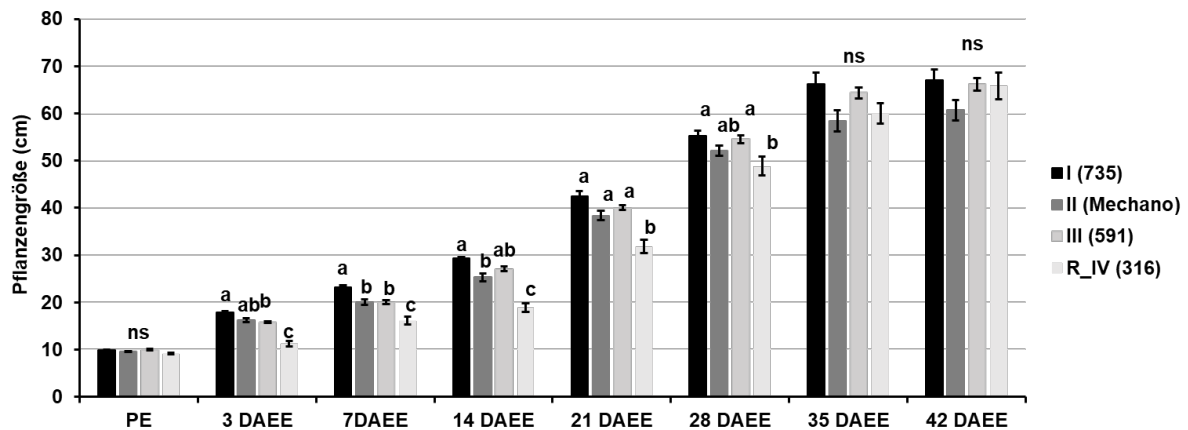
Wegen der auftretenden Unterschiede im ATP-Gehalt der unexponierten Kontrollen (Zeitpunkt e) wurde auch bei dieser Analyse der ATP-Gehalt innerhalb der einzelnen Szenarien im Vergleich zur unexponierten Kontrolle (Zeitpunkt e) bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.35 dargestellt.



**Abbildung 3.35:** ATP-Messungen innerhalb der unterschiedlichen Expositionsszenarien (Szenario I = 40 V/m, Szenario III = Scheinexposition; 0 V/m, Szenario R\_IV = 5 V/m) und dem mechanischen Stress (Szenario II) im Vergleich zu den jeweiligen unexponierten Kontrollen (Zeitpunkt e). A) 0 V/m (Szenario III). B) mechanischer Stress (Szenario II). C) 5 V/m (Szenario R\_IV). D) 40 V/m (Szenario I). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte über alle biologischen Replikate ( $n = 4$ )  $\pm$  Standardfehler. Die statistische Signifikanz zwischen den unterschiedlichen Zeitpunkten innerhalb eines Szenarios wurde mit einer Varianzanalyse und anschließendem Tukey-Test zur Kontrolle der multiplen Vergleichsproblematik bestimmt. Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede (nur einheitliche Buchstaben = a).

### 3.2.7. Phänotypische Analyse

Die nach jedem Szenario aufbewahrten Pflanzen ( $n = 6$ ) wurden zusätzlich einmal pro Woche bezüglich ihrer Wuchshöhe phänotypisiert. Dies sollte aufklären, ob mögliche Unterschiede in der Genregulation auch das Wachstum der Pflanzen über den Zeitraum ihrer Vegetationsperiode beeinflussen können. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.36 dargestellt.



**Abbildung 3.36:** Phänotypisierung der Tomatenwuchshöhe der aufbewahrten Pflanzen der Expositionsszenarien und des mechanischen Stresses. Phänotypisiert wurde 3 und 7 Tage nach Expositionsende und anschließend einmal pro Woche bis die Pflanzen ausgereift waren (bis 42 Tage nach Ende der Exposition = DAEE). Dargestellt sind Mittelwerte ( $n = 6$ )  $\pm$  Standardfehler. Unterschiedliche Buchstaben bedeuten statistische Signifikanz innerhalb eines Zeitpunktes ( $p < 0,05$ ) nach Varianzanalyse und *post-hoc* Tukey-Test. DAEE = Tage nach Expositionsende, PE = Vortag der Exposition, ns = statistisch nicht signifikant unterschiedlich. Expositionsszenarien (in Klammern sind die jeweiligen Startcodes zum Starten der Expositionsoftware angegeben): I = 40 V/m, II = mechanischer Stress (Mechano), III = Scheinexposition (0 V/m), R\_IV = 5 V/m.

Abbildung 3.36 zeigt, dass bereits kurz nach Expositionsende die 5 V/m Exposition (Szenario R\_IV) zu statistisch signifikant geringerem Pflanzenwachstum im Vergleich zu allen anderen Bedingungen führt. Diese Wachstumshemmung wird bis zum Ende der Vegetationsperiode allerdings wieder korrigiert. Gleichzeitig führt die Exposition mit 40 V/m (Szenario I) zu einer kurzfristigen Wachstumssteigerung der Tomatenpflanzen. Auch dies gleicht sich über die Zeitdauer der Tomatenentwicklung wieder aus (Abb. 3.36).

## Arbeitspaket 4 Systemische Reaktion

### 4.1. Einleitung und Zielsetzung

Im Arbeitspaket 4 (AP4) sollte untersucht werden, ob es sich bei der Reaktion von Tomaten auf HF-EMF um eine systemische Reaktion handelt, wie in einer Studie der Vian-Gruppe aus 2007 gezeigt wurde (Beaubois et al., 2007). Dazu sollten Tomaten, wie in AP3, für 15 Minuten exponiert werden (900 MHz) und Blätter nach 0, 15, 30 und 60 Minuten beprobt werden. Um systemische Reaktionen zu untersuchen, sollte abweichend zu AP3 das erste Blatt (L1 = ältestes Blatt) exponiert bzw. mechanisch gestresst werden. Nach den angegebenen Zeiten wurden dann sowohl L1 als auch das vierte Blatt (L4 = jüngstes Blatt) beprobt, um zu untersuchen, ob eine Exposition ausschließlich des ältesten Blattes (L1) zu ähnlichen HF-EMF-Effekten sowohl am ältesten, exponierten Blatt (L1) als auch am jüngsten, nicht-exponierten Blatt (L4) führt. Es sollte nur diejenige elektrische Feldstärke verwendet werden, die in AP3 zu den stärksten Reaktionen führte und es sollten folgende Expositions- und Stressszenarien verblindet durchgeführt werden:

- Scheinexposition (kein Feld + gesamte Pflanze geschirmt)
- Exposition + gesamte Pflanze geschirmt
- Exposition + Pflanze mit der Ausnahme eines Blattes geschirmt
- Mechanische Beschädigung eines Blattes als Positivkontrolle

Um die Rolle bestimmter Signalwege zu prüfen, sollte die Versuchsreihe einmal mit unbehandelten Tomaten, einmal mit Pflanzen, bei denen die Synthese von Abszissinsäure durch Naproxen blockiert wurde, und einmal mit Pflanzen, bei denen Kalziumsignalkaskaden durch Ethylenglycolbis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA) und Lanthan(III)-chlorid (LaCl<sub>3</sub>) blockiert wurden, durchgeführt werden. Anschließend sollte unter allen experimentellen Bedingungen die Expression von *bZIP* und *PI* mittels RT-qPCR in den exponierten bzw. verletzten sowie in den geschirmten bzw. unverletzten Blättern quantitativ bestimmt werden.

### 4.2. Versuchsdurchführung, Methodik, und Ergebnisse

Für die kontrollierte Exposition von Pflanzen mit HF-EMF (900 MHz, verschiedene Feldstärken) wurde auch in AP4 die unter Arbeitspaket 2 beschriebene Modenverwirbelungskammer verwendet.

#### 4.2.1. Versuchsaufbau in AP4 allgemein

##### 4.2.1.1. Expositions- und Stressszenarien

Da es in AP3 zu einigen technischen Schwierigkeiten kam und die Verblindung während der Durchführung von AP4 noch nicht gelöst war, konnte die elektrische Feldstärke, die in AP3 zu den stärksten Reaktionen führte, nicht rechtzeitig bestimmt werden. Deswegen wurden die Versuchsreihen in AP4 mit beiden möglichen Feldstärken (5 V/m und 40 V/m) durchgeführt, was über die im Angebot vorgesehene Menge an Versuchsszenarien hinausging.

Folglich wurden insgesamt 11 Expositions- und Stressszenarien durchgeführt. Diese waren:

- Exposition 900 MHz; 5 V/m; 15 Minuten: Gesamte Pflanze exponiert
- Exposition 900 MHz; 5 V/m; 15 Minuten: Gesamte Pflanze geschirmt
- Exposition 900 MHz; 40 V/m; 15 Minuten: Gesamte Pflanze exponiert
- Exposition 900 MHz; 40 V/m; 15 Minuten: Gesamte Pflanze geschirmt
- Scheinexposition 900 MHz; 0 V/m; 15 Minuten: Gesamte Pflanze exponiert
- Scheinexposition 900 MHz; 0 V/m; 15 Minuten: Gesamte Pflanze geschirmt
- Mechanischer Stress am jüngsten Tomatenblatt (L4)
- Exposition 900 MHz; 5 V/m; 15 Minuten: Ältestes Tomatenblatt (L1) exponiert; Rest der Pflanze geschirmt
- Exposition 900 MHz; 40 V/m; 15 Minuten: Ältestes Tomatenblatt (L1) exponiert; Rest der Pflanze geschirmt
- Scheinexposition 900 MHz; 0 V/m; 15 Minuten: Ältestes Tomatenblatt (L1) scheinexponiert; Rest der Pflanze geschirmt
- Mechanischer Stress am ältesten Tomatenblatt (L1)

##### 4.2.1.2. Chemikalienbehandlung allgemein

Das Pflanzenhormon Abszisisäure (ABA) spielt vor allem bei Stressreaktionen eine entscheidende Rolle und wurde von der Arbeitsgruppe Vian als wichtiger Vermittler der beobachteten systemischen Reaktionen der *bZIP*- und *PI*-Genexpressionsänderungen nach HF-EMF-Exposition detektiert. Zur Replikation dieser Ergebnisse wurde, wie auch in der zu replizierenden Vian-Studie, ABA mittels Naproxen (Sigma-Aldrich, Bestellnummer: 284785-25G) blockiert. Die zu verwendende Konzentration war 1 mM. Da, wie angeboten, unsere Versuche in Erde

durchgeführt wurden und nicht in hydroponischen Kulturen, wurde abweichend zur Vian-Studie, die Chemikalie vergossen. Dies geschah 15 Stunden vor Exposition oder Stressapplikation. Naproxen ist in Wasser unlöslich und musste in Ethanol gelöst werden. Deswegen wurden als Kontrolle Pflanzen verwendet, die mit der entsprechenden Ethanolverdünnung gegossen wurden.

Kalzium wurde mittels EGTA cheliiert und mittels  $\text{LaCl}_3$  blockiert (beide in Konzentrationen von 1 mM). Dieser Kalziumblocker (Kombination aus beiden Chemikalien) sollte versprüht werden. In der Vian-Studie wurde 30 Minuten nach Applikation des Kalziumblockers exponiert, beziehungsweise mechanisch gestresst. Da in unseren Versuchen, die besprühten Blätter noch sehr nass waren, wurde erst nach 60 Minuten exponiert/mechanisch gestresst. EGTA musste in Natriumhydroxid gelöst werden. Deswegen wurden als Kontrolle Pflanzen verwendet, die mit der entsprechenden Natriumhydroxidverdünnung besprüht wurden.

#### 4.2.1.3. Beprobung allgemein

Für jedes Expositions- und Stressszenario und für jede Chemikalienbehandlung wurden fünf Zeitpunkte beprobt, nämlich vor Exposition, 0 Minuten nach Exposition, 15 Minuten nach Exposition, 30 Minuten nach Exposition, und 60 Minuten nach Exposition. Abhängig vom Expositionsszenario wurde entweder nur das jüngste Blatt (L4 bei Gesamtexposition) oder das älteste und das jüngste Blatt (L1 und L4 bei Einzelblattexposition) beprobt. Für jeden Beprobungszeitpunkt pro Expositions-/Stressszenario und pro Chemikalienbehandlung wurden jeweils drei Pflanzen (d.h. 3 Replikate) beprobt. Somit wurden in jedem Expositions- und Stressszenario jeweils 60 Pflanzen verwendet. Analog zu AP3 wurden den einzelnen Beprobungszeitpunkten Buchstaben zugeordnet (a – e). Dies erleichterte zusätzlich die experimentelle Durchführung. Eine Übersicht zur Beprobung inklusive der Beprobungszeitpunkte ist in Tabelle 4.1 angegeben.

**Tabelle 4.1:** Übersicht zur Beprobung der einzelnen Versuchsszenarien.

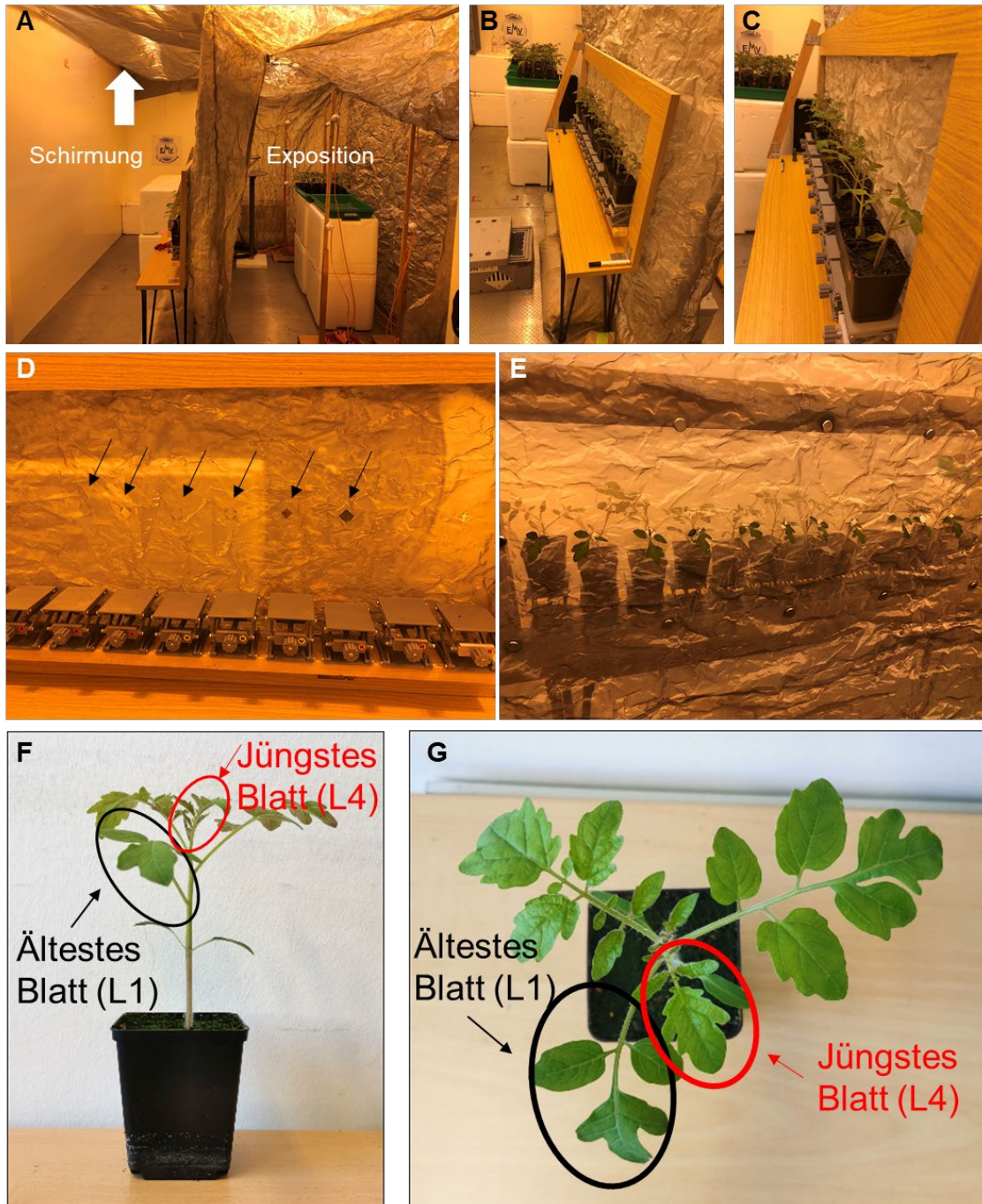
Expositions- /Stressszenario	Chemikalienbehandlung	Abkürzung Zeitpunkt	Zeitpunkt	Anzahl beprobter Pflanzen
alle	Kontrolle (ABA) ABA-Block Kontrolle (Kalzium) Kalziumblocker	e	Kontrollzeitpunkt = vor Exposition	3
		a	0 Minuten nach Exposition	3
		b	15 Minuten nach Exposition	3
		c	30 Minuten nach Exposition	3
		d	60 Minuten nach Exposition	3

#### 4.2.2. Modifizierung der Modenverwirbelungskammer

Zur Untersuchung systemischer Reaktionen sollte getestet werden, ob eine Exposition ausschließlich des ältesten Blattes (L1) zu ähnlichen HF-EMF-Effekten sowohl am ältesten, exponierten Blatt (L1) als auch am jüngsten, nicht-exponierten Blatt (L4) führt. Dazu mussten sowohl die Modenverwirbelungskammer als auch die Klimakammer modifiziert werden, sodass es unter anderem möglich war, einzelne Blätter in das Expositionszelt einzuführen.

##### 4.2.2.1. Abtrennung, Exposition, und Schirmung durch *MeshArt Soft Silver*

Zunächst wurde mit dem Material des Expositionszeltes (*MeshArt Soft Silver*, Dorstener Drahtwerke H.W. Brune & Co. GmbH) ein weiterer Abschnitt innerhalb der Klimakammer, aber außerhalb der Modenverwirbelungskammer, abgedeckt. In diesem Bereich sollten die Pflanzen positioniert werden, wobei die ersten Blätter durch Aussparungen in der Zeltwand gesteckt werden. Zusätzlich wurden weitere LED-Leuchten oberhalb dieses Gewebematerials angebracht, um die Lichtbedingungen innerhalb und außerhalb des Expositionszelts vergleichbar zu halten (Abb. 4.1A; Abb. 4.2A).



**Abbildung 4.1:** Modifizierungen der Modenverwirbelungskammer und der Klimakammer zur Untersuchung von systemischen Reaktionen auf Tomaten und Entwicklung der untersuchten Tomaten. A) Abtrennung der Klimakammer außerhalb der Modenverwirbelungskammer mit dem Material der Modenverwirbelungskammer, um gleiche Lichtbedingungen innerhalb und außerhalb der Modenverwirbelungskammer zu gewährleisten. Weißer Pfeil deutet auf die Anbringung des Zeltmaterials außerhalb der Modenverwirbelungskammer. B) Fenstervorrichtung außerhalb der Modenverwirbelungskammer um Blätter von 12 Pflanzen in die Modenverwirbelungskammer durchführen zu können. C) Sicht von außerhalb der Modenverwirbelungskammer auf die Fenstervorrichtung mit 12 Pflanzen, bei denen das älteste Blatt (L1) in die Modenverwirbelungskammer eingebracht wurde, D) Frontalblick auf die Fenstervorrichtung außerhalb der Modenverwirbelungskammer ohne Pflanzen. Die schwarzen Pfeile deuten auf die eingeschnittenen Aussparungen zur Durchführung von einzelnen Blättern. E) Sicht von innerhalb der Modenverwirbelungskammer auf die Fenstervorrichtung mit 12 Pflanzen bei denen das älteste Blatt (L1) in die Modenverwirbelungskammer eingeführt wurde. F) Frontalaufnahme einer Tomatenpflanze 3 Wochen nach Aussaat. Hervorgehoben sind die Positionen des ältesten Blattes (L1) und des jüngsten Blattes (L4). G) Blick von oben auf eine 3 Wochen alte Tomatenpflanze. Hervorgehoben sind die Positionen des ältesten Blattes (L1) und des jüngsten Blattes (L4).

#### 4.2.2.2. Fenster zur Exposition des ersten Blattes

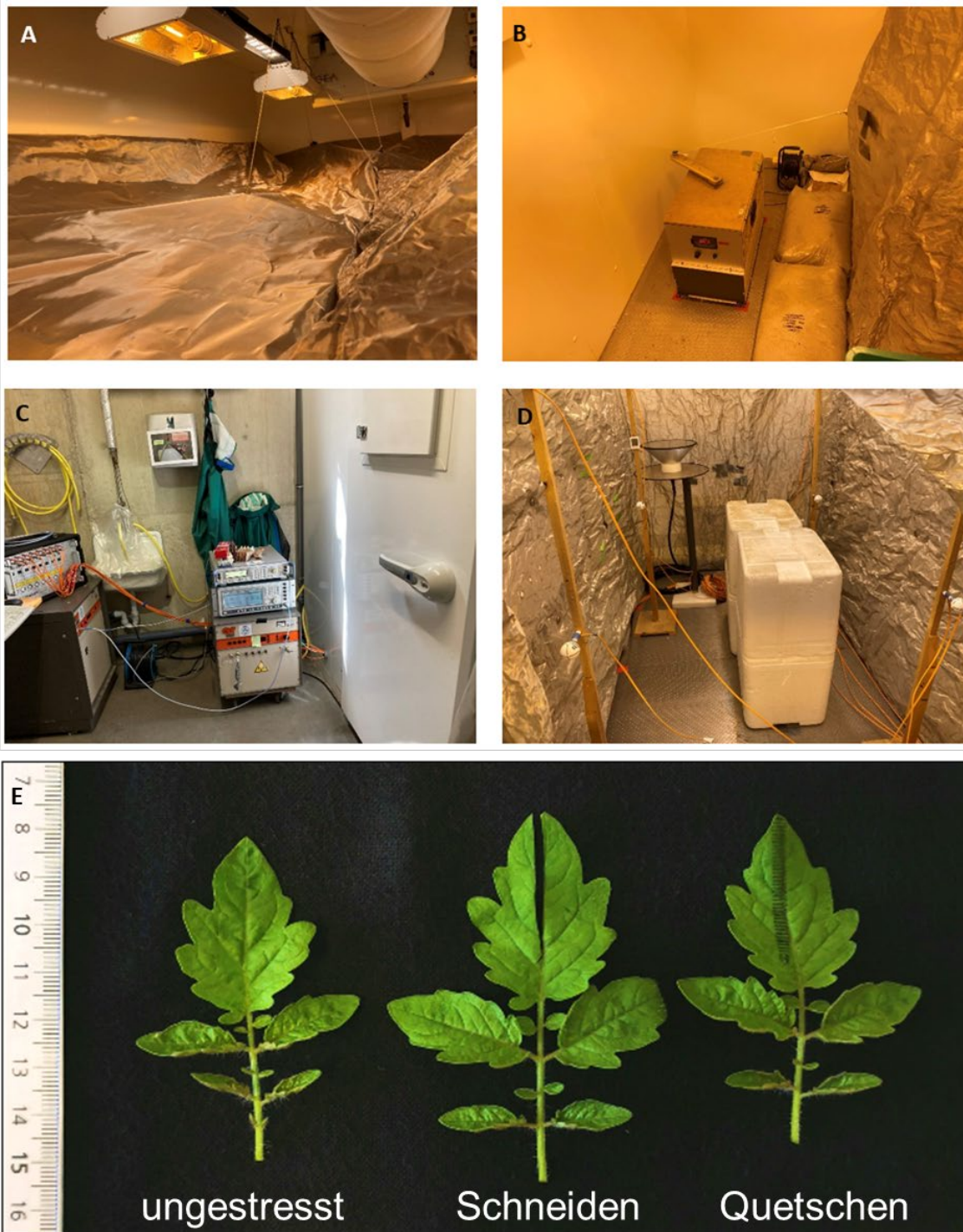
Um einzelne Blätter exponieren zu können, musste es möglich sein, einzelne Blätter von außerhalb des Expositionszeltes in das Zelt einzuführen, und die eingeführten Blätter durften während einer Exposition durch Bewegungen der Wände nicht verletzt oder gar abgerissen werden. Zur Einführung einzelner Blätter wurden pro Durchführung (insgesamt 12) vier ca. 0,5 cm große Schnitte kreuzweise in das Expositionszelt geschnitten, die aufgeklappt ein Quadrat ergaben (Abb. 4.1D). So konnten die gefiederten ersten Blätter möglichst unverletzt in das Zelt eingebracht werden (Abb. 4.1E), aber die Durchführung auch möglichst klein gehalten werden. Um die Bewegung an der Wand des Expositionszeltes, an der die Pflanzenblätter durchgeführt wurden, möglichst gering zu halten, wurde ein Stickrahmen-Prinzip realisiert (Abb. 4.1B-E). Die Größe wurde so gewählt, dass gleichzeitig 12 Pflanzen (Topfgröße 7 x 7 cm) exponiert werden konnten. Der Rahmen wurde zum einen auf einem kleinen Tisch befestigt, auf dem die Tomaten in ausreichender Höhe zum Boden platziert werden konnten, und zum anderen mit Magneten an der Wand des Expositionszeltes befestigt (Abb. 4.1E). Da die 12 Durchführungslöcher nur einmal ins Expositionszelt geschnitten werden konnten, wurden kleine Hebebühnen entworfen, die die Tomatenpflanzen gegebenenfalls auf die richtige Höhe zur Durchführung von L1 in das Expositionszelt anheben konnten (Abb. 4.1B – D).

Vor Durchführung der Expositionsexperimente wurde die Gleichförmigkeit des elektrischen Feldes für ein vergrößertes Prüfvolumen ermittelt. Dazu wurden die vier Feldsonden der linken Seite des Prüfvolumens so weit nach links versetzt, dass sie in einer Entfernung von einer Viertelwellenlänge (ca. 90 mm bei 900 MHz) von der Wand der Modenverwirbelungskammer positioniert sind, an der der Rahmen zur Durchführung der Pflanzenblätter installiert ist (Abb. 4.2D). Die Ergebnisse der Ermittlung der Gleichförmigkeit des Feldes nach IEC 61000-4-21, 2011 sind in Tabelle 4.2 dargestellt. Daraus ist ersichtlich, dass die normgemäßen Abweichungen (< 3 dB) eingehalten wurden.

**Tabelle 4.2:** Indikatoren für die Gleichförmigkeit des Feldes für ein vergrößertes Arbeitsvolumen (siehe auch Abbildung 4.2D).

$\sigma_{8,x}$	$\sigma_{8,y}$	$\sigma_{8,z}$	$\sigma_{24}$
1,11 dB	1,41 dB	1,71 dB	1,41 dB

Es sollte beachtet werden, dass die durchgesteckten Einzelblätter dabei durch den geringen Abstand zur Wand der Modenverwirbelungskammer einer geringeren als der Testfeldstärke innerhalb des Arbeitsvolumens ausgesetzt sind. Diese Problematik trat auch in der Vian-Studie auf, da ein geringerer Abstand als eine Viertelwellenlänge zu einer metallischen Berandung immer zu einer signifikanten Abschwächung der Tangentialkomponente des elektrischen Feldes führt. Somit ist unser Versuchsaufbau für die Replikation der Vian-Studie geeignet. Die ersten Tomatenblätter (L1) sind im Schnitt ca. 10 cm lang und ragen somit maximal 5 - 6 cm in das Expositionszelt hinein, jedoch nicht in das Arbeitsvolumen. Folglich ist das exponierte Blatt einem nicht statistisch homogenen und isotropen Feld ausgesetzt, wie es innerhalb des Arbeitsvolumens der Fall wäre.



**Abbildung 4.2:** Weitere Modifizierungen der Modenverwirbelungskammer für Arbeitspaket 4 und Darstellung der mechanischen Stressapplikationen an Tomaten. A) Blick oberhalb des installierten Zeltmaterials. B) Positionierung der Motorbox auf die der Rückwand der Anzuchtammer zugewandten Seite der Modenverwirbelungskammer. C) Anordnung des Verstärkers, des Signalgenerators, und der Feldsondenbox außerhalb der Pflanzenanzuchtammer. D) Anordnung der Feldsonden innerhalb der Modenverwirbelungskammer zur Überprüfung der statistischen Gleichförmigkeit des Feldes (Gleichförmigkeit = Isotropie und Homogenität) in einem größeren Arbeitsvolumen. E) Beispielfoto von verschiedenen vierten Tomatenblättern (3-Wochen alt). Links: ungestress. Mitte: mechanisch gestress durch Anschneiden. Rechts: mechanisch gestress durch Quetschen mit einer Arterienklemme.

#### 4.2.2.3. Motorbox und Bewegung der Hinterwand

Aufgrund des benötigten Platzes für die Installation des Rahmens zur Durchführung der Blätter wurde die Motorbox zur Bewegung der Wände der Modenverwirbelungskammer auf die der Rückwand der Anzuchtammer zugewandten Seite der Modenverwirbelungskammer verlegt (Abb. 4.2B). Außerdem wurden sämtliche Geräte zur Felderzeugung und -erfassung außerhalb der Pflanzenanzuchtammer aufgebaut (Abb. 4.2C). Für die in AP4 durchgeführten Experimente stand weiterhin eine andere Version des Feldsondensystems zur Verfügung (Lumiloop LSProbe 2.0). Dabei handelt es sich um das Nachfolgemodell der in den vorherigen Arbeitspaketen eingesetzten LSProbe 1.2. Durch die im Vergleich zum Vorgängermodell vergrößerte Bandbreite (Frequenzbereich: 9 kHz bis 18 GHz) besitzt dieses Modell allerdings ein höheres Grundrauschlevel, was sich auf die Messkurven zur Scheinexposition auswirkt. Das erhöhte Grundrauschlevel wirkt sich nicht auf die Expositionen mit den Feldstärken 5 V/m und 40 V/m aus.

#### 4.2.3. Verblindung, und Szenarien

Den genannten Expositionsszenarien wurden, wie in AP3, von der TU Braunschweig Startcodes für das Starten der *Fields'n'Roses* Software zur Bedienung der Modenverwirbelungskammer zugeordnet. Für Details, siehe Arbeitspaket 2. Die Zuordnung der Expositionsszenarien zu den Startcodes blieb den Versuchsdurchführenden an der Uni Bonn verborgen. Um die praktische Durchführung zu erleichtern, wurden die einzelnen, durchzuführenden Expositionen- und Stressszenarien fortlaufend durchnummeriert. Die Zuordnung der fortlaufenden Szenarien zu den entsprechenden Startcodes ist in Tabelle 4.3 angegeben.

**Tabelle 4.3:** Zuordnung der verschiedenen Szenarien zu den Startcodes und dem mechanischen Stress, sowie Datumsangabe des Versuchstags. L1 = erstes und ältestes Blatt, L4 = viertes und jüngstes Blatt. \* ein mechanischer Stress wurde immer innerhalb der Modenverwirbelungskammer und ohne Scheinexposition durchgeführt.

Szenario- Nummer	Bedingung	Datum	Exposition, Schirmung, oder mechanischer Stress: Beprobung Blatt
1	Startcode: 961	18.07.2024	Gesamte Pflanze exponiert: L4
2	Startcode: 961	19.07.2024	Gesamte Pflanze geschirmt: L4
3	Startcode: 218	06.08.2024	Gesamte Pflanze exponiert: L4
4	Startcode: 218	06.08.2024	Gesamte Pflanze geschirmt: L4
5	Startcode: 602	08.08.2024	Nur ältestes Blatt (L1) exponiert: L1, L4

Szenario- Nummer	Bedingung	Datum	Exposition, Schirmung, oder mechanischer Stress: Beprobung Blatt
6	Startcode: 490	16.07.2024	Nur ältestes Blatt (L1) exponiert: L1, L4
7*	Mechanischer Stress durch Quetschen des 1. Blatts	22.07.2024	Mechanischer Stress am ältesten Blatt (L1): L1, L4
8	Startcode: 436	07.08.2024	Gesamte Pflanze exponiert: L4
9	Startcode: 436	07.08.2024	Gesamte Pflanze geschirmt: L4
10	Startcode: 832	17.07.2024	Nur ältestes Blatt (L1) exponiert: L1, L4
11*	Mechanischer Stress durch Quetschen des 4. Blatts	09.08.2024	Mechanischer Stress am jüngsten Blatt (L4): L4

#### 4.2.4. Tomatenaufzucht

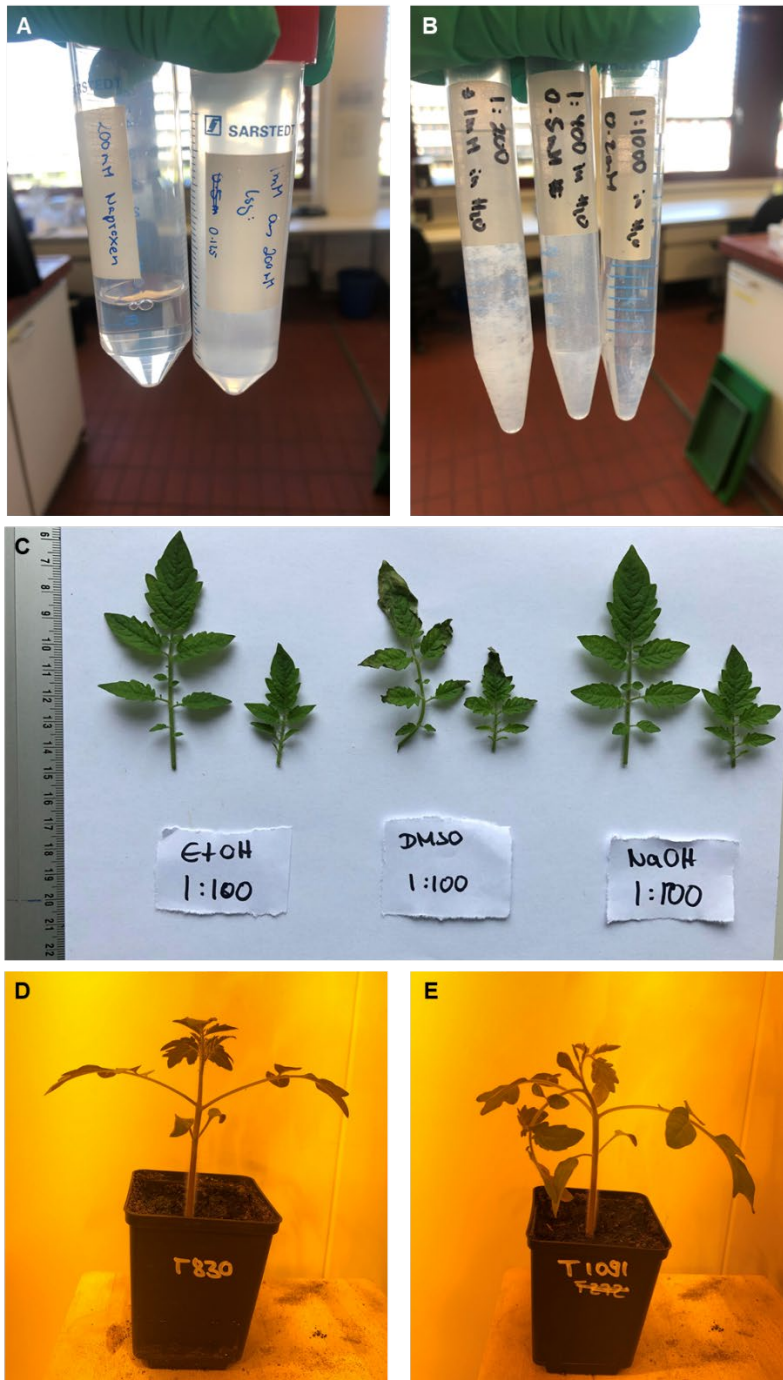
Die Tomatenaufzucht erfolgte analog zur detailliert beschriebenen Tomatenaufzucht im Arbeitspaket 3. Auch in AP4 wurde die Tomatensorte Sweet-100 verwendet (Alonge et al., 2022) und die Tomaten waren bei Exposition bzw. Stressapplikation 3 Wochen alt. Das 4. Blatt war gerade entwickelt.

#### 4.2.5. Chemikalienbehandlung

Zur Untersuchung, ob ABA- oder Kalzium-abhängige Signalkaskaden, an potentiellen HF-EMF-induzierten Genänderungen beteiligt sind, wurden diese Signalwege mit Chemikalien blockiert. Es wurde Naproxen zur Störung der ABA-Biosynthese, sowie EGTA in Kombination mit  $\text{LaCl}_3$  zur Störung der Kalziumsignalkaskade verwendet. Die verwendeten Konzentrationen waren analog zu den replizierenden Studien. Es sei erwähnt, dass Naproxen sehr schlecht wasserlöslich ist und somit in Ethanol gelöst werden musste. Auch mit Ethanol konnte aufgrund der Löslichkeit nur maximal eine Konzentration von 200 mM erreicht werden. Es fiel auf, dass bei Verdünnung der 200 mM Stammlösung auf eine 1 mM Arbeitslösung mit Wasser, die Chemikalie ausfiel, was sich an einer weißlichen Trübung der Lösung zeigte (Abb. 4.3A). Ein Ausfallen der Lösung blieb nur bei einer Verdünnung ab 1:1000 aus, was zu einer maximalen Konzentration von 0,2 mM führte (Abb. 4.3B). Es ist zu vermuten, dass diese Limitierung der Naproxen-Löslichkeit auch bei der zu replizierenden Studie der Arbeitsgruppe Vian auftrat. Da die Vian-Studie repliziert werden sollte, wurde das Ausfallen der 1 mM Naproxen-Lösung in Kauf genommen. Quantifizierung unterschiedlicher Hormonkonzentrationen zeigte, dass trotz Ausfallen der Chemikalie bei 1 mM keine geringeren Effekte auf die ABA-Konzentration erzielt wurden, als mit der vollständig gelösten 0,2 mM Konzentration (Tabelle 4.4). Die 1 mM Naproxen-

Lösung wurde durch eine 1:200 Verdünnung aus der 200 mM Naproxen-Stammlösung mit Wasser hergestellt. Da Naproxen in Ethanol gelöst werden musste, wurde als Kontrolle eine 1:200 Verdünnung von Ethanol in Wasser verwendet. Da diese Chemikalie am Vortag eingegossen wurde, wurde zusätzlich überprüft, ob es bereits durch Gießen mit der Ethanol-Kontrolle zu morphologischen Änderungen bei den Tomatenpflanzen kommt. Dies war nicht der Fall (Abb. 4.3C). Zusätzlich wurde eine Verdünnung/Löslichkeit mit Dimethylsulfoxid (DMSO) versucht, was aber zu morphologischen Änderungen der Tomatenblätter führte und somit verworfen wurde (Abb. 4.3C). Auch das Eingießen der Naproxenlösung (ABA-Block) führte zu deutlichen morphologischen Änderungen im Vergleich zur Ethanolkontrolle (Abb. 4.3D-E). Die Naproxen-behandelten Pflanzen zeigten ein deutliches Herunterhängen der Blätter (Abb. 4.3E). Es ist davon auszugehen, dass solche Chemikalien-Behandlungen bereits die Genexpression von Pflanzen vor jeglicher Stressbehandlung beeinflussen.

Für die Blockade des Kalziumsignalwegs durch  $\text{LaCl}_3$  und EGTA wurden Konzentrationen von jeweils 1 mM verwendet.  $\text{LaCl}_3$  konnte in Wasser gelöst werden, EGTA wurde in 1M Natriumhydroxid (NaOH) gelöst. Es wurde eine 250 mM EGTA Lösung in einer 1M NaOH-Stammlösung angesetzt, sodass die Kontrollbedingung eine 250-fache Verdünnung von 1M NaOH in Wasser war. Hier wurden keine Auffälligkeiten bei den Löslichkeiten beobachtet. Auch führte die Behandlung von Tomatenpflanzen mit der Kontrolllösung (1:250 NaOH) zu keinen morphologischen Veränderungen der Blätter (Abb. 4.3C; hier ist das Ausbleiben von morphologischen Veränderungen mit einer 100-fachen NaOH-Verdünnung gezeigt).



**Abbildung 4.3:** Chemikalienbehandlung von Tomaten. A) Löslichkeit einer 200 mM Naproxen-Lösung (in Ethanol gelöst) und einer 1 mM Naproxen-Lösung aus der 200 mM Stock-Lösung mit Wasser verdünnt (es ist zu beachten, dass die 1 mM Naproxen-Lösung ausfällt = weiß-trüber Niederschlag). B) Unterschiedlich hohe Verdünnungen der 200 mM Naproxen-Stocklösung. Nur die 1: 1000-fache Verdünnung mit Wasser (0,2 mM) löst sich vollständig (das heißt kein weiß-trüber Niederschlag). C) Tomatenblätter nach Gießen einer Gesamtpflanze mit den angegebenen Lösungen (1:100-fache Verdünnung Ethanol, 1:100-fache Verdünnung DMSO, 1:100-fache Verdünnung Natriumhydroxid) und einer Einwirkzeit über Nacht. D) Tomatenpflanze nach Gießen mit einer 1:100-fachen Verdünnung Ethanol und einer Einwirkzeit von 15 Stunden. E) Tomatenpflanze nach Gießen einer 1:200-fachen Verdünnung Naproxen und einer Einwirkzeit von 15 Stunden. Es ist zu beachten, dass die Blätter in E deutlich mitgenommen aussehen im Vergleich zu D (Herunterhängen der Blätter).

#### 4.2.6. Hormonanalysen

Es wurden Konzentrationen unterschiedlicher Hormone nach Naproxen- und nach der entsprechenden Kontrollbehandlung mittels Flüssigchromatographie in Verbindung mit der Massenspektrometrie (LC-MS) bestimmt (Tabelle 4.4). Zu den Hormonen gehörten Vertreter der Jasmonsäure, Abszisinsäure, Ethylen, Vertreter der Gibberellinsäure (GA<sub>12</sub> und GA<sub>53</sub>), Auxin, und Salizylsäure.

**Tabelle 4.4:** Ergebnisse der Hormonmessungen nach Naproxen oder Ethanol-Behandlung. Angegeben sind die Mittelwerte (n = 4) ± Standardfehler der gemessenen Hormonkonzentrationen in den jeweiligen Behandlungen. Die statistische Signifikanz wurde mit *Student's t*-test zwischen der Naproxen-Behandlung und der jeweiligen Ethanol-Kontrolle ermittelt und ist mit Sternchen in den Naproxenbehandlungen angegeben (1 mM Naproxen im Vergleich zu 1:200 Ethanol und 0,2 mM Naproxen im Vergleich zu 1:1000 Ethanol). Zusätzlich wurde eine Varianzanalyse mit anschließendem Tukey-Test ( $p < 0,05$ ) durchgeführt, um die Effekte der unterschiedlichen Naproxenkonzentrationen zu vergleichen. Unterschiedliche Buchstaben bedeuten statistisch signifikante Unterschiede. Diese werden in Klammern nach den entsprechenden Mittelwerten angegeben. ABA = Abszisinsäure; 1-ACC = 1-Aminocyclopropan-carbonsäure; EtOH = Ethanol; GA = Gibberellinsäure; IAA = Indol-3-Essigsäure (Auxin), JA = Jasmonsäure, n = Probenanzahl, 12OHJA = 12-Hydroxy-Jasmonsäure, SA = Salizylsäure. \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,005$ ; ns = statistisch nicht signifikant.

Chemikalien-behandlung	Naproxen 1 mM	EtOH_1:200 Kontrolle	Naproxen 0,2 mM	EtOH_1:1000 Kontrolle
12OHJA	739,8 (b) ± 18,3***	1107 (a) ± 31,9	1150,2 (a) ± 21 ns	1099,5 (a) ± 27,5
JA	138,3 (a) ± 11,4***	0,01 (b) ± 0	124,9 (a) ± 10,5***	0,01 (b) ± 0
1-ACC	763,7 (a) ± 71,8 ns	747 (a) ± 62,3	653,3 (a) ± 66,8 ns	536,5 (a) ± 85,8
ABA	229,8 (b) ± 16,7**	593,7 (a) ± 44,67	350,5 (b) ± 14,61***	557 (a) ± 12,6
GA12	38,4 (a) ± 4,3 ns	45,3 (a) ± 3,9	39,2 (a) ± 3,2 ns	40,3 (a) ± 3,6
GA53	51,3 (a) ± 2,1***	19,4 (c) ± 2,6	37,4 (b) ± 1,7***	15,7 (c) ± 0,7
IAA	42,5 (a) ± 3,8 ns	49 (a) ± 3,8	48,3 (a) ± 4,5 ns	54,8 (a) ± 4,4
SA	137,9 (a) ± 6,7 ns	136,1 (a) ± 3,1	123,3 (a) ± 8,1 ns	144,7 (a) ± 7,6

Die Hormonmessungen ergaben, dass 1 mM Naproxen zu Veränderungen mehrerer Hormonkonzentrationen führt und somit nicht nur die Abszisinsäure-Signalkaskade blockiert wird. Nach 1 mM Naproxen-Behandlung kam es zusätzlich zu einer Erhöhung der Jasmonsäurekonzentration und einer Konzentrationsreduktion des Jasmonsäurederivats 12-Hydroxy-Jasmonsäure (12OHJA). Die Konzentration von GA<sub>53</sub>, ein Vorläuferprodukt im Gibberellinsäurebiosyntheseweg, ist zusätzlich nach 1 mM Naproxen-Zugabe signifikant erhöht im Vergleich zur Ethanolkontrolle (Tabelle 4.4). Bis auf die Reduktion der 12OHJA-Konzentrationen wurden die genannten Änderungen in den Konzentrationen von Jasmonsäure, GA<sub>53</sub>, und Abszisinsäure auch bei einer Zugabe von 0,2 mM Naproxen gemessen.

#### 4.2.7. Durchführung und Probennahme

##### 4.2.7.1. Gesamtexpositions- und Stressszenarien (Szenario 1, 2, 3, 4, 8, 9, 11)

Diese Szenarien galten als Replikation von AP3. Hier wurden jeweils entweder die gesamten Pflanzen HF-EMF ausgesetzt (Szenarios 1, 3, 8) und befanden sich in der Modenverwirbelungskammer (Abb. 4.1A; Abschnitt: Exposition) oder die gesamten Pflanzen waren geschirmt (Szenarios 2, 4, 9) und befanden sich außerhalb der Modenverwirbelungskammer (Abb. 4.1A; Abschnitt: Schirmung), während innerhalb der Modenverwirbelungskammer eine Exposition lief. Der mechanische Stress wurde am 4. Blatt (Szenario 11) durchgeführt. Eine Scheinexposition fand während dem mechanischen Stress nicht statt.

##### 4.2.7.1.1. Naproxen-Behandlung (ABA-Block)

Zur Durchführung wurden am Vortag um 08:45 jedes durchzuführenden Szenarios jeweils 15 Pflanzen (n = 3 pro Zeitpunkt e, a, b, c, d) entweder mit 50 ml 1 mM Naproxen oder mit 50 ml einer 1:200-fachen Ethanol-Lösung (Kontrolle) gegossen. Um 18:00 wurden diese 30 Pflanzen dann entweder in die Modenverwirbelungskammer (Szenario 1, 3, 8, 11) oder in den abgeschirmten Bereich (Abb. 4.1A; Abschnitt: Schirmung = Szenario 2, 4, 9) zur Akklimatisierung überführt.

Am Durchführungstag wurde an 3 der 15 Pflanzen pro Chemikalienbehandlung um 08:45 der Zeitpunkt vor HF-EMF-Behandlung beprobt (Zeitpunkt e) und um 09:00 wurde die jeweilige Exposition (oder der mechanische Stress) gestartet (mit den restlichen 12 Pflanzen pro Chemikalienbehandlung). Im Fall der HF-EMF-

Expositionen wurden für die Naproxen- oder Ethanol-behandelten Proben jeweils 3 Einzelblätter (L4), also L4 von 3 unterschiedlichen Pflanzen, gesondert nach den Zeitpunkten 0 Minuten, 15 Minuten, 30 Minuten, und 60 Minuten nach Exposition beprobt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

#### 4.2.7.1.2. LaCl<sub>3</sub> + EGTA-Behandlung (Kalzium-Blocker)

Pro Szenario (Szenarien, wie unter 4.2.1.1) wurden für diese Behandlung 30 Einzelpflanzen (15 für die Kalzium-Blocker-Behandlung und 15 für die Kontrolle) am Vortag jedes Szenarios in die Modenverwirbelungskammer (Abb. 4.1A; Abschnitt: Exposition) oder in den abgeschirmten Bereich außerhalb der Modenverwirbelungskammer (Abb. 4.1A; Abschnitt: Schirmung) zur Akklimatisierung überführt.

Die Chemikalien wurden auf die vierten Blätter von jeweils 15 Einzelpflanzen pro Szenario und Behandlung (Kalzium-Blocker oder Kontrolle) um 07:45 am entsprechenden Expositionstag gesprüht. Um 08:45 wurden der Zeitpunkt vor HF-EMF- oder mechanischer Stress-Behandlung beprobt (n = 3). Um 09:00 wurde das Expositionsszenario oder der mechanische Stress durchgeführt und anschließend die Zeitpunkte 0 Minuten, 15 Minuten, 30 Minuten, oder 60 Minuten nach Exposition/mechanischem Stress beprobt, indem jeweils die vierten Blätter von drei Einzelpflanzen pro Behandlung und Zeitpunkt gesondert in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden.

Zur Durchführung des mechanischen Stressszenarios (Szenario 11), dass als letztes durchgeführt wurde, standen nicht mehr ausreichend Pflanzen für Zeitpunkt d zur Verfügung, sodass im Folgenden dieser Zeitpunkt für die Kalzium-Blocker-Behandlung nicht ausgewertet wurde.

#### 4.2.7.2. Einzelblattexpositions- und Stressszenarien (Szenario 5, 6, 7, 10)

Bei diesen Szenarien wurde eine systemische Reaktion untersucht, indem jeweils nur ein Blatt exponiert wurde. Dazu wurde die Pflanze außerhalb der Modenverwirbelungskammer platziert und nur das älteste Blatt (L1) in die Modenverwirbelungskammer eingebracht (Abb. 4.1). Beprobt wurden jeweils das exponierte/mechanisch gestresste Blatt (L1), sowie das jüngste Blatt (L4), welches sich außerhalb der Modenverwirbelungskammer befand. Die Beprobung der

unexponierten/ungestressten Kontrollen (Zeitpunkt e) erfolgte bei jedem Szenario um 08:45 des Expositionstages.

Da nur 12 Aussparungen in die Kammer geschnitten werden konnten, mussten mehrere Expositionen pro Expositionstag durchgeführt werden. Die Uhrzeiten der Expositionen und die jeweiligen Beprobungen sind in Tabelle 4.5 angegeben.

**Tabelle 4.5:** Expositionsurzeiten und die entsprechenden Beprobungszeitpunkte für die Expositions- und Stressszenarien zur Untersuchung systemischer Reaktionen von hochfrequenten elektromagnetischen Feldern (900 MHz; 0 V/m, 5 V/m, und 40 V/m) auf Tomaten.

Expositionsnummer	Expositions-Uhrzeit	Beprobungszeitpunkt	Uhrzeit Beprobung
1	9:00	0 Minuten nach Expositionsende (a)	09:15
2	9:30	15 Minuten nach Expositionsende (b)	10:00
3	10:30	30 Minuten nach Expositionsende (c)	11:15
4	11:30	60 Minuten nach Expositionsende (d)	12:45

#### 4.2.7.2.1. Naproxen-Behandlung (ABA-Block)

Da die einzelnen HF-EMF Expositionen über den Vormittag verteilt waren (Tabelle 4.5), wurden die 3 Einzelpflanzen, die pro Chemikalienbehandlung und Beprobungszeitpunkt benötigt wurden, zeitversetzt am Vortag der entsprechenden Szenarien mit den entsprechenden Chemikalien gegossen. Für die Beprobungszeitpunkte e und a wurden jeweils 6 Pflanzen entweder mit 50 ml einer 1 mM Naproxen-Lösung oder mit 50 ml einer 1:200-fachen Ethanolverdünnung um 08:45 am Vortag der Exposition gegossen und mit den Zeitpunkten a und e markiert.

Analog wurden um 09:15 des Expositionsvortags jeweils 3 Pflanzen für den Beprobungszeitpunkt b, um 10:15 jeweils 3 Pflanzen für den Beprobungszeitpunkt c, und um 11:15 jeweils 3 Pflanzen für den Beprobungszeitpunkt d vorbereitet.

Um 18:00 am Vortag der Exposition wurden alle gegossenen und markierten Pflanzen zur Akklimatisierung in den geschirmten Bereich außerhalb der Modenverwirbelungskammer überführt (Abb. 4.1A; Abschnitt: Schirmung).

Am Expositionstag wurden jeweils 15 Minuten vor der Exposition (oder dem mechanischen Stress) die entsprechenden Pflanzen auf die Hebebühnen platziert und die ältesten Blätter entsprechend durch die Aussparungen in die Modenverwirbelungskammer eingebracht (Abb. 4.1). Nach den entsprechenden Expositionen wurden die ältesten (L1 = exponiert oder gestresst) und die jüngsten (L4

= unexponiert oder ungestresst) Blätter gesondert beprobt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

#### 4.2.7.2.2. LaCl<sub>3</sub> + EGTA-Behandlung (Kalzium-Blocker)

Um 18:00 am Expositionsvortag wurden jeweils 15 Pflanzen pro Chemikalien-Behandlung (Kalzium-Blocker oder NaOH-Kontrolle) in den abgeschirmten Bereich außerhalb der Modenverwirbelungskammer zum Akklimatisieren überführt.

Analog zur ABA-Block-Behandlung wurden auch die jeweils 3 Kalzium-Blocker- und Kontroll-Proben, die pro Zeitpunkt benötigt wurden, zeitversetzt am jeweiligen Expositionstag besprüht, da die einzelnen HF-EMF Expositionen über den Vormittag verteilt waren. Da nur die ältesten Blätter exponiert/gestresst wurden, wurde auch nur jeweils das erste Blatt (L1) besprüht.

Für die Beprobungszeitpunkte e und a wurden die ersten Blätter von jeweils 6 Pflanzen entweder mit einer 1 mM LaCl<sub>3</sub> + 1 mM EGTA-Lösung oder mit einer 1:200-fachen Natriumhydroxid-Verdünnung um 07:45 des Expositionstags gleichmäßig besprüht und mit den Zeitpunkten a und e markiert.

Analog wurden um 08:15 jeweils 3 Pflanzen für den Beprobungszeitpunkt b, um 09:15 jeweils 3 Pflanzen für den Beprobungszeitpunkt c, und um 10:15 jeweils 3 Pflanzen für den Beprobungszeitpunkt d vorbereitet.

Auch bei diesen Behandlungen wurden jeweils 15 Minuten vor der entsprechenden Exposition die entsprechenden Pflanzen auf die Hebebühnen platziert und die ältesten Blätter entsprechend durch die Aussparungen in die Modenverwirbelungskammer eingebracht (Abb. 4.1). Nach den entsprechenden Expositionen wurden die ältesten (L1 = exponiert oder gestresst) und die jüngsten Blätter (L4 = unexponiert oder ungestresst) gesondert beprobt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

#### 4.2.8. Quantitative Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR)

Insgesamt wurden 900 Blattproben geerntet. Von allen Proben wurde RNA mit dem NucleoSpin RNA Plant, mini Kit für RNA aus Pflanzen der Firma Macherey-Nagel (Bestellnummer: 740949.250) nach Herstellerangaben isoliert. Die RT-qPCR wurde mit leichten Abänderungen hinsichtlich der verwendeten RNA-Menge analog zu AP3 durchgeführt. In AP4 wurden einheitlich nur 200 ng Gesamt-RNA für die cDNA-Synthese eingesetzt, da auffiel, dass aus den zu untersuchenden ersten Blättern (L1)

nur geringe Mengen an RNA isoliert werden konnten und somit die typischerweise einzusetzenden Mengen von 500 – 750 ng nicht erreicht werden konnten. Die Gründe hierfür sind wohl biologischer Natur und vermutlich mit dem Alter des Blattes zu erklären. Da die cDNA-Konzentration folglich geringer war als in AP3 wurde mehr cDNA in der RT-qPCR-Reaktion eingesetzt (in AP3 pro RT-qPCR-Reaktion 1 µl; in AP4 pro qPCR-Reaktion 2 µl). Für die cDNA-Synthese wurde das qScript cDNA Synthese Kit der Firma Quantabio verwendet. Für die RT-qPCR wurden pro cDNA-Probe drei technische Replikate durchgeführt.

Zur Berechnung der kalibrierten und normalisierten Expressionswerte der Gene *PI* oder *bZIP* wurde die  $\Delta\Delta CT$ -Methode verwendet (mit den aus AP3 ermittelten Primer-Effizienzen) und es wurden alle Szenarien und die jeweiligen Chemikalienbehandlungen einzeln betrachtet.

Für die Gesamtexpositionsszenarien, bei denen nur das jüngste Blatt (L4) beprobt wurde (Szenario 1, 2, 3, 4, 8, 9 und 11), wurden alle Zeitpunkte zum Mittelwert der unexponierten Kontrolle (Zeitpunkt e) der jeweiligen Chemikalienkontroll-Behandlung kalibriert und auf den jeweiligen kalibrierten Expressionswert von Aktin normalisiert. Zusätzlich wurde eine *Interrun*-Kalibrierung durchgeführt, um mögliche technische Unterschiede zwischen verschiedenen RT-qPCR-Platten auszugleichen. Dazu wurde ein Pool aus allen cDNAs hergestellt, der auf allen Platten als Kontrolle mitgeführt wurde (Aktin wurde als Primer verwendet). Innerhalb dieser Szenarien wurde die statistische Signifikanz mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (nach Überprüfung des Normalverteilungskriteriums) und anschließendem Tukey-Test ermittelt (Signifikanzniveau:  $p \leq 0,05$ ). Dabei wurde der Interaktionsterm berücksichtigt (angegeben mit einem Doppelpunkt in den entsprechenden Tabellen). Die Ergebnisse der zweifaktoriellen Varianzanalyse für *PI* und *bZIP* sind in den Tabellen 4.6 und 4.7 dargestellt.

**Tabelle 4.6:** Ergebnisse der Varianzanalysen für die ermittelten Genexpressionen des *Proteinase Inhibitor*-Gens (PI) in den Gesamtexpositionsszenarien (Szenario 1, 2, 3, 4, 8, 9, 11). ABA = Abszissinsäure-Block-Behandlung, ac = Zeitpunkte a bis c, Kalzium = Kalzium-Blocker-Behandlung, Sz = Szenario.

Szenario	Faktor	Anzahl Freiheitsgrade	Quadrat-summe	Mittel der Quadrate	F-Wert	p-Wert
PI_Sz1 (ABA)	Zeitpunkt	4	1,209	0,3024	1,08	0,3928
	Behandlung	1	1,117	1,117	3,989	0,0596
	Zeitpunkt:Behandlung	4	4,439	1,1099	3,964	0,0158

Szenario	Faktor	Anzahl Freiheitsgrade	Quadrat-summe	Mittel der Quadrate	F-Wert	p-Wert
PI_Sz1 (Kalzium)	Zeitpunkt	4	2,115	0,5287	1,233	0,329
	Behandlung	1	0,056	0,0564	0,131	0,721
	Zeitpunkt:Behandlung	4	0,512	0,128	0,298	0,876
PI_Sz2 (ABA)	Zeitpunkt	4	0,407	0,1018	0,313	0,866
	Behandlung	1	0,586	0,5856	1,8	0,195
	Zeitpunkt:Behandlung	4	1,469	0,3673	1,129	0,371
PI_Sz2 (Kalzium)	Zeitpunkt	4	1,3841	0,346	2,601	0,0671
	Behandlung	1	0,3862	0,3862	2,903	0,1039
	Zeitpunkt:Behandlung	4	0,5373	0,1343	1,01	0,426
PI_Sz3 (ABA)	Zeitpunkt	4	1,863	0,466	0,927	0,468
	Behandlung	1	5,226	5,226	10,402	0,00424
	Zeitpunkt:Behandlung	4	3,013	0,753	1,499	0,24008
PI_Sz3 (Kalzium)	Zeitpunkt	4	0,693	0,1732	0,947	0,4575
	Behandlung	1	0,717	0,7166	3,919	0,0617
	Zeitpunkt:Behandlung	4	1,041	0,2601	1,423	0,2628
PI_Sz4 (ABA)	Zeitpunkt	4	10,41	2,602	2,052	0,12555
	Behandlung	1	10,83	10,833	8,543	0,00841
	Zeitpunkt:Behandlung	4	13,03	3,258	2,569	0,06953
PI_Sz4 (Kalzium)	Zeitpunkt	4	4,173	1,043	1,037	0,413
	Behandlung	1	0,038	0,038	0,038	0,848
	Zeitpunkt:Behandlung	4	4,555	1,139	1,133	0,37
PI_Sz8 (ABA)	Zeitpunkt	4	1,317	0,329	0,268	0,8948
	Behandlung	1	3,851	3,851	3,139	0,0917
	Zeitpunkt:Behandlung	4	1,756	0,439	0,358	0,8355
PI_Sz8 (Kalzium)	Zeitpunkt	4	17,75	4,438	0,903	0,481
	Behandlung	1	4,95	4,954	1,008	0,327
	Zeitpunkt:Behandlung	4	10,29	2,573	0,524	0,72
PI_Sz9 (ABA)	Zeitpunkt	4	11,45	2,862	0,872	0,4979
	Behandlung	1	12,85	12,849	3,915	0,0618
	Zeitpunkt:Behandlung	4	18,08	4,521	1,378	0,2772
PI_Sz9 (Kalzium)	Zeitpunkt	4	10,94	2,736	1,626	0,2067
	Behandlung	1	5,47	5,466	3,249	0,0866
	Zeitpunkt:Behandlung	4	19,61	4,902	2,914	0,0475
PI_Sz11 (ABA)	Zeitpunkt	4	10,768	2,6921	7,586	0,000688
	Behandlung	1	0,698	0,6977	1,966	0,176184
	Zeitpunkt:Behandlung	4	8,327	2,0817	5,866	0,002723
PI_Sz11_ac (Kalzium)	Zeitpunkt	3	0,693	0,23101	1,078	0,387
	Behandlung	1	0,039	0,03891	0,182	0,676
	Zeitpunkt:Behandlung	3	0,546	0,18198	0,849	0,487

**Tabelle 4.7:** Ergebnisse der Varianzanalysen für die ermittelten Genexpressionen des *BASIC LEUCINE ZIPPER 1*-Gens (*bZIP*) in den Gesamtexpositionsszenarien (Szenario 1, 2, 3, 4, 8, 9, 11). ABA = Abszinsinsäure-Block-Behandlung, ac = Zeitpunkte a bis c, Kalzium= Kalzium-Blocker-Behandlung, Sz = Szenario.

Szenario	Faktor	Anzahl Freiheitsgrade	Quadrat -summe	Mittel der Quadrate	F-Wert	p-Wert
bZIP_Sz1 (ABA)	Zeitpunkt	4	0,6809	0,17024	2,651	0,0635
	Behandlung	1	0,0011	0,00109	0,017	0,8978
	Zeitpunkt:Behandlung	4	0,6994	0,17485	2,722	0,0586
bZIP_SZ1 (Kalzium)	Zeitpunkt	4	1,7808	0,4452	3,43	0,0273
	Behandlung	1	0,3918	0,3918	3,018	0,0977
	Zeitpunkt:Behandlung	4	0,3307	0,0827	0,637	0,6422
bZIP_Sz2 (ABA)	Zeitpunkt	4	1,826	0,4565	2,747	0,057
	Behandlung	1	0,066	0,066	0,397	0,536
	Zeitpunkt:Behandlung	4	0,404	0,101	0,608	0,661
bZIP_Sz2 (Kalzium)	Zeitpunkt	4	2,1225	0,5306	4,165	0,013
	Behandlung	1	0,0323	0,0323	0,254	0,62
	Zeitpunkt:Behandlung	4	0,378	0,0945	0,742	0,575
bZIP_Sz3 (ABA)	Zeitpunkt	4	0,2731	0,06827	1,951	0,1411
	Behandlung	1	0,1996	0,19963	5,706	0,0269
	Zeitpunkt:Behandlung	4	0,1467	0,03667	1,048	0,4076
bZIP_Sz3 (Kalzium)	Zeitpunkt	4	0,6113	0,15283	15,4	6,69E-06
	Behandlung	1	0,085	0,08503	8,568	0,00833
	Zeitpunkt:Behandlung	4	0,0375	0,00937	0,944	0,45893
bZIP_Sz4 (ABA)	Zeitpunkt	4	0,457	0,11424	5,706	0,00312
	Behandlung	1	0,2089	0,20885	10,432	0,0042
	Zeitpunkt:Behandlung	4	0,1743	0,04359	2,177	0,10861
bZIP_Sz4 (Kalzium)	Zeitpunkt	4	0,0852	0,0213	0,734	0,5796
	Behandlung	1	0,1308	0,13081	4,507	0,0464
	Zeitpunkt:Behandlung	4	0,1618	0,04045	1,394	0,272
bZIP_Sz8 (ABA)	Zeitpunkt	4	0,5254	0,1314	3,203	0,03473
	Behandlung	1	0,4642	0,4642	11,318	0,00309
	Zeitpunkt:Behandlung	4	0,295	0,0738	1,799	0,16878
bZIP_Sz8 (Kalzium)	Zeitpunkt	4	1,0618	0,26544	9,044	0,00024
	Behandlung	1	0,0002	0,00021	0,007	0,93297
	Zeitpunkt:Behandlung	4	0,108	0,027	0,92	0,4718
bZIP_Sz9 (ABA)	Zeitpunkt	4	0,7953	0,19883	10,214	0,00011
	Behandlung	1	0,0375	0,0375	1,926	0,18045
	Zeitpunkt:Behandlung	4	0,0667	0,01667	0,856	0,50669
bZIP_Sz9 (Kalzium)	Zeitpunkt	4	0,5204	0,1301	6,528	0,00157
	Behandlung	1	0,0632	0,06316	3,17	0,09022
	Zeitpunkt:Behandlung	4	0,0591	0,01477	0,741	0,57516
bZIP_Sz11 (ABA)	Zeitpunkt	4	7,69	1,9225	28,647	5,00E-08
	Behandlung	1	0,441	0,4409	6,569	0,0185

Szenario	Faktor	Anzahl Freiheitsgrade	Quadrat-summe	Mittel der Quadrate	F-Wert	p-Wert
	Zeitpunkt:Behandlung	4	0,158	0,0395	0,588	0,675
bZIP_Sz11 (Kalzium)	Zeitpunkt	4	0,5311	0,13276	2,488	0,0801
	Behandlung	1	0,0084	0,00842	0,158	0,6958
	Zeitpunkt:Behandlung	4	0,2194	0,05484	1,028	0,4198
bZIP_SZ11_ac (Kalzium)	Zeitpunkt	3	0,2024	0,06746	1,283	0,314
	Behandlung	1	0,0031	0,00314	0,06	0,81
	Zeitpunkt:Behandlung	3	0,211	0,07032	1,338	0,297

Für die Einzelblattexpositionsszenarien, bei denen sowohl Blatt 1 als auch Blatt 4 beprobt wurden (Szenario 5, 6, 7 und 10), wurden die Analysen für jedes Blatt separat durchgeführt. Auch hier wurden für jedes Blatt alle Zeitpunkte zum Mittelwert der unexponierten Kontrolle der jeweiligen Chemikalienkontroll-Behandlung kalibriert und auf den jeweiligen kalibrierten Expressionswert von Aktin normalisiert. Zusätzlich wurde auch hier eine *Interrun*-Kalibrierung durchgeführt, um mögliche technische Unterschiede zwischen verschiedenen RT-qPCR-Platten auszugleichen. Innerhalb dieser Szenarien (für jedes Blatt separat) wurde die statistische Signifikanz mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (nach Überprüfung des Normalverteilungskriteriums) und anschließendem *Fisher's*-Test ermittelt (Signifikanzniveau:  $p \leq 0,05$ ). Die Ergebnisse dieser zweifaktoriellen Varianzanalysen für die Gene *PI* und *bZIP* sind in den Tabellen 4.8 und 4.9 dargestellt.

**Tabelle 4.8:** Ergebnisse der Varianzanalysen für die ermittelten Genexpressionen des *Proteinase Inhibitor*-Gens (*PI*) in den Einzelblattexpositionsszenarien (Szenario 5, 6, 7, 10). ABA = Abszisionsäure-Block-Behandlung, ac = Zeitpunkte a bis c, Kalzium = Kalzium-Blocker-Behandlung, Sz = Szenario.

Szenario	Faktor	Anzahl Freiheitsgrade	Quadrat-summe	Mittel der Quadrate	F-Wert	p-Wert
Sz5_L1_PI (ABA)	Zeitpunkt	4	7,7	1,91	0,083	0,9866
	Behandlung	1	88,1	88,12	3,841	0,0641
	Zeitpunkt:Behandlung	4	56,9	14,22	0,62	0,6535
Sz5_L4_PI (ABA)	Zeitpunkt	4	2,8847	0,7212	5,109	0,0053
	Behandlung	1	1,6302	1,6302	11,55	0,00285
	Zeitpunkt:Behandlung	4	0,9291	0,2323	1,646	0,2024
Sz5_L1_PI (Kalzium)	Zeitpunkt	4	10,03	2,508	1,289	0,308
	Behandlung	1	2,7	2,698	1,386	0,253
	Zeitpunkt:Behandlung	4	16,9	4,226	2,171	0,109
Sz5_L4_PI (Kalzium)	Zeitpunkt	4	1,527	0,3818	2,227	0,103
	Behandlung	1	0,209	0,2091	1,22	0,283
	Zeitpunkt:Behandlung	4	0,444	0,111	0,647	0,635
Sz6_PI_L1	Zeitpunkt	4	10,068	2,517	2,285	0,09598

Szenario	Faktor	Anzahl Freiheitsgrade	Quadrat-summe	Mittel der Quadrate	F-Wert	p-Wert
(ABA)	Behandlung	1	2,234	2,234	2,028	0,16987
	Zeitpunkt:Behandlung	4	21,38	5,345	4,852	0,00672
Sz6_PI_L4 (ABA)	Zeitpunkt	4	1,634	0,4084	1,771	0,1742
	Behandlung	1	1,807	1,8068	7,837	0,0111
	Zeitpunkt:Behandlung	4	1,433	0,3583	1,554	0,2251
Sz6_PI_L1 (Kalzium)	Zeitpunkt	4	22,59	5,647	0,617	0,656
	Behandlung	1	13,44	13,445	1,468	0,24
	Zeitpunkt:Behandlung	4	25,43	6,358	0,694	0,605
Sz6_PI_L4 (Kalzium)	Zeitpunkt	4	0,735	0,1837	0,347	0,843
	Behandlung	1	0,922	0,9218	1,739	0,202
	Zeitpunkt:Behandlung	4	2,155	0,5387	1,016	0,423
Sz7_PI_L1 (ABA)	Zeitpunkt	4	7,81	1,953	0,454	0,768
	Behandlung	1	0,16	0,159	0,037	0,85
	Zeitpunkt:Behandlung	4	14,6	3,65	0,849	0,511
Sz7_PI_L4 (ABA)	Zeitpunkt	4	11,441	2,86	2,166	0,1101
	Behandlung	1	8,244	8,244	6,242	0,0213
	Zeitpunkt:Behandlung	4	7,395	1,849	1,4	0,27
Sz7_PI_L1 (Kalzium)	Zeitpunkt	4	61,2	15,31	0,512	0,727
	Behandlung	1	53	53,03	1,775	0,198
	Zeitpunkt:Behandlung	4	85,2	21,3	0,713	0,593
Sz7_PI_L4 (Kalzium)	Zeitpunkt	4	116	29	1,512	0,2364
	Behandlung	1	125,1	125,09	6,525	0,0189
	Zeitpunkt:Behandlung	4	116,9	29,22	1,524	0,2332
Sz10_PI_L1 (ABA)	Zeitpunkt	4	251,9	62,97	0,599	0,668
	Behandlung	1	145,6	145,6	1,385	0,253
	Zeitpunkt:Behandlung	4	399,4	99,85	0,95	0,456
Sz10_PI_L4 (ABA)	Zeitpunkt	4	0,282	0,0705	0,208	0,931
	Behandlung	1	1,928	1,9277	5,699	0,027
	Zeitpunkt:Behandlung	4	1,162	0,2904	0,859	0,505
Sz10_PI_L1 (Kalzium)	Zeitpunkt	4	10,71	2,678	0,719	0,5888
	Behandlung	1	11,14	11,141	2,992	0,0991
	Zeitpunkt:Behandlung	4	12,8	3,199	0,859	0,5052
Sz10_PI_L4 (Kalzium)	Zeitpunkt	4	0,646	0,1616	0,572	0,6858
	Behandlung	1	2,11	2,1096	7,471	0,0128
	Zeitpunkt:Behandlung	4	0,764	0,191	0,676	0,6163

**Tabelle 4.9:** Ergebnisse der Varianzanalysen für die ermittelten Genexpressionen des *BASIC LEUCINE ZIPPER 1*-Gens (bZIP) in den Einzelblatexpositionsszenarien (Szenario 5, 6, 7, 10). ABA = Abszinsäure-Block-Behandlung, ac = Zeitpunkte a bis c, Kalzium = Kalzium-Blocker-Behandlung, Sz = Szenario.

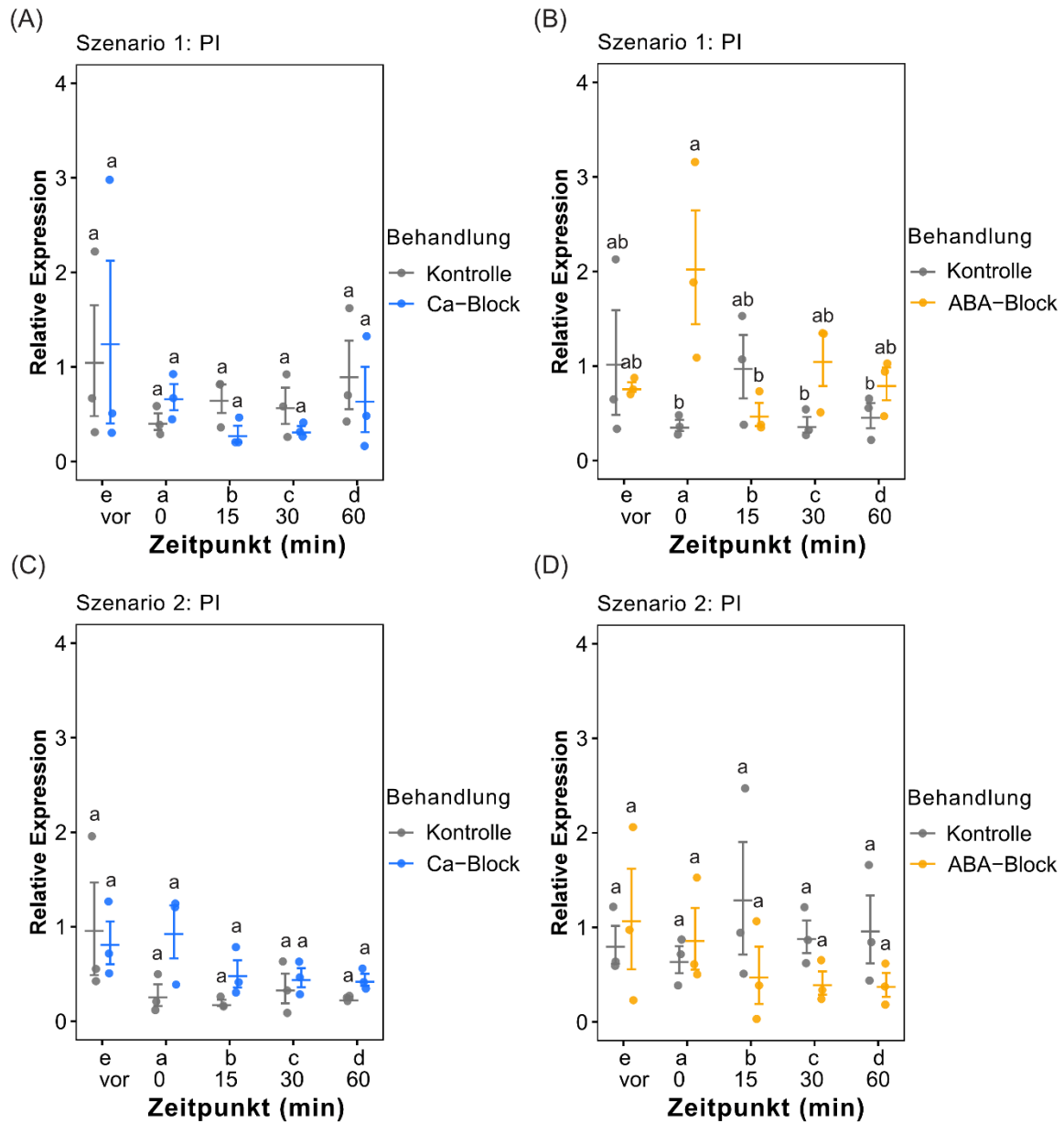
Szenario	Faktor	Anzahl Freiheitsgrade	Quadratsumme	Mittel der Quadrate	F-Wert	p-Wert
Sz5_L1_bZIP (ABA)	Zeitpunkt	4	1,9179	0,4795	7,74	0,000613
	Behandlung	1	0,0227	0,0277	0,367	0,551384
	Zeitpunkt:Behandlung	4	0,1219	0,0305	0,492	0,741618
Sz5_L4_bZIP (ABA)	Zeitpunkt	4	1,1645	0,29113	8,522	0,000349
	Behandlung	1	0,2626	0,26257	7,686	0,011751
	Zeitpunkt:Behandlung	4	0,1205	0,03014	0,882	0,49226
Sz5_L1_bZIP (Kalzium)	Zeitpunkt	4	1,6606	0,4152	15,984	5,08E-06
	Behandlung	1	0,0022	0,0022	0,084	0,775
	Zeitpunkt:Behandlung	4	0,0106	0,0026	0,102	0,981
Sz5_L4_bZIP (Kalzium)	Zeitpunkt	4	1,023	0,25575	9,622	0,000166
	Behandlung	1	0,0055	0,00554	0,208	0,652988
	Zeitpunkt:Behandlung	4	0,0335	0,00838	0,315	0,864488
Sz6_L1_bZIP (ABA)	Zeitpunkt	4	1,7829	0,4457	18,33	1,81E-06
	Behandlung	1	0,4659	0,4659	19,162	0,000291
	Zeitpunkt:Behandlung	4	0,3477	0,0869	3,575	0,02348
Sz6_L4_bZIP (ABA)	Zeitpunkt	4	2,0182	0,5046	13,192	2,03E-05
	Behandlung	1	0,0909	0,0909	2,376	0,139
	Zeitpunkt:Behandlung	4	0,0294	0,0073	0,192	0,94
Sz6_L1_bZIP (Kalzium)	Zeitpunkt	4	1,4796	0,3699	21,12	6,00E-07
	Behandlung	1	0,0166	0,0166	0,946	0,342
	Zeitpunkt:Behandlung	4	0,1315	0,0329	1,877	0,154
Sz6_L4_bZIP (Kalzium)	Zeitpunkt	4	0,8763	0,21907	4,059	0,0144
	Behandlung	1	0,2063	0,20629	3,822	0,0647
	Zeitpunkt:Behandlung	4	0,3119	0,07797	1,445	0,2562
Sz7_L1_bZIP (ABA)	Zeitpunkt	4	1,2988	0,3247	18,071	2,02E-06
	Behandlung	1	0,1174	0,1174	6,535	0,0188
	Zeitpunkt:Behandlung	4	0,1244	0,0311	1,73	0,1829
Sz7_L4_bZIP (ABA)	Zeitpunkt	4	1,2187	0,30468	7,21	0,000915
	Behandlung	1	0,2309	0,23086	5,463	0,029928
	Zeitpunkt:Behandlung	4	0,1849	0,04623	1,094	0,38638
Sz7_L1_bZIP (Kalzium)	Zeitpunkt	4	1,3648	0,3412	26,429	9,77E-08
	Behandlung	1	0,0005	0,0005	0,038	0,84727
	Zeitpunkt:Behandlung	4	0,2652	0,0663	5,136	0,00517
Sz7_L4_bZIP (Kalzium)	Zeitpunkt	4	1,0847	0,27118	13,06	2,18E-05
	Behandlung	1	0,0747	0,07465	3,595	0,0725
	Zeitpunkt:Behandlung	4	0,0324	0,00809	0,39	0,8134
Sz10_L1_bZIP (ABA)	Zeitpunkt	4	1,4343	0,3586	15,975	5,11E-06
	Behandlung	1	0,0051	0,0051	0,229	0,637

Szenario	Faktor	Anzahl Freiheitsgrade	Quadratsumme	Mittel der Quadrate	F-Wert	p-Wert
	Zeitpunkt:Behandlung	4	0,0501	0,0125	0,558	0,696
Sz10_L4_bZIP (ABA)	Zeitpunkt	4	0,8936	0,22341	12,221	3,45E-05
	Behandlung	1	0,0003	0,00029	0,016	0,901
	Zeitpunkt:Behandlung	4	0,0243	0,00607	0,332	0,853
Sz10_L1_bZIP (Kalzium)	Zeitpunkt	4	1,0852	0,27129	25,216	1,44E-07
	Behandlung	1	0,1435	0,14352	13,34	0,00158
	Zeitpunkt:Behandlung	4	0,0414	0,01034	0,961	0,4501
Sz10_L4_bZIP (Kalzium)	Zeitpunkt	4	0,26939	0,06735	5,383	0,00415
	Behandlung	1	0,05504	0,05504	4,399	0,04887
	Zeitpunkt:Behandlung	4	0,02846	0,00711	0,569	0,68836

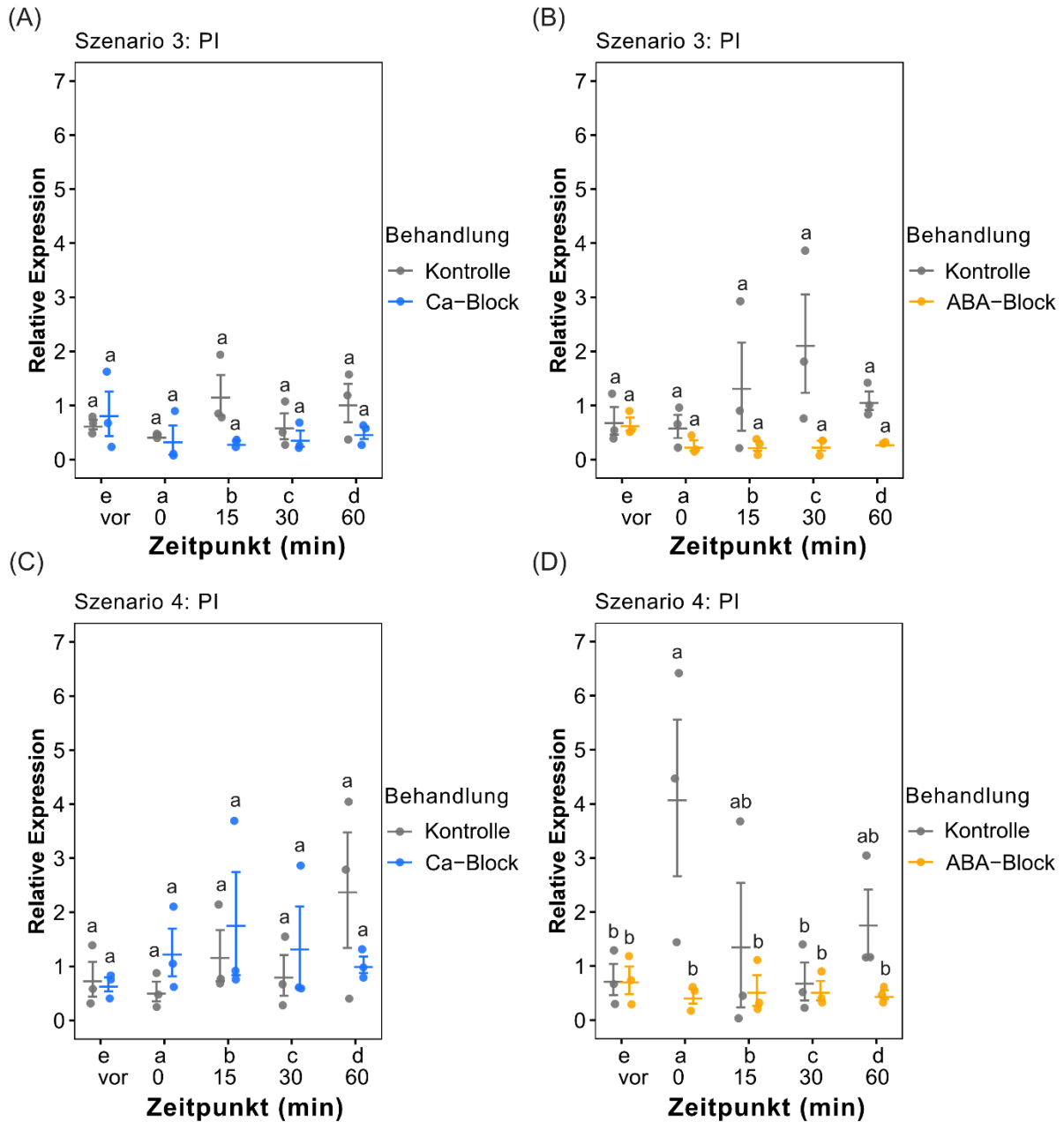
Die Ergebnisse der Genexpressionen wurden mit *Scatterplots* visualisiert. Für alle dargestellten Plots (Abb. 4.4 – 4.18) gilt: Die ausgefüllten Punkte zeigen die Expressionswerte der einzelnen Replikate und die horizontalen Linien geben den jeweiligen Mittelwert an. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler an.

#### 4.2.8.1. *PI*: Gesamtexpositionsszenarien

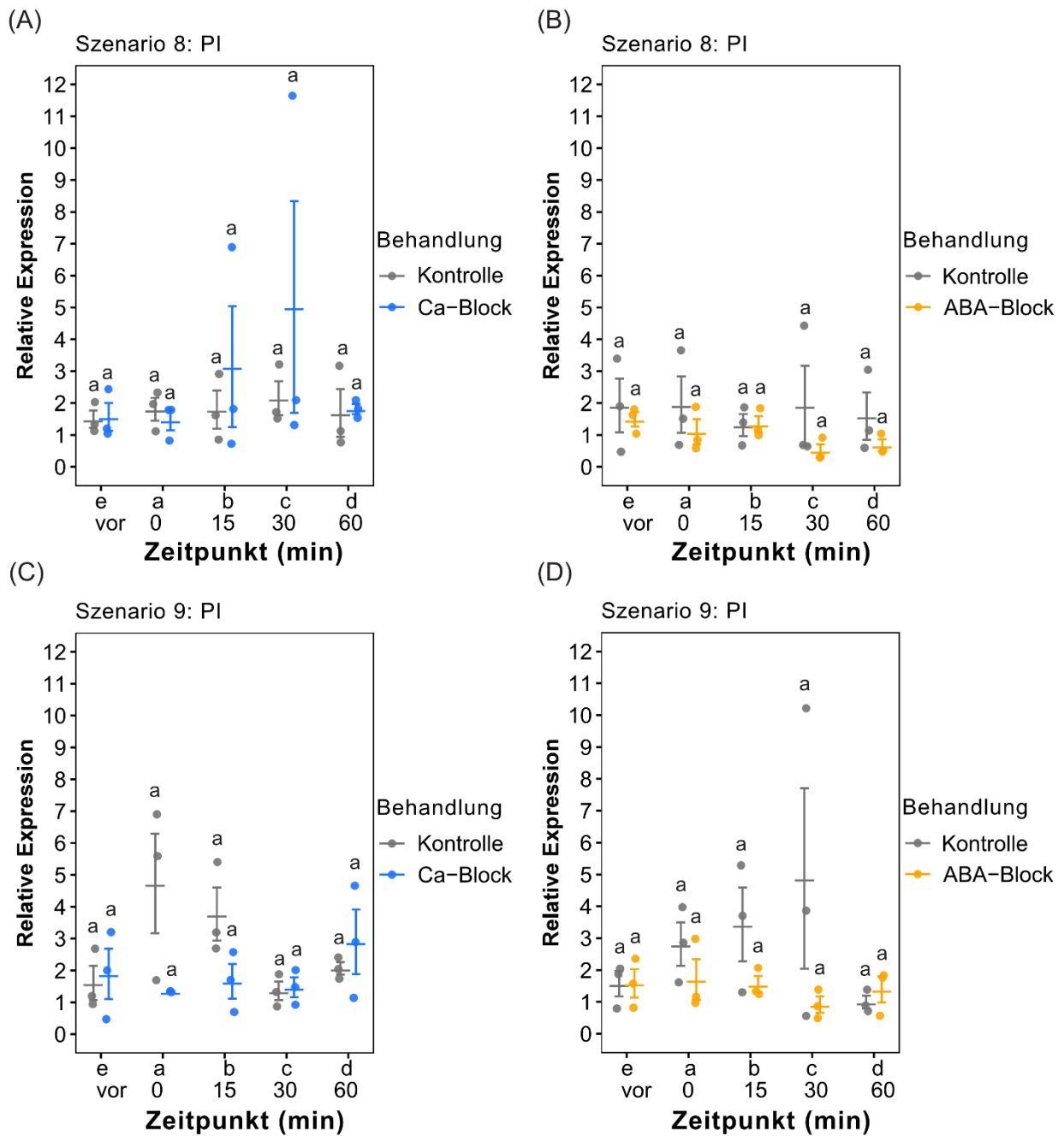
In den Szenarien 1, 2, 3, 4, 8 und 9 wurden die gesamten Pflanzen exponiert (Szenario 1, 3, 8) oder die gesamten Pflanzen waren geschirmt (Szenario 2, 4, 9) und es wurde nur das jüngste Blatt beprobt (L4). Die Ergebnisse der RT-qPCR sind für das Gen *PI* in den Abbildungen 4.4 -4.6 gezeigt.



**Abbildung 4.4:** RT-qPCR-Ergebnisse der Szenarien 1 und 2 für das Gen *Proteinase Inhibitor II (PI)* nach Blocken der Kalzium-Signalkaskade mit  $\text{LaCl}_3 + \text{EGTA}$  (Ca-Block) oder nach Blocken der Abszinsäurebiosynthese mit Naproxen (ABA-Block). A) Kalibrierte und normalisierte, relative Expression von *PI* in Szenario 1  $\pm$  Ca-Block. B) Kalibrierte und normalisierte, relative Expression von *PI* in Szenario 1  $\pm$  ABA-Block. C) Kalibrierte und normalisierte, relative Expression von *PI* in Szenario 2  $\pm$  Ca-Block. D) Kalibrierte und normalisierte, relative Expression von *PI* in Szenario 2  $\pm$  ABA-Block. Dargestellt sind Mittelwerte der normalisierten, relativen Expressionen ( $n = 3$ )  $\pm$  Standardfehler. Kalibriert wurde auf den Mittelwert des Kontrollzeitpunkts (e) und normalisiert wurde auf Aktin. Die statistische Signifikanz basiert auf einer zweifaktoriellen Varianzanalyse mit anschließendem Tukey-Test ( $p \leq 0,05$ ). Unterschiedliche Buchstaben zeigen statistische Signifikanz, während gleiche Buchstaben statistisch nicht signifikant unterschiedliche Mittelwerte aufzeigen. Mittelwerte sind mit horizontalen Linien gekennzeichnet und die ausgefüllten Punkte zeigen die ermittelten Genexpressionen der drei biologischen Replikate. min = Minuten.



**Abbildung 4.5:** RT-qPCR-Ergebnisse der Szenarien 3 und 4 für das Gen *Proteinase Inhibitor II* (*PI*) nach Blocken der Kalzium-Signalkaskade mit  $\text{LaCl}_3 + \text{EGTA}$  (Ca-Block) oder nach Blocken der Abszinsäurebiosynthese mit Naproxen (ABA-Block). A) Kalibrierte und normalisierte, relative Expression von *PI* in Szenario 3  $\pm$  Ca-Block. B) Kalibrierte und normalisierte, relative Expression von *PI* in Szenario 3  $\pm$  ABA-Block. C) Kalibrierte und normalisierte, relative Expression von *PI* in Szenario 4  $\pm$  Ca-Block. D) Kalibrierte und normalisierte, relative Expression von *PI* in Szenario 4  $\pm$  ABA-Block. Dargestellt sind Mittelwerte der normalisierten, relativen Expressionen ( $n = 3$ )  $\pm$  Standardfehler. Kalibriert wurde auf den Mittelwert des Kontrollzeitpunkts (e) und normalisiert wurde auf Aktin. Die statistische Signifikanz basiert auf einer zweifaktoriellen Varianzanalyse mit anschließendem Tukey-Test ( $p \leq 0,05$ ). Unterschiedliche Buchstaben zeigen statistische Signifikanz, während gleiche Buchstaben statistisch nicht signifikant unterschiedliche Mittelwerte aufzeigen. Mittelwerte sind mit horizontalen Linien gekennzeichnet und die ausgefüllten Punkte zeigen die ermittelten Genexpressionen der drei biologischen Replikate. min = Minuten.



**Abbildung 4.6:** RT-qPCR-Ergebnisse der Szenarien 8 und 9 für das Gen *Proteinase Inhibitor II (PI)* nach Blocken der Kalzium-Signalkaskade mit  $\text{LaCl}_3 + \text{EGTA}$  (Ca-Block) oder nach Blocken der Abszinsäurebiosynthese mit Naproxen (ABA-Block). A) Kalibrierte und normalisierte, relative Expression von *PI* in Szenario 8  $\pm$  Ca-Block. B) Kalibrierte und normalisierte, relative Expression von *PI* in Szenario 8  $\pm$  ABA-Block. C) Kalibrierte und normalisierte, relative Expression von *PI* in Szenario 9  $\pm$  Ca-Block. D) Kalibrierte und normalisierte, relative Expression von *PI* in Szenario 9  $\pm$  ABA-Block. Dargestellt sind Mittelwerte der normalisierten, relativen Expressionen ( $n = 3$ )  $\pm$  Standardfehler. Kalibriert wurde auf den Mittelwert des Kontrollzeitpunkts (e) und normalisiert wurde auf Aktin. Die statistische Signifikanz basiert auf einer zweifaktoriellen Varianzanalyse mit anschließendem Tukey-Test ( $p \leq 0,05$ ). Unterschiedliche Buchstaben zeigen statistische Signifikanz, während gleiche Buchstaben statistisch nicht signifikant unterschiedliche Mittelwerte aufzeigen. Mittelwerte sind mit horizontalen Linien gekennzeichnet und die ausgefüllten Punkte zeigen die ermittelten Genexpressionen der drei biologischen Replikate. min = Minuten.

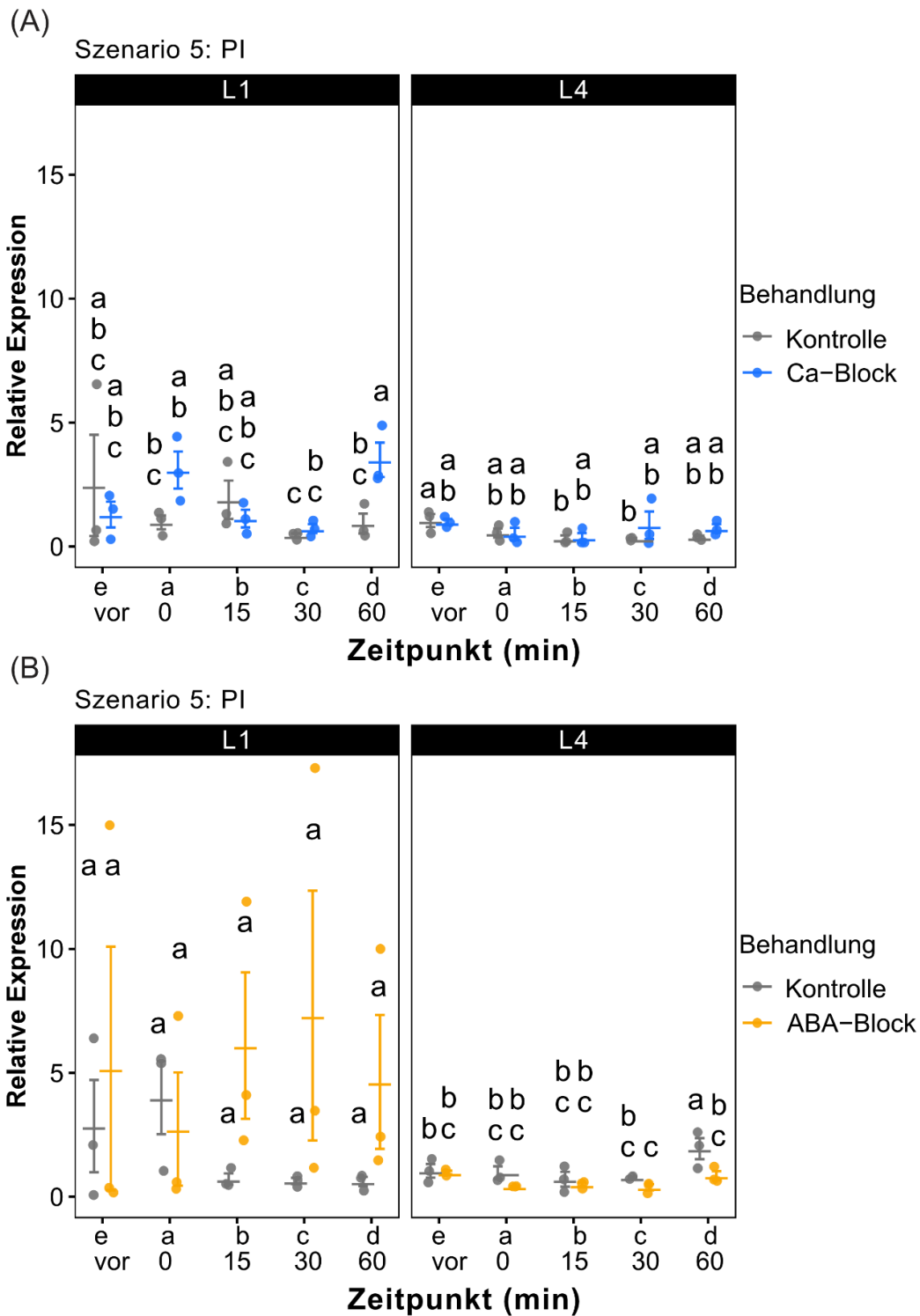
Anhand der in den Abbildungen 4.4- 4.6 gezeigten Ergebnisse lassen sich folgende Schlussfolgerungen treffen:

- Die *PI*-Genexpression innerhalb eines Szenarios schwankt bereits deutlich in den einzelnen biologischen Replikaten.
- In den Kontrollbehandlungen zeigt die Genexpression von *PI* nur in Szenario 4 und nur in der Kontrollbedingung der ABA-Behandlung zum Zeitpunkt a im Vergleich zur unexponierten Kontrolle (Zeitpunkt e) eine signifikante Änderung (das Gen wird hochreguliert).
- In der Kalzium-Blocker-Behandlung konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede detektiert werden.
- In der ABA-Block-Behandlung wurde in Szenario 1 zum Zeitpunkt a im Vergleich zur Kontrollbehandlung eine signifikante Hochregulierung der *PI*-Genexpression detektiert, während in Szenario 4 in der ABA-Block-Behandlung zum Zeitpunkt a eine signifikante Herunterregulierung der *PI*-Genexpression im Vergleich zur Kontrollbehandlung detektiert wurde.

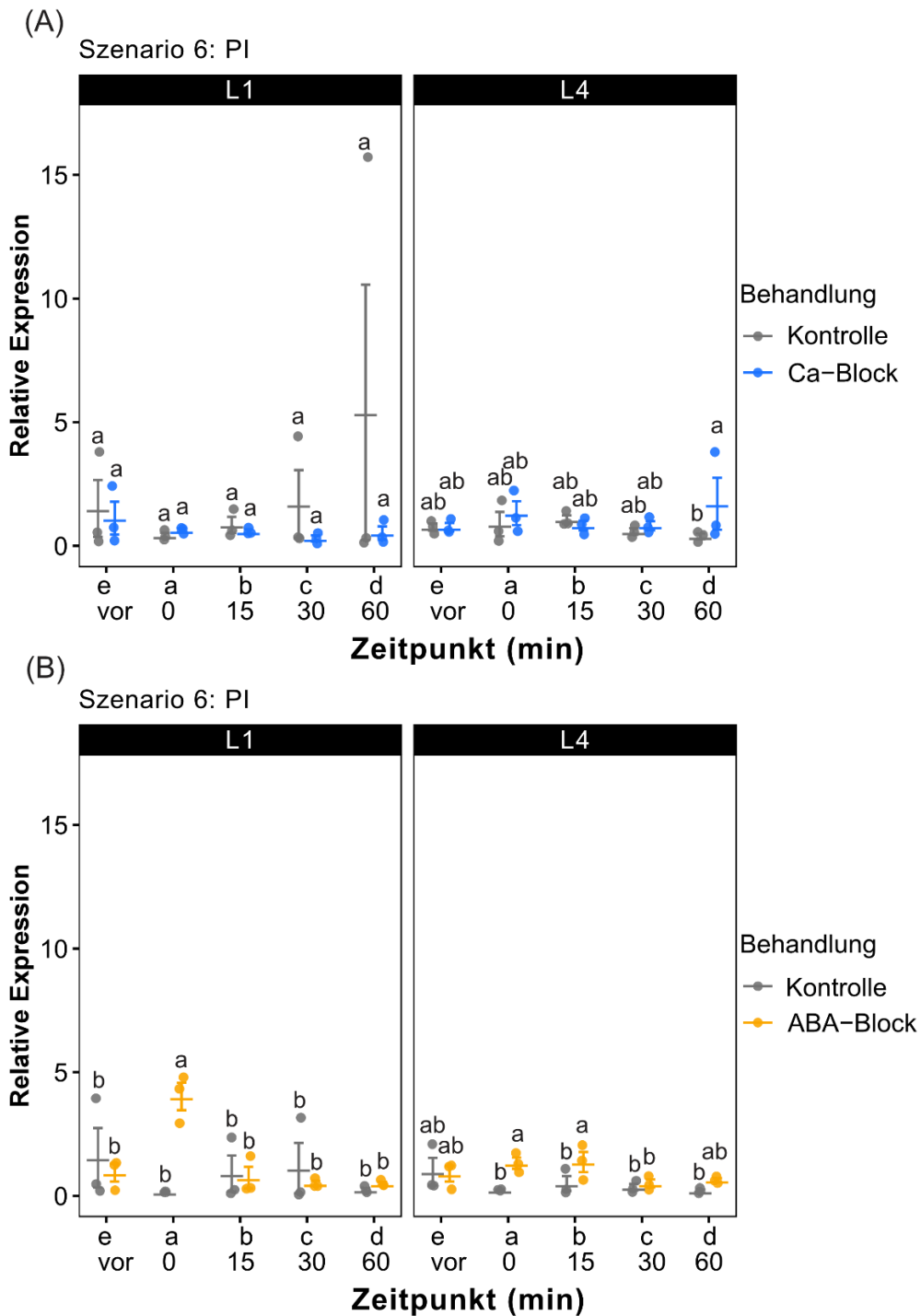
Wie bereits in AP3 geschlussfolgert, scheinen HF-EMF auf die Genexpression des *PI*-Gens, wenn überhaupt, nur geringe Auswirkungen zu haben.

#### 4.2.8.2. *PI*: Einzelblattexpositionsszenarien

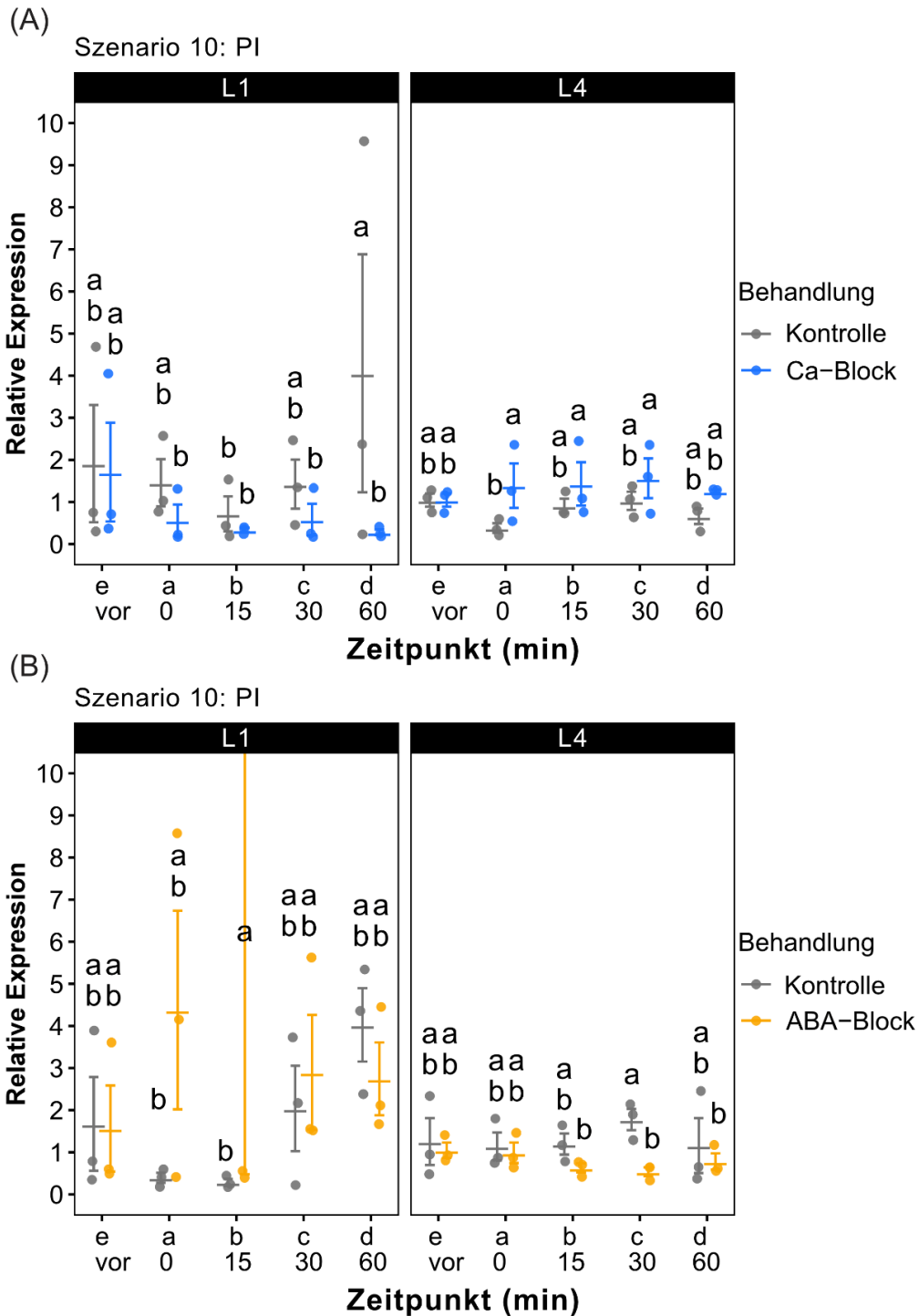
In den Szenarien 5, 6, und 10 wurden nur die ältesten Blätter (L1) von Tomatenpflanzen exponiert, während der Rest der Einzelpflanzen geschirmt war. Beprobt wurden sowohl das älteste exponierte Blatt (L1) und das jüngste, geschirmte Blatt (L4). Die Ergebnisse der RT-qPCR für das Gen *PI* sind in den Abbildungen 4.7 – 4.9 gezeigt.



**Abbildung 4.7:** RT-qPCR-Ergebnisse des Szenarios 5 für das Gen *Proteinase Inhibitor II (PI)* im ältesten (L1) und im jüngsten Blatt (L4) nach Blocken der Kalzium-Signalkaskade mit  $\text{LaCl}_3 + \text{EGTA}$  (Ca-Block) oder nach Blocken der Abszissinsäurebiosynthese mit Naproxen (ABA-Block). A) Kalibrierte und normalisierte, relative Expression von *PI* in Szenario 5  $\pm$  Ca-Block in L1 und L4. B) Kalibrierte und normalisierte, relative Expression von *PI* in Szenario 5  $\pm$  ABA-Block in L1 und L4. Dargestellt sind Mittelwerte der normalisierten, relativen Expressionen ( $n = 3$ )  $\pm$  Standardfehler. Kalibriert wurde auf den Mittelwert des Kontrollzeitpunkts (e) und normalisiert wurde auf Aktin. Die statistische Signifikanz basiert auf einer zweifaktoriellen Varianzanalyse mit anschließendem Fisher's-Test ( $p \leq 0,05$ ). Unterschiedliche Buchstaben zeigen statistische Signifikanz, während gleiche Buchstaben statistisch nicht signifikant unterschiedliche Mittelwerte aufzeigen. Mittelwerte sind mit horizontalen Linien gekennzeichnet und die ausgefüllten Punkte zeigen die ermittelten Genexpressionen der drei biologischen Replikate. min = Minuten.



**Abbildung 4.8:** RT-qPCR-Ergebnisse des Szenarios 6 für das Gen *Proteinase Inhibitor II (PI)* im ältesten (L1) und im jüngsten Blatt (L4) nach Blocken der Kalzium-Signalkaskade mit  $\text{LaCl}_3 + \text{EGTA}$  (Ca-Block) oder nach Blocken der Abszissinsäurebiosynthese mit Naproxen (ABA-Block). A) Kalibrierte und normalisierte, relative Expression von *PI* in Szenario 6  $\pm$  Ca-Block in L1 und L4. B) Kalibrierte und normalisierte, relative Expression von *PI* in Szenario 6  $\pm$  ABA-Block in L1 und L4. Dargestellt sind Mittelwerte der normalisierten, relativen Expressionen ( $n = 3$ )  $\pm$  Standardfehler. Kalibriert wurde auf den Mittelwert des Kontrollzeitpunkts (e) und normalisiert wurde auf Aktin. Die statistische Signifikanz basiert auf einer zweifaktoriellen Varianzanalyse mit anschließendem *Fisher's-Test* ( $p \leq 0,05$ ). Unterschiedliche Buchstaben zeigen statistische Signifikanz, während gleiche Buchstaben statistisch nicht signifikant unterschiedliche Mittelwerte aufzeigen. Mittelwerte sind mit horizontalen Linien gekennzeichnet und die ausgefüllten Punkte zeigen die ermittelten Genexpressionen der drei biologischen Replikate. min = Minuten.



**Abbildung 4.9:** RT-qPCR-Ergebnisse des Szenarios 10 für das Gen *Proteinase Inhibitor II* (*PI*) im ältesten (L1) und im jüngsten Blatt (L4) nach Blocken der Kalzium-Signalkaskade mit  $\text{LaCl}_3 + \text{EGTA}$  (Ca-Block) oder nach Blocken der Abszinsäurebiosynthese mit Naproxen (ABA-Block). A) Kalibrierte und normalisierte, relative Expression von *PI* in Szenario 10  $\pm$  Ca-Block in L1 und L4. B) Kalibrierte und normalisierte, relative Expression von *PI* in Szenario 10  $\pm$  ABA-Block in L1 und L4. Dargestellt sind Mittelwerte der normalisierten, relativen Expressionen ( $n = 3$ )  $\pm$  Standardfehler. Kalibriert wurde auf den Mittelwert des Kontrollzeitpunkts (e) und normalisiert wurde auf Aktin. Die statistische Signifikanz basiert auf einer zweifaktoriellen Varianzanalyse mit anschließendem *Fisher's*-Test ( $p \leq 0,05$ ). Unterschiedliche Buchstaben zeigen statistische Signifikanz, während gleiche Buchstaben statistisch nicht signifikant unterschiedliche Mittelwerte aufzeigen. Mittelwerte sind mit horizontalen Linien gekennzeichnet und die ausgefüllten Punkte zeigen die ermittelten Genexpressionen der drei biologischen Replikate. min = Minuten.

Anhand der in den Abbildungen 4.7 – 4.9 gezeigten Ergebnisse lassen sich folgende Schlussfolgerungen treffen:

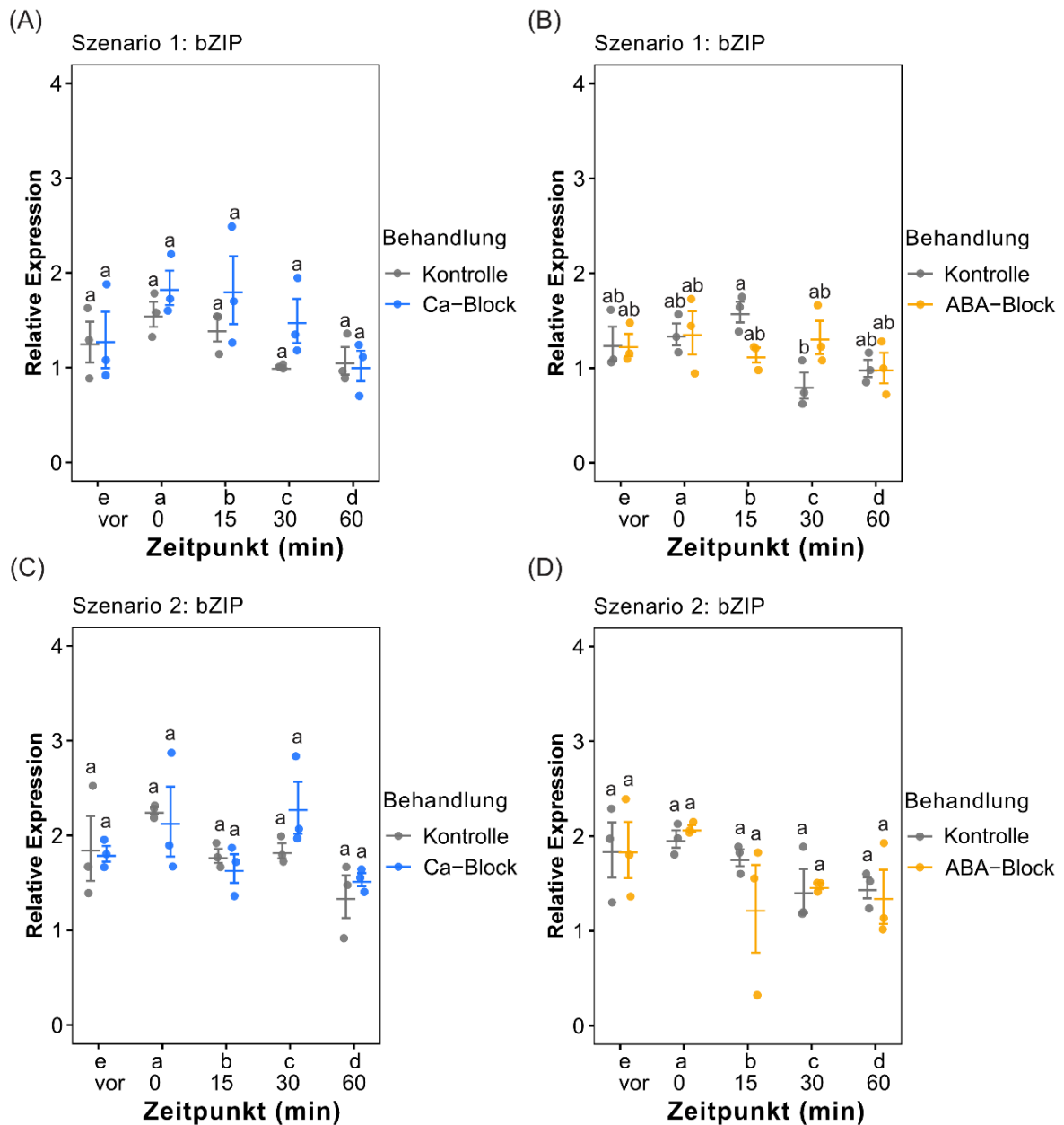
- Auch in den Einzelblattexpositionsszenarien kommt es, ähnlich zu den Gesamtexpositionsszenarien, zu starken Schwankungen der *PI*-Genexpression zwischen den jeweiligen biologischen Replikaten.
- In der Versuchsreihe mit dem Kalzium-Block kommt es in allen drei Expositionsszenarien vereinzelt zu statistisch signifikanten Unterschieden und zwar entweder im Vergleich zum Kontrollzeitpunkt (Zeitpunkt e) oder im Vergleich zur Kontrollbehandlung. In Szenario 5 ist die *PI*-Genexpression zum Zeitpunkt d (60 Minuten nach Expositionsende) in Blatt 1 (exponiert) nach Kalzium-Blocker-Behandlung signifikant hochreguliert im Vergleich zur Kontrollbehandlung. Im Blatt 4 (unexponiert) hingegen, kommt es in Szenario 5 in der Kontrollbehandlung, aber nicht nach Kalzium-Blocker-Behandlung, zu einer statistisch signifikanten Herunterregulierung der *PI*-Genexpression an den Zeitpunkten b und c (15 und 30 Minuten nach Expositionsende) im Vergleich zum Kontrollzeitpunkt e. In Szenario 6 kommt es ausschließlich in Blatt 4 (unexponiert) zum Zeitpunkt d (60 Minuten nach Expositionsende) zu einer signifikanten Hochregulierung der *PI*-Genexpression bei Blockade der Kalziumsignalkaskade im Vergleich zur Kontrollbehandlung. In Szenario 10 kommt es zu einer signifikanten Herunterregulierung der *PI*-Genexpression im Blatt 1 (exponiert) zum Zeitpunkt d (60 Minuten nach Expositionsende) in der Kalzium-Blocker-Behandlung im Vergleich zur Kontrollbehandlung und zu einer signifikanten Hochregulierung der *PI*-Genexpression im Blatt 4 (unexponiert) zum Zeitpunkt a (0 Minuten nach Expositionsende) und zwar auch in der Kalzium-Blocker-Behandlung im Vergleich zur Kontrollbehandlung.
- Auch in der Versuchsreihe mit dem ABA-Block kommt es in Szenario 5, Szenario 6 und in Szenario 10 zu statistisch signifikanten Genexpressionsänderung von *PI*. In Szenario 5 wird in Blatt 4 (unexponiert) zum Zeitpunkt d (60 Minuten nach Expositionsende) das *PI*-Gen bei Blockade der ABA-Biosynthese im Vergleich zur Kontrollbehandlung herunterreguliert und gleichzeitig ist an diesem Zeitpunkt (60 Minuten nach Expositionsende) in diesem Blatt (L4) die Genexpression von *PI* in der Kontrollbehandlung im Vergleich zum Kontrollzeitpunkt e signifikant hochreguliert. In Szenario 6 wird

zum Zeitpunkt a (0 Minuten nach Expositionsende) das *PI*-Gen in Blatt 1 (exponiert) und in Blatt 4 (unexponiert) zu den Zeitpunkten a und b (0 Minuten und 15 Minuten nach Expositionsende) bei Blockade der ABA-Biosynthese im Vergleich zur Kontrollbehandlung hochreguliert. Zusätzlich ist in Szenario 6 in Blatt 1 (exponiert) die *PI*-Genexpression in der ABA-Block-Behandlung zum Zeitpunkt a (0 Minuten nach Expositionsende) auch zum entsprechenden Kontrollzeitpunkt e signifikant hochreguliert. In Szenario 10 wird in Blatt 1 (exponiert) zum Zeitpunkt b (15 Minuten nach Expositionsende) das *PI*-Gen bei Blockade der ABA-Biosynthese im Vergleich zur Kontrollbehandlung hochreguliert und in Blatt 4 (unexponiert) zum Zeitpunkt c (30 Minuten nach Expositionsende) signifikant herunterreguliert.

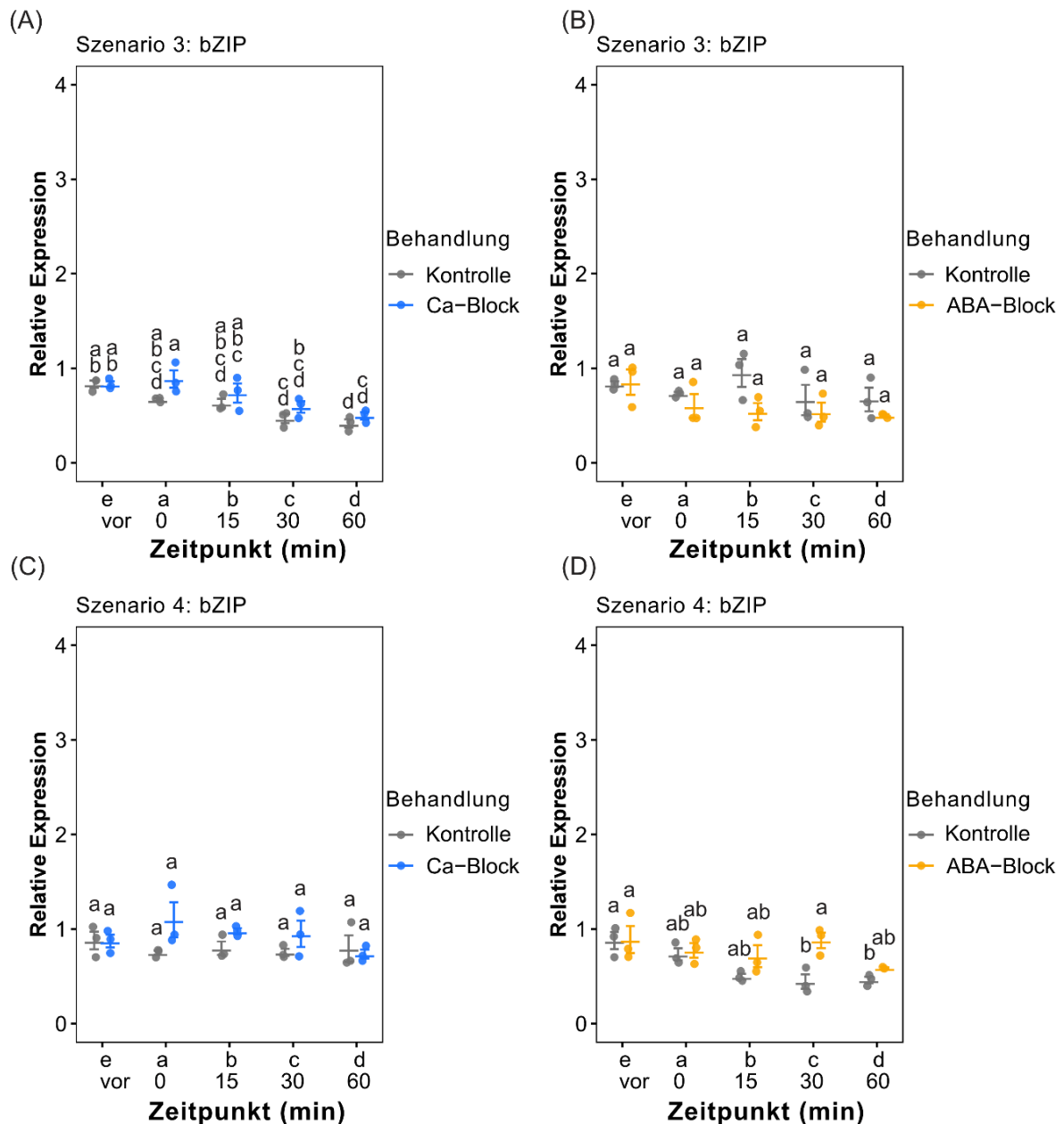
Auch in den Einzelblattexpositionsszenarien kommt es, wenn überhaupt, nur zu geringen Auswirkungen durch HF-EMF auf die Genexpression des *PI*-Gens. Somit konnten bezüglich der *PI*-Genexpression auch keine systemischen Reaktionen festgestellt werden. Interessant erscheint, dass es zu den deutlichsten Schwankungen der *PI*-Genexpression zwischen den biologischen Replikaten vor allem nach Blockade der ABA-Biosynthese kommt.

#### 4.2.8.3. *bZIP*: Gesamtexpositionsszenarien

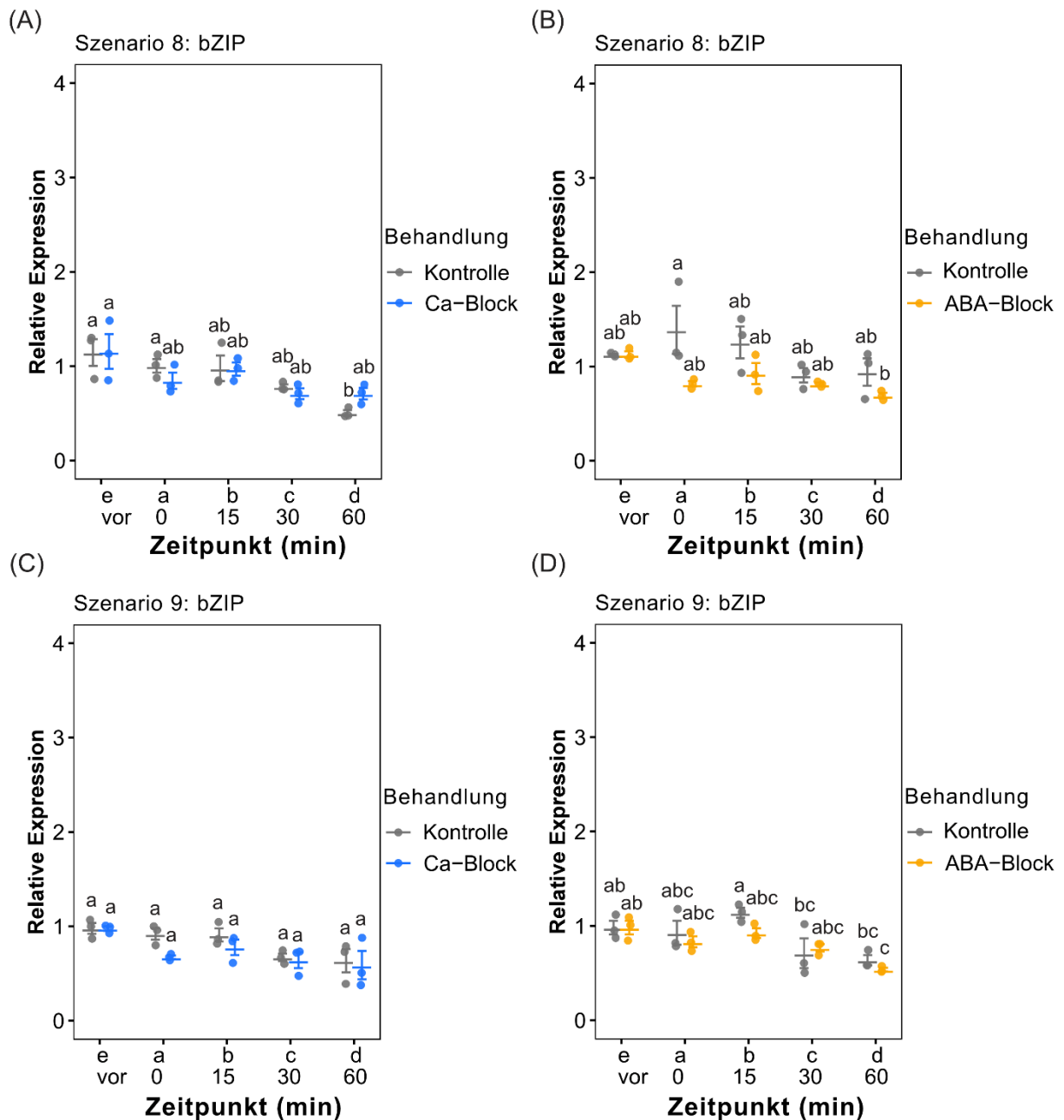
Die Ergebnisse der RT-qPCR für das Gen *bZIP* in den Gesamtexpositions- bzw. Schirmungsszenarien (1, 2, 3, 4, 8, 9) sind in den Abbildungen 4.10 – 4.12 gezeigt.



**Abbildung 4.10:** RT-qPCR-Ergebnisse der Szenarien 1 und 2 für das Gen *BASIC LEUCINE ZIPPER 1* (*bZIP*) nach Blocken der Kalzium-Signalkaskade mit  $\text{LaCl}_3 + \text{EGTA}$  (Ca-Block) oder nach Blocken der Abszinsäurebiosynthese mit Naproxen (ABA-Block). A) Kalibrierte und normalisierte, relative Expression von *bZIP* in Szenario 1  $\pm$  Ca-Block. B) Kalibrierte und normalisierte, relative Expression von *bZIP* in Szenario 1  $\pm$  ABA-Block. C) Kalibrierte und normalisierte, relative Expression von *bZIP* in Szenario 2  $\pm$  Ca-Block. D) Kalibrierte und normalisierte, relative Expression von *bZIP* in Szenario 2  $\pm$  ABA-Block. Dargestellt sind Mittelwerte der normalisierten, relativen Expressionen ( $n = 3$ )  $\pm$  Standardfehler. Kalibriert wurde auf den Mittelwert des Kontrollzeitpunkts (e) und normalisiert wurde auf Aktin. Die statistische Signifikanz basiert auf einer zweifaktoriellen Varianzanalyse mit anschließendem Tukey-Test ( $p \leq 0,05$ ). Unterschiedliche Buchstaben zeigen statistische Signifikanz, während gleiche Buchstaben statistisch nicht signifikant unterschiedliche Mittelwerte aufzeigen. Mittelwerte sind mit horizontalen Linien gekennzeichnet und die ausgefüllten Punkte zeigen die ermittelten Genexpressionen der drei biologischen Replikate. min = Minuten.



**Abbildung 4.11:** RT-qPCR-Ergebnisse der Szenarien 3 und 4 für das Gen *BASIC LEUCINE ZIPPER 1* (*bZIP*) nach Blocken der Kalzium-Signalkaskade mit  $\text{LaCl}_3$  + EGTA (Ca-Block) oder nach Blocken der Abszinsäurebiosynthese mit Naproxen (ABA-Block). A) Kalibrierte und normalisierte, relative Expression von *bZIP* in Szenario 3  $\pm$  Ca-Block. B) Kalibrierte und normalisierte, relative Expression von *bZIP* in Szenario 3  $\pm$  ABA-Block. C) Kalibrierte und normalisierte, relative Expression von *bZIP* in Szenario 4  $\pm$  Ca-Block. D) Kalibrierte und normalisierte, relative Expression von *bZIP* in Szenario 4  $\pm$  ABA-Block. Dargestellt sind Mittelwerte der normalisierten, relativen Expressionen ( $n = 3$ )  $\pm$  Standardfehler. Kalibriert wurde auf den Mittelwert des Kontrollzeitpunkts (e) und normalisiert wurde auf Aktin. Die statistische Signifikanz basiert auf einer zweifaktoriellen Varianzanalyse mit anschließendem Tukey-Test ( $p \leq 0,05$ ). Unterschiedliche Buchstaben zeigen statistische Signifikanz, während gleiche Buchstaben statistisch nicht signifikant unterschiedliche Mittelwerte aufzeigen. Mittelwerte sind mit horizontalen Linien gekennzeichnet und die ausgefüllten Punkte zeigen die ermittelten Genexpressionen der drei biologischen Replikate. min = Minuten.



**Abbildung 4.12:** RT-qPCR-Ergebnisse der Szenarien 8 und 9 für das Gen *BASIC LEUCINE ZIPPER 1* (*bZIP*) nach Blocken der Kalzium-Signalkaskade mit  $\text{LaCl}_3 + \text{EGTA}$  (Ca-Block) oder nach Blocken der Abszinsäurebiosynthese mit Naproxen (ABA-Block). A) Kalibrierte und normalisierte, relative Expression von *bZIP* in Szenario 8  $\pm$  Ca-Block. B) Kalibrierte und normalisierte, relative Expression von *bZIP* in Szenario 8  $\pm$  ABA-Block. C) Kalibrierte und normalisierte, relative Expression von *bZIP* in Szenario 9  $\pm$  Ca-Block. D) Kalibrierte und normalisierte, relative Expression von *bZIP* in Szenario 9  $\pm$  ABA-Block. Dargestellt sind Mittelwert der normalisierten, relativen Expressionen ( $n = 3$ )  $\pm$  Standardfehler. Kalibriert wurde auf den Mittelwert des Kontrollzeitpunkts (e) und normalisiert wurde auf Aktin. Die statistische Signifikanz basiert auf einer zweifaktoriellen Varianzanalyse mit anschließendem Tukey-Test ( $p \leq 0,05$ ). Unterschiedliche Buchstaben zeigen statistische Signifikanz, während gleiche Buchstaben statistisch nicht signifikant unterschiedliche Mittelwerte aufzeigen. Mittelwerte sind mit horizontalen Linien gekennzeichnet und die ausgefüllten Punkte zeigen die ermittelten Genexpressionen der drei biologischen Replikate. min = Minuten.

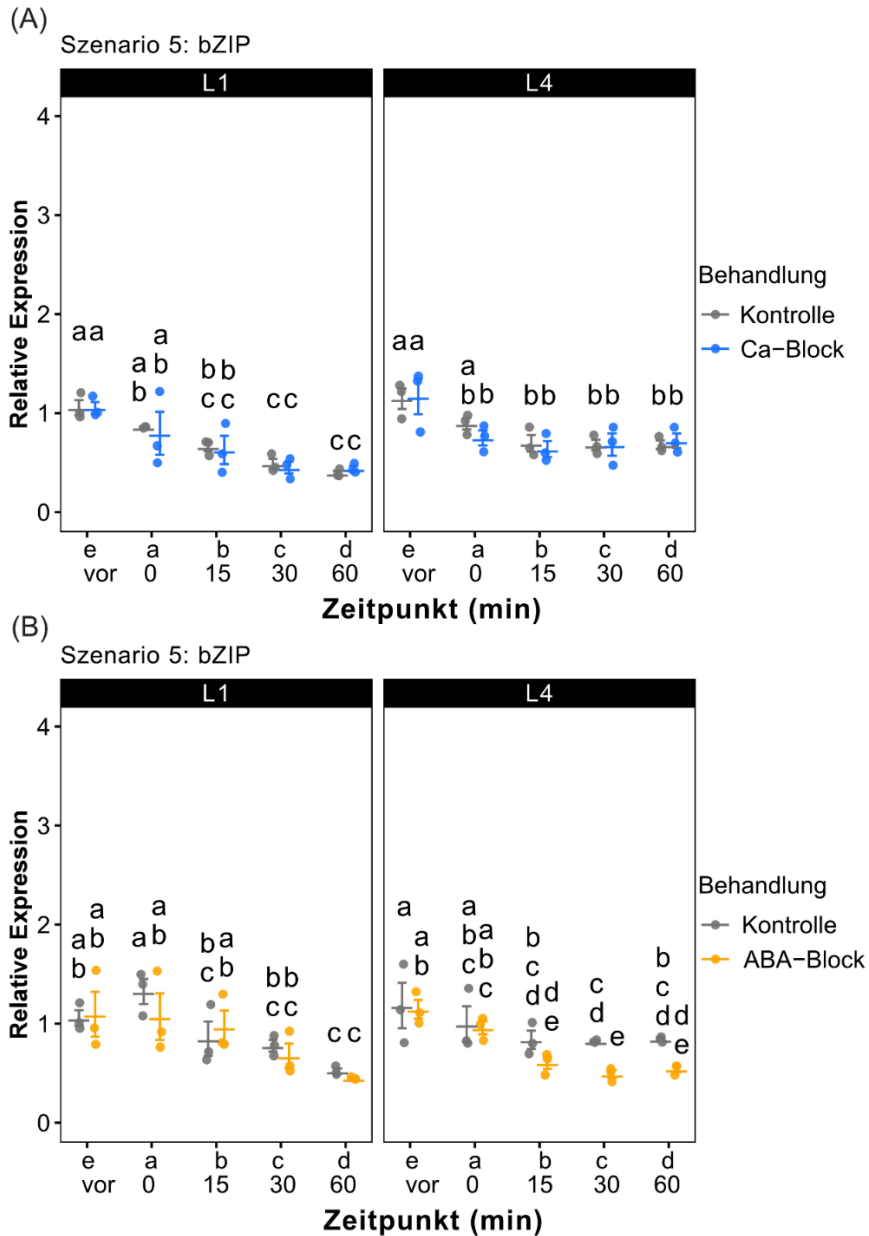
Anhand der in den Abbildungen 4.10 – 4.12 gezeigten Ergebnisse lassen sich folgende Schlussfolgerungen ziehen:

- Die Schwankungen der *bZIP*-Genexpression zwischen den einzelnen technischen Replikaten fallen deutlich geringer aus als die der *PI*-Genexpression.
- In der Versuchsreihe mit dem Kalzium-Blocker zeigt die *bZIP*-Genexpression in Szenario 3 und in Szenario 8 signifikante Unterschiede. In Szenario 3 ist die *bZIP*-Genexpression in der Kontrollbehandlung zu den Zeitpunkten c und d (30 Minuten und 60 Minuten nach Expositionsende) im Vergleich zur unexponierten Kontrolle (Zeitpunkt e) herunterreguliert. Zusätzlich ist die *bZIP*-Genexpression in Szenario 3 in der Kalzium-Blocker-Behandlung zum Zeitpunkt d (60 Minuten nach Expositionsende) im Vergleich zur entsprechenden unexponierten Kontrolle (Zeitpunkt e) herunterreguliert. In Szenario 8 ist die *bZIP*-Genexpression nur zum Zeitpunkt d (60 Minuten nach Expositionsende) in der Kontrollbehandlung im Vergleich zur unexponierten Kontrolle (Zeitpunkt e) herunterreguliert.
- In der Versuchsreihe mit dem ABA-Block zeigt die *bZIP*-Genexpression in Szenario 4 und in Szenario 9 signifikante Unterschiede. In Szenario 4 ist die *bZIP*-Genexpression zu den Zeitpunkten c und d (30 Minuten und 60 Minuten nach Expositionsende) in der Kontrollbehandlung im Vergleich zur unexponierten Kontrolle (Zeitpunkt e) herunterreguliert. Die ABA-Block-Behandlung führt in Szenario 4 zum Zeitpunkt c (30 Minuten nach Expositionsende) zu einer erhöhten *bZIP*-Genexpression im Vergleich zur Kontrollbehandlung. In Szenario 9 ist die *bZIP*-Genexpression zum Zeitpunkt d (60 Minuten nach Expositionsende) in der ABA-Block-Behandlung im Vergleich zur unexponierten Kontrolle (Zeitpunkt e) herunterreguliert.

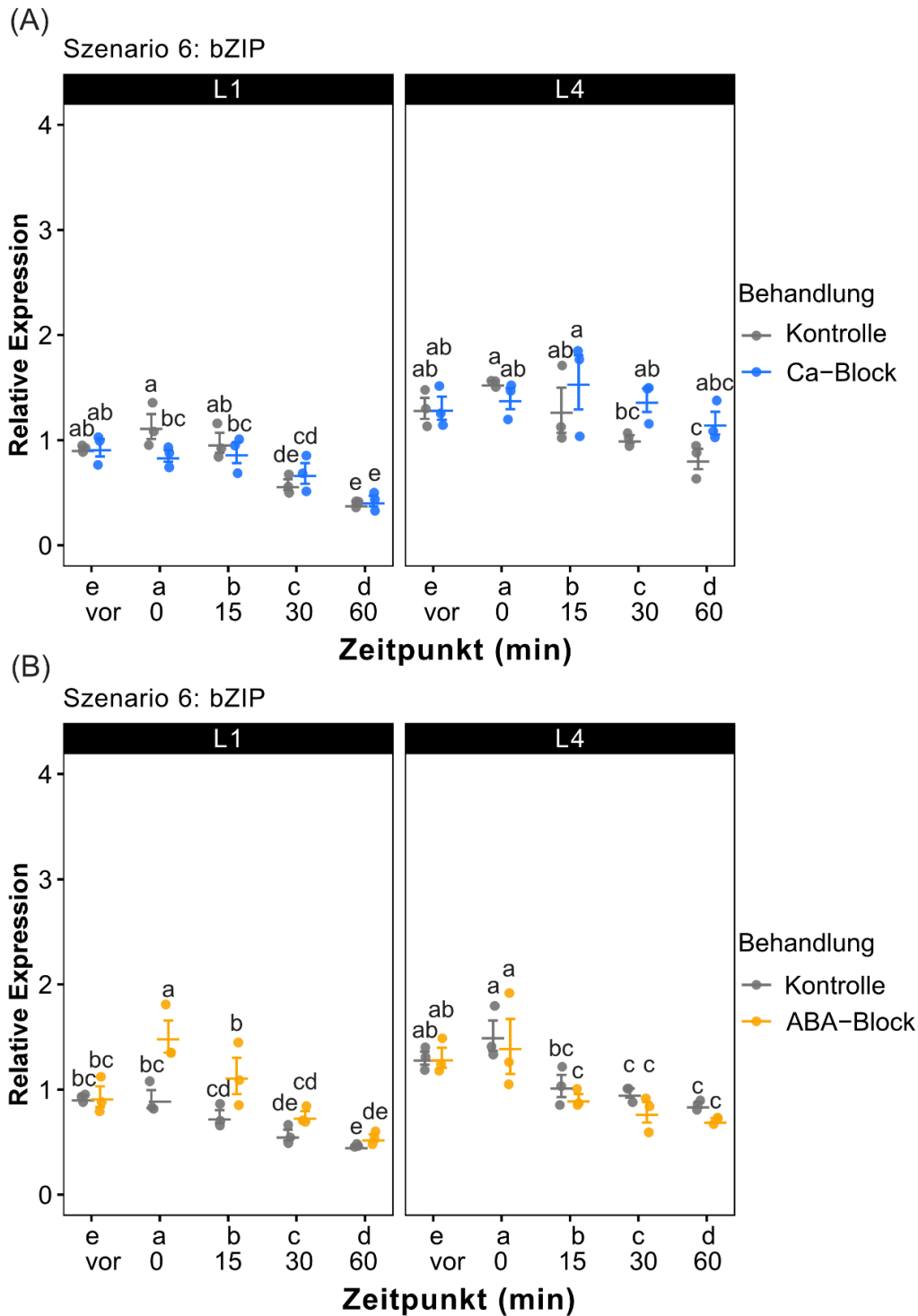
HF-EMF scheinen demnach auch auf die Genexpression von *bZIP*, wenn überhaupt, nur geringe Auswirkungen zu haben. Interessant erscheint, dass alle in den Kontrollbedingungen signifikant unterschiedlichen Genexpressionen eine Herunterregulierung darstellten, was gegensätzlich zu den Ergebnissen der Arbeitsgruppe Vian ist.

#### 4.2.8.4. *bZIP*: Einzelblattexpositionsszenarien

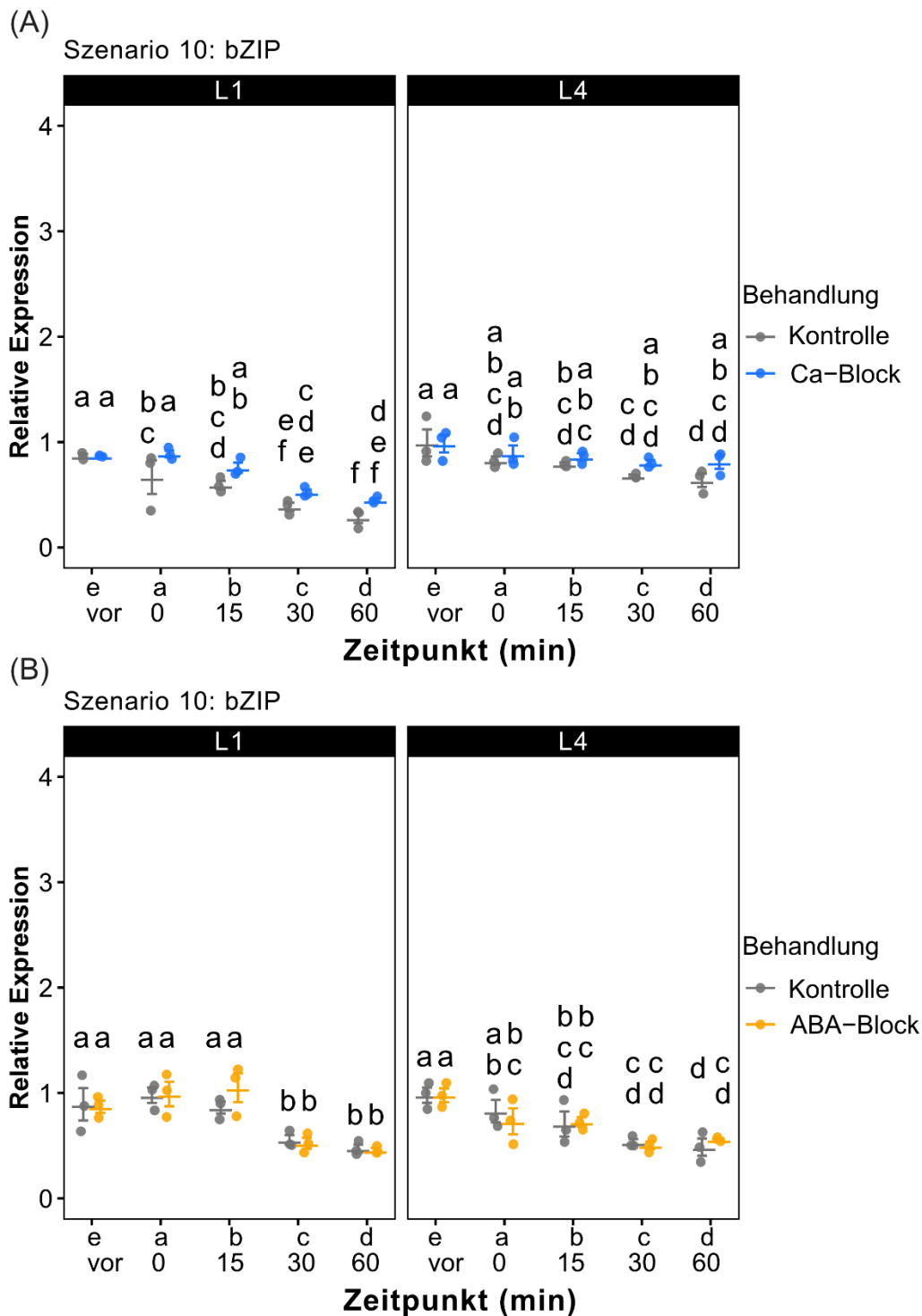
Die Ergebnisse der RT-qPCR für das Gen *bZIP* aus den Einzelblattexpositionsszenarien (5, 6 und 10) sind in den Abbildungen 4.13 – 4.15 gezeigt.



**Abbildung 4.13:** RT-qPCR-Ergebnisse des Szenarios 5 für das Gen BASIC LEUCINE ZIPPER 1 (*bZIP*) im ältesten (L1) und im jüngsten Blatt (L4) nach Blocken der Kalzium-Signalkaskade mit  $\text{LaCl}_3 + \text{EGTA}$  (Ca-Block) oder nach Blocken der Abszisinäurebiosynthese mit Naproxen (ABA-Block). A) Kalibrierte und normalisierte, relative Expression von *bZIP* in Szenario 5  $\pm$  Ca-Block in L1 und L4. B) Kalibrierte und normalisierte, relative Expression von *bZIP* in Szenario 5  $\pm$  ABA-Block in L1 und L4. Dargestellt sind Mittelwerte der normalisierten, relativen Expressionen ( $n = 3$ )  $\pm$  Standardfehler. Kalibriert wurde auf den Mittelwert des Kontrollzeitpunkts (e) und normalisiert wurde auf Aktin. Die statistische Signifikanz basiert auf einer zweifaktoriellen Varianzanalyse mit anschließendem *Fisher's*-Test ( $p \leq 0,05$ ). Unterschiedliche Buchstaben zeigen statistische Signifikanz, während gleiche Buchstaben statistisch nicht signifikant unterschiedliche Mittelwerte aufzeigen. Mittelwerte sind mit horizontalen Linien gekennzeichnet und die ausgefüllten Punkte zeigen die ermittelten Genexpressionen der drei biologischen Replikate. min = Minuten.



**Abbildung 4.14:** RT-qPCR-Ergebnisse des Szenarios 6 für das Gen *BASIC LEUCINE ZIPPER 1* (*bZIP*) im ältesten (L1) und im jüngsten Blatt (L4) nach Blocken der Kalzium-Signalkaskade mit  $\text{LaCl}_3 + \text{EGTA}$  (Ca-Block) oder nach Blocken der Abszisionsäurebiosynthese mit Naproxen (ABA-Block). A) Kalibrierte und normalisierte, relative Expression von *bZIP* in Szenario 6  $\pm$  Ca-Block in L1 und L4. B) Kalibrierte und normalisierte, relative Expression von *bZIP* in Szenario 6  $\pm$  ABA-Block in L1 und L4. Dargestellt sind Mittelwerte der normalisierten, relativen Expressionen ( $n = 3$ )  $\pm$  Standardfehler. Kalibriert wurde auf den Mittelwert des Kontrollzeitpunkts (e) und normalisiert wurde auf Aktin. Die statistische Signifikanz basiert auf einer zweifaktoriellen Varianzanalyse mit anschließendem *Fisher's*-Test ( $p \leq 0,05$ ). Unterschiedliche Buchstaben zeigen statistische Signifikanz, während gleiche Buchstaben statistisch nicht signifikant unterschiedliche Mittelwerte aufzeigen. Mittelwerte sind mit horizontalen Linien gekennzeichnet und die ausgefüllten Punkte zeigen die ermittelten Genexpressionen der drei biologischen Replikate. min = Minuten.



**Abbildung 4.15:** RT-qPCR-Ergebnisse des Szenarios 10 für das Gen *BASIC LEUCINE ZIPPER 1* (*bZIP*) im ältesten (L1) und im jüngsten Blatt (L4) nach Blocken der Kalzium-Signalkaskade mit  $\text{LaCl}_3 + \text{EGTA}$  (Ca-Block) oder nach Blocken der Abszinsäurebiosynthese mit Naproxen (ABA-Block). A) Kalibrierte und normalisierte, relative Expression von *bZIP* in Szenario 10  $\pm$  Ca-Block in L1 und L4. B) Kalibrierte und normalisierte, relative Expression von *bZIP* in Szenario 10  $\pm$  ABA-Block in L1 und L4. Dargestellt sind Mittelwerte der normalisierten, relativen Expressionen ( $n = 3$ )  $\pm$  Standardfehler. Kalibriert wurde auf den Mittelwert des Kontrollzeitpunkts (e) und normalisiert wurde auf Aktin. Die statistische Signifikanz basiert auf einer zweifaktoriellen Varianzanalyse mit anschließendem *Fisher's*-Test ( $p \leq 0,05$ ). Unterschiedliche Buchstaben zeigen statistische Signifikanz, während gleiche Buchstaben statistisch nicht signifikant unterschiedliche Mittelwerte aufzeigen. Mittelwerte sind mit horizontalen Linien gekennzeichnet und die ausgefüllten Punkte zeigen die ermittelten Genexpressionen der drei biologischen Replikate. min = Minuten.

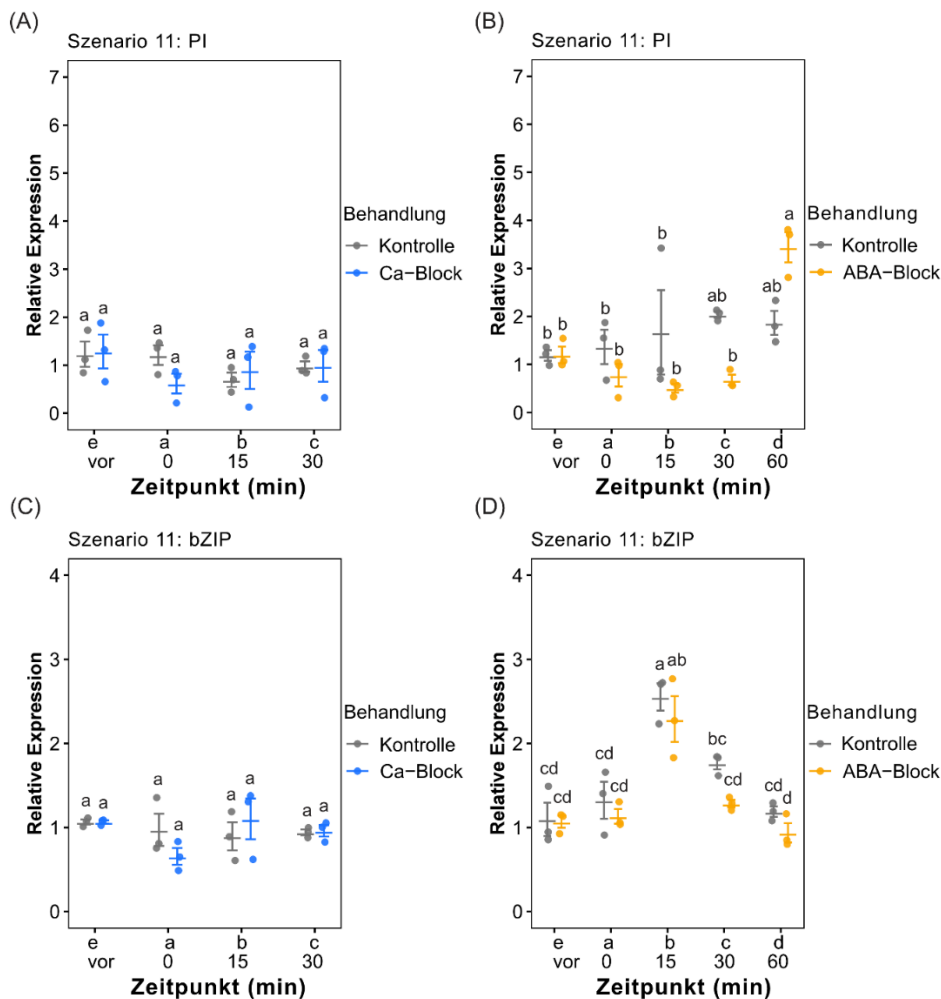
Anhand der in den Abbildungen 4.13 – 4.15 gezeigten Ergebnisse lassen sich folgende Schlussfolgerungen ziehen:

- Tendenziell ist zu beobachten, dass die *bZIP* Genexpression in beiden Versuchsreihen in beiden Blättern (L1 und L4) und in allen Szenarien über die Versuchsdauer (bis 60 Minuten nach Expositionsende) sowohl in den Kontrollbehandlungen als auch in den Chemikalienbehandlungen abnimmt. Ausnahmen bilden der Kalzium-Block im Blatt 4 von Szenario 6 und Szenario 10.
- Zudem kommt es in allen drei Expositionsszenarien vereinzelt zu statistisch signifikanten Unterschieden in den Block-Behandlungen im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollbehandlungen. In Szenario 5 ist die *bZIP*-Genexpression im Blatt 4 (geschirmt) in der ABA-Block-Behandlung zum Zeitpunkt c (30 Minuten nach Exposition) im Vergleich zur Kontrollbehandlung herunterreguliert. In Szenario 6 ist die *bZIP*-Genexpression in der Versuchsreihe mit dem Kalzium-Blocker im Blatt 1 (exponiert) zum Zeitpunkt a (0 Minuten nach Expositionsende) in der Kalzium-Blocker-Behandlung im Vergleich zur Kontrollbehandlung herunterreguliert. Abweichend davon ist die *bZIP*-Genexpression in diesem Szenario in der Versuchsreihe mit dem ABA-Block im Blatt 1 (exponiert) zu den Zeitpunkten a und b (0 Minuten und 15 Minuten nach Expositionsende) statistisch signifikant hochreguliert im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollbehandlungen. In Szenario 10 ist die *bZIP*-Genexpression in der Kalzium-Blocker-Behandlung im Blatt 1 (exponiert) zum Zeitpunkt a (0 Minuten nach Expositionsende) statistisch signifikant hochreguliert im Vergleich zur Kontrollbehandlung.

Zusammenfassend kann man sagen, dass es in den Einzelblattexpositionen zu den meisten Änderungen in der *bZIP*-Genexpression kommt. Prinzipiell reagiert die *bZIP*-Genexpression in den verschiedenen Chemikalienbehandlungen nicht differenziell zur jeweiligen Kontrollbehandlung, was den Schluss zulässt, dass sowohl ABA- als auch Kalziumsignalwege wohl nicht zu den beobachteten Änderungen der *bZIP*-Genexpression in den exponierten Blättern (L1) beitragen. Die beobachteten Ausnahmen in Blatt 4 (geschirmt) für die Szenarien 6 und 10 unterstützen diese Schlussfolgerung. Zudem zeigen unsere Daten eher keinen Nachweis auf eine systemische Reaktion.

#### 4.2.8.5. Mechanischer Stress am jüngsten Blatt (L4)

In Szenario 11 wurden die 4. Blätter (= jüngstes Blatt; L4) von Tomatenpflanzen mechanisch durch Quetschen mit einer Arterienklemme gestresst. Analog zu den Expositionsszenarien wurde auch hier entweder mit Naproxen der Abszisinsäure-Biosyntheseweg oder mit  $\text{LaCl}_3$  und EGTA die Kalziumsignalkaskade blockiert. Beprobt und analysiert wurde nur das 4. Blatt. Die RT-qPCR Analysen für dieses Szenario mit den Genen *PI* und *bZIP* sind in der Abbildung 4.16 gezeigt.

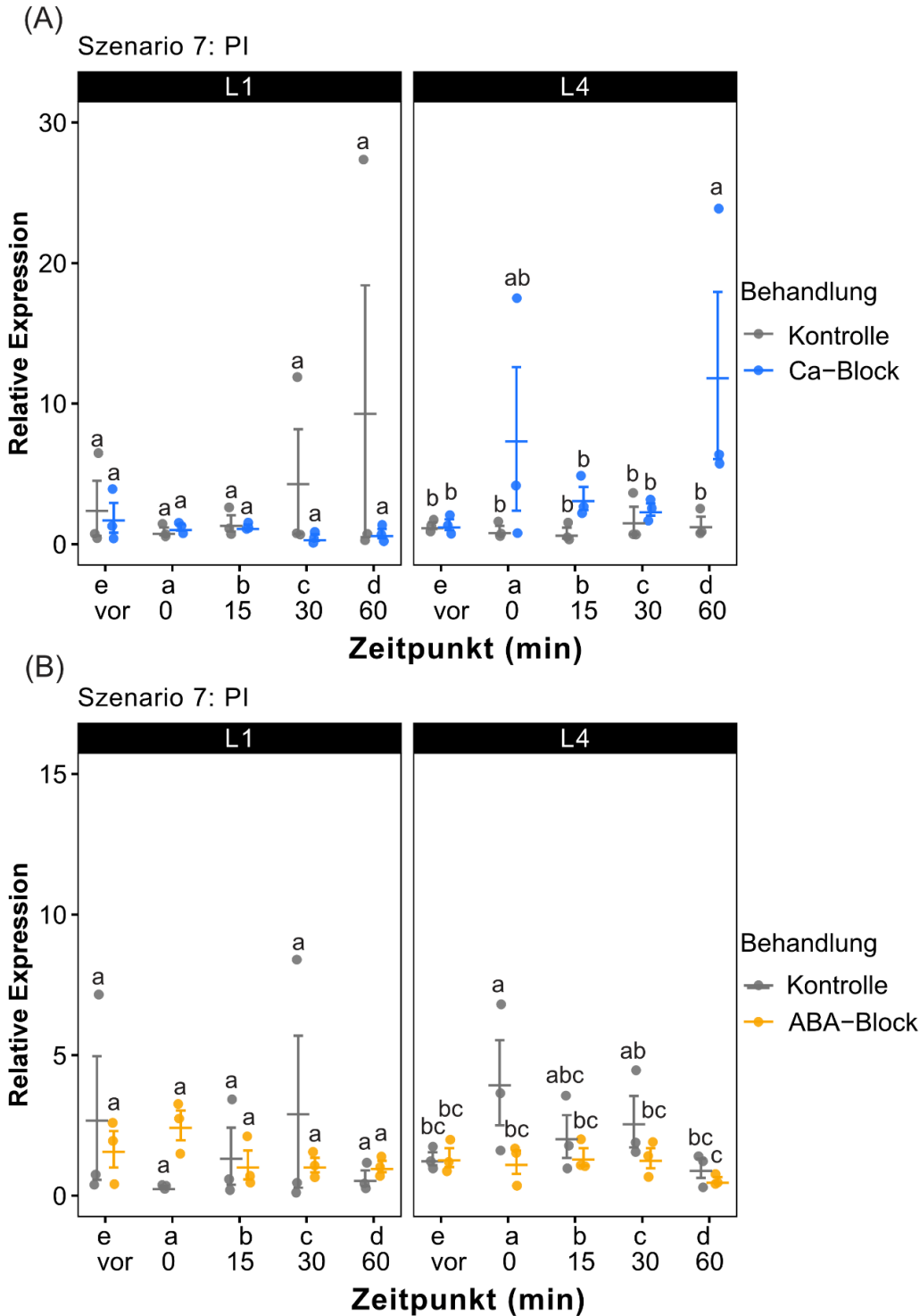


**Abbildung 4.16:** RT-qPCR-Ergebnisse des Szenarios 11 (mechanischer Stress) für die Gene *Proteinase Inhibitor II (PI)* und *BASIC LEUCINE ZIPPER 1 (bZIP)* nach Blocken der Kalzium-Signalkaskade mit  $\text{LaCl}_3$  + EGTA (Ca-Block) oder nach Blocken der Abszisinsäurebiosynthese mit Naproxen (ABA-Block). A) Kalibrierte und normalisierte, relative Expression von *PI* in Szenario 11 ± Ca-Block. B) Kalibrierte und normalisierte, relative Expression von *PI* in Szenario 11 ± ABA-Block. C) Kalibrierte und normalisierte, relative Expression von *bZIP* in Szenario 11 ± Ca-Block. D) Kalibrierte und normalisierte, relative Expression von *bZIP* in Szenario 11 ± ABA-Block. Dargestellt sind Mittelwerte der normalisierten, relativen Expressionen ( $n = 3$ ) ± Standardfehler. Kalibriert wurde auf den Mittelwert des Kontrollzeitpunkts (e) und normalisiert wurde auf Aktin. Die statistische Signifikanz basiert auf einer zweifaktoriellen Varianzanalyse mit anschließendem Tukey-Test ( $p \leq 0,05$ ). Unterschiedliche Buchstaben zeigen statistische Signifikanz, während gleiche Buchstaben statistisch nicht signifikant unterschiedliche Mittelwerte aufzeigen. Mittelwerte sind mit horizontalen Linien gekennzeichnet und die ausgefüllten Punkte zeigen die ermittelten Genexpressionen der drei biologischen Replikate. min = Minuten.

In Abbildung 4.16 sieht man, dass in der mechanischen Stressbehandlung nur in der Versuchsreihe mit ABA-Block statistisch signifikante Änderungen detektiert werden konnten. Zum Zeitpunkt b (15 Minuten nach Stressinduktion) wurde eine statistisch signifikant höhere *bZIP*-Genexpression im Vergleich zum unexponierten Kontrollzeitpunkt e detektiert. Dieser Anstieg in der *bZIP*-Genexpression wurde sowohl in der ABA-Block-Behandlung, als auch in der Kontrollbehandlung nachgewiesen, was den Rückschluss zulässt, dass dieser Anstieg nach mechanischem Stress nicht durch ABA vermittelt wird. Zusätzlich war die *PI*-Genexpression in der ABA-Block-Behandlung zum Zeitpunkt d (60 Minuten nach Stressinduktion) im Vergleich zum entsprechenden Kontrollzeitpunkt e signifikant erhöht.

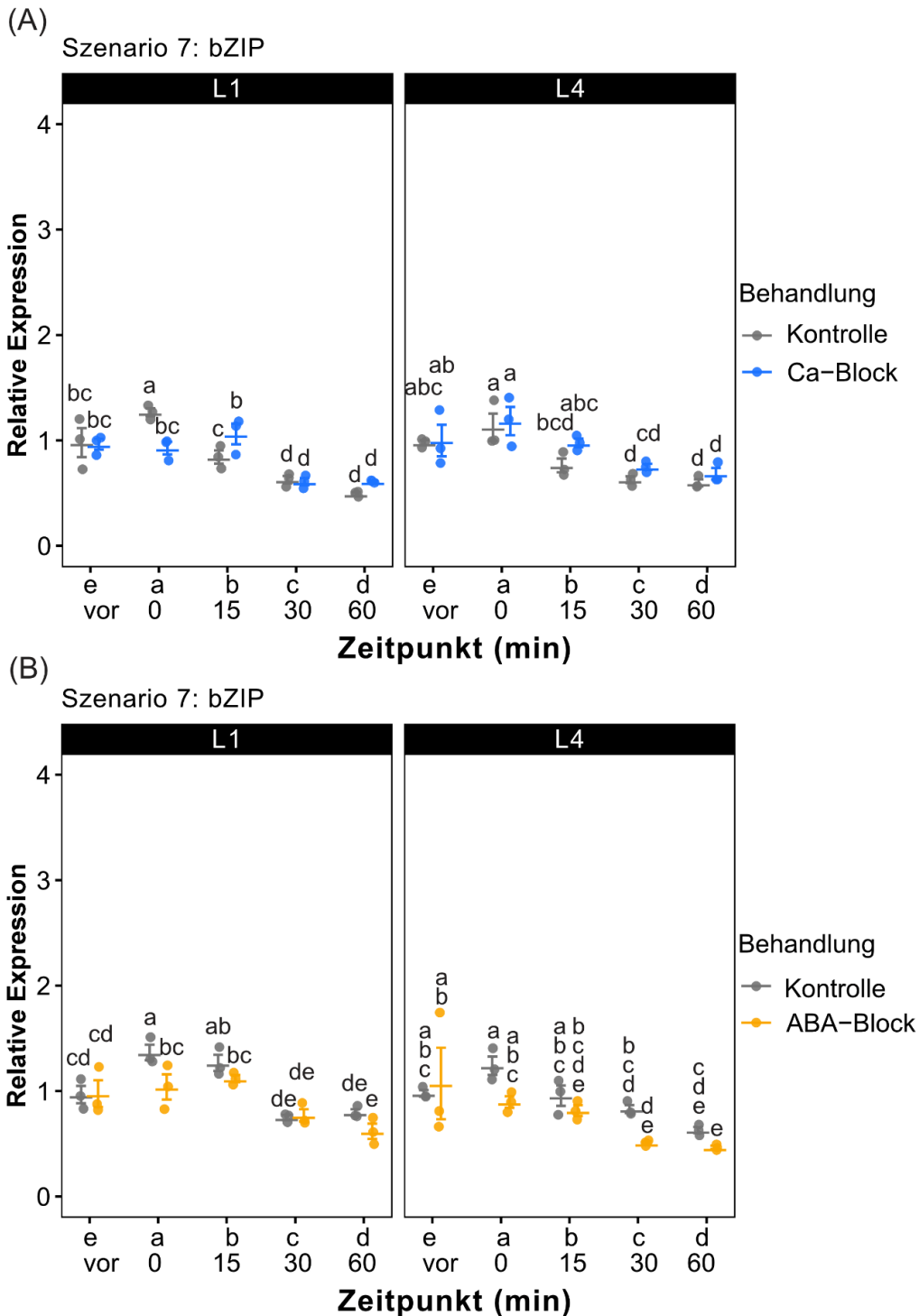
#### 4.2.8.6. Mechanischer Stress am ältesten Blatt (L1)

In Szenario 7 wurden jeweils die ältesten Blätter (L1) von Tomatenpflanzen mechanisch durch Quetschen gestresst. Beprobte und analysiert wurden jeweils L1 und L4 (jüngstes Blatt). Auch hier wurden jeweils der Abszisin säurebiosyntheseweg durch Naproxen und die Kalziumsignalkaskade mit  $\text{LaCl}_3$  und EGTA blockiert. Die Ergebnisse der RT-qPCR Analysen der Gene *bZIP* und *PI* sind in Abb. 4.17 – 4.18 dargestellt.



**Abbildung 4.17:** RT-qPCR-Ergebnisse des Szenarios 7 für das Gen *Proteinase Inhibitor II (PI)* im ältesten (L1) und im jüngsten Blatt (L4) nach Blocken der Kalzium-Signalkaskade mit  $\text{LaCl}_3 + \text{EGTA}$  (Ca-Block) oder nach Blocken der Abszisinäurebiosynthese mit Naproxen (ABA-Block). A) Kalibrierte und normalisierte, relative Expression von *PI* in Szenario 7  $\pm$  Ca-Block in L1 und L4. B) Kalibrierte und normalisierte, relative Expression von *PI* in Szenario 7  $\pm$  ABA-Block in L1 und L4. Dargestellt sind Mittelwerte der normalisierten, relativen Expressionen ( $n = 3$ )  $\pm$  Standardfehler. Kalibriert wurde auf den Mittelwert des Kontrollzeitpunkts (e) und normalisiert wurde auf Aktin. Die statistische Signifikanz basiert auf einer zweifaktoriellen Varianzanalyse mit anschließendem Fisher's-Test ( $p \leq 0,05$ ). Unterschiedliche Buchstaben zeigen statistische Signifikanz, während gleiche Buchstaben statistisch nicht signifikant unterschiedliche Mittelwerte aufzeigen. Mittelwerte sind mit horizontalen Linien gekennzeichnet und die ausgefüllten Punkte zeigen die ermittelten Genexpressionen der drei biologischen Replikate. min = Minuten.

Aus Abbildung 4.17 lässt sich schlussfolgern, dass das mechanische Stressen durch Quetschen von Blatt 1 zu keinen statistisch signifikanten Änderungen der *PI*-Genexpression in Blatt 1 führt. In Blatt 4 ist die *PI*-Genexpression zum Zeitpunkt d (60 Minuten nach Quetschen von Blatt 1) in der Kalziumblocker-Behandlung im Vergleich zu allen anderen Zeitpunkten außer Zeitpunkt a (0 Minuten nach Quetschen von Blatt 1) hochreguliert. In der Kontrollbehandlung der ABA-Block-Behandlung ist die *PI*-Genexpression in Blatt 4 (ungestresst) zum Zeitpunkt a (0 Minuten nach Exposition) signifikant höher als zum Kontrollzeitpunkt (Zeitpunkt e) und zur ABA-Block-Behandlung an diesem Zeitpunkt.



**Abbildung 4.18:** RT-qPCR-Ergebnisse des Szenarios 7 für das Gen *BASIC LEUCINE ZIPPER 1* (*bZIP*) im ältesten (L1) und im jüngsten Blatt (L4) nach Blocken der Kalzium-Signalkaskade mit  $\text{LaCl}_3 + \text{EGTA}$  (Ca-Block) oder nach Blocken der Abszisionsäurebiosynthese mit Naproxen (ABA-Block). A) Kalibrierte und normalisierte, relative Expression von *bZIP* in Szenario 7  $\pm$  Ca-Block in L1 und L4. B) Kalibrierte und normalisierte, relative Expression von *bZIP* in Szenario 7  $\pm$  ABA-Block in L1 und L4. Dargestellt sind Mittelwerte der normalisierten, relativen Expressionen ( $n = 3$ )  $\pm$  Standardfehler. Kalibriert wurde auf den Mittelwert des Kontrollzeitpunkts (e) und normalisiert wurde auf Aktin. Die statistische Signifikanz basiert auf einer zweifaktoriellen Varianzanalyse mit anschließendem *Fisher's*-Test ( $p \leq 0,05$ ). Unterschiedliche Buchstaben zeigen statistische Signifikanz, während gleiche Buchstaben statistisch nicht signifikant unterschiedliche Mittelwerte aufzeigen. Mittelwerte sind mit horizontalen Linien gekennzeichnet und die ausgefüllten Punkte zeigen die ermittelten Genexpressionen der drei biologischen Replikate. min = Minuten.

In Abbildung 4.18 sieht man, dass es in beiden Versuchsreihen zu statistisch signifikanten Änderungen der *bZIP*-Genexpression in Szenario 7 (mechanischer Stress durch Quetschen von Blatt 1) kommt. Tendenziell lässt sich auch hier beobachten, dass die *bZIP*-Genexpression in beiden Versuchsreihen in beiden Blättern (L1 und L4) über die Versuchsdauer (bis 60 Minuten nach Stressinduktion) sowohl in den Kontrollbehandlungen als auch in den Chemikalienbehandlungen abnimmt. In der Versuchsreihe mit dem Kalzium-Blocker kommt es im gestressten Blatt (L1) an den Zeitpunkten c und d (30 Minuten und 60 Minuten nach Quetschen) sowohl in der Kontroll- als auch in der Kalziumblocker-Behandlung zu statistisch signifikant niedrigeren *bZIP*-Genexpressionen im Vergleich zur ungestressten Kontrolle (Zeitpunkt e). Interessant erscheint, dass die *bZIP*-Genexpression in Blatt 1 zum Zeitpunkt a (0 Minuten nach Stressinduktion; Versuchsreihe Kalzium) bzw. zu den Zeitpunkten a und b (0 Minuten und 15 Minuten nach Stressinduktion; Versuchsreihe ABA) in der jeweiligen Kontrollbehandlung im Vergleich zum Kontrollzeitpunkt (Zeitpunkt e) signifikant erhöht ist. Diese Hochregulierung der *bZIP*-Genexpression ist in beiden Block-Behandlungen an Zeitpunkt a unterdrückt, sodass diese Regulierung durch ABA und Kalzium vermittelt sein könnte. Die Hochregulierung der *bZIP*-Genexpression in den Kontrollbedingungen zum Zeitpunkt a (Kalzium) oder zu den Zeitpunkten a und b (ABA) konnte nicht im Blatt 4 (ungestresst) nachgewiesen werden und ist somit nicht systemisch.

#### 4.2.9. Kurzzusammenfassungen der RT-qPCR-Ergebnisse

Kurzzusammenfassungen der RT-qPCR-Ergebnisse für die Genexpressionen von *bZIP* und *PI* im Vergleich zur unexponierten Kontrolle (Zeitpunkt e) für die Gesamt- und Einzelblattexpositionen bzw. mechanischen Stressinduktionen sind in den Tabellen 4.10 bis 4.13 angegeben.

**Tabelle 4.10:** Zusammenfassung der RT-qPCR-Ergebnisse für das Gen *PROTEINASE INHIBITOR II (PI)* der Gesamtexpositionsszenarien (1, 2, 3, 4, 8, 9, 11). Jüngstes Blatt = L4. Hellgrau = keine Unterschiede in der Genexpression im Vergleich zum Zeitpunkt e (unexponierte/ungestresste Kontrolle), **gelb** = Hochregulierung der Genexpression im Vergleich zum Zeitpunkt e (unexponierte/ungestresste Kontrolle). Zeitpunkt a = 0 Minuten nach Exposition/Stressinduktion, Zeitpunkt b = 15 Minuten nach Exposition/Stressinduktion, Zeitpunkt c = 30 Minuten nach Exposition/Stressinduktion, Zeitpunkt d = 60 Minuten nach Exposition/Stressinduktion. ABA = Abszinsäure, Ca = Kalzium, ns = nicht signifikant unterschiedlich.

Szenario (Gen)	Blatt	Behandlung	Zeitpunkt a	Zeitpunkt b	Zeitpunkt c	Zeitpunkt d
1 (PI)	L4	Kontrolle-Ca	ns	ns	ns	ns
1 (PI)	L4	Ca-Block	ns	ns	ns	ns
1 (PI)	L4	Kontrolle-ABA	ns	ns	ns	ns
1 (PI)	L4	ABA-Block	ns	ns	ns	ns
2 (PI)	L4	Kontrolle-Ca	ns	ns	ns	ns
2 (PI)	L4	Ca-Block	ns	ns	ns	ns
2 (PI)	L4	Kontrolle-ABA	ns	ns	ns	ns
2 (PI)	L4	ABA-Block	ns	ns	ns	ns
3 (PI)	L4	Kontrolle-Ca	ns	ns	ns	ns
3 (PI)	L4	Ca-Block	ns	ns	ns	ns
3 (PI)	L4	Kontrolle-ABA	ns	ns	ns	ns
3 (PI)	L4	ABA-Block	ns	ns	ns	ns
4 (PI)	L4	Kontrolle-Ca	ns	ns	ns	ns
4 (PI)	L4	Ca-Block	ns	ns	ns	ns
4 (PI)	L4	Kontrolle-ABA	↑	ns	ns	ns
4 (PI)	L4	ABA-Block	ns	ns	ns	ns
8 (PI)	L4	Kontrolle-Ca	ns	ns	ns	ns
8 (PI)	L4	Ca-Block	ns	ns	ns	ns
8 (PI)	L4	Kontrolle-ABA	ns	ns	ns	ns
8 (PI)	L4	ABA-Block	ns	ns	ns	ns
9 (PI)	L4	Kontrolle-Ca	ns	ns	ns	ns
9 (PI)	L4	Ca-Block	ns	ns	ns	ns
9 (PI)	L4	Kontrolle-ABA	ns	ns	ns	ns
9 (PI)	L4	ABA-Block	ns	ns	ns	ns
11 (PI)	L4	Kontrolle-Ca	ns	ns	ns	ns
11 (PI)	L4	Ca-Block	ns	ns	ns	ns
11 (PI)	L4	Kontrolle-ABA	ns	ns	ns	ns
11 (PI)	L4	ABA-Block	ns	ns	ns	↑

**Tabelle 4.11:** Zusammenfassung der RT-qPCR-Ergebnisse für das Gen *BASIC LEUCINE ZIPPER1* (*bZIP*) der Gesamtexpositionsszenarien (1, 2, 3, 4, 8, 9, 11). Jüngstes Blatt = L4. Hellgrau = keine Unterschiede in der Genexpression im Vergleich zum Zeitpunkt e (unexponierte/ungestresste Kontrolle), **blau** = Herunterregulierung der Genexpression im Vergleich zum Zeitpunkt e (unexponierte/ungestresste Kontrolle), **gelb** = Hochregulierung der Genexpression im Vergleich zum Zeitpunkt e (unexponierte/ungestresste Kontrolle). Zeitpunkt a = 0 Minuten nach Exposition/Stressinduktion, Zeitpunkt b = 15 Minuten nach Exposition/Stressinduktion, Zeitpunkt c = 30 Minuten nach Exposition/Stressinduktion, Zeitpunkt d = 60 Minuten nach Exposition/Stressinduktion. ABA = Abszinsäure, Ca = Kalzium, ns = nicht signifikant unterschiedlich.

Szenario (Gen)	Blatt	Behandlung	Zeitpunkt a	Zeitpunkt b	Zeitpunkt c	Zeitpunkt d
1 (bZIP)	L4	Kontrolle-Ca	ns	ns	ns	ns
1 (bZIP)	L4	Ca-Block	ns	ns	ns	ns
1 (bZIP)	L4	Kontrolle-ABA	ns	ns	ns	ns
1 (bZIP)	L4	ABA-Block	ns	ns	ns	ns
2 (bZIP)	L4	Kontrolle-Ca	ns	ns	ns	ns
2 (bZIP)	L4	Ca-Block	ns	ns	ns	ns
2 (bZIP)	L4	Kontrolle-ABA	ns	ns	ns	ns
2 (bZIP)	L4	ABA-Block	ns	ns	ns	ns
3 (bZIP)	L4	Kontrolle-Ca	ns	ns	↓	↓
3 (bZIP)	L4	Ca-Block	ns	ns	ns	↓
3 (bZIP)	L4	Kontrolle-ABA	ns	ns	ns	ns
3 (bZIP)	L4	ABA-Block	ns	ns	ns	ns
4 (bZIP)	L4	Kontrolle-Ca	ns	ns	ns	ns
4 (bZIP)	L4	Ca-Block	ns	ns	ns	ns
4 (bZIP)	L4	Kontrolle-ABA	ns	ns	↓	↓
4 (bZIP)	L4	ABA-Block	ns	ns	ns	ns
8 (bZIP)	L4	Kontrolle-Ca	ns	ns	ns	↓
8 (bZIP)	L4	Ca-Block	ns	ns	ns	ns
8 (bZIP)	L4	Kontrolle-ABA	ns	ns	ns	ns
8 (bZIP)	L4	ABA-Block	ns	ns	ns	ns
9 (bZIP)	L4	Kontrolle-Ca	ns	ns	ns	ns
9 (bZIP)	L4	Ca-Block	ns	ns	ns	ns
9 (bZIP)	L4	Kontrolle-ABA	ns	ns	ns	ns
9 (bZIP)	L4	ABA-Block	ns	ns	ns	↓
11 (bZIP)	L4	Kontrolle-Ca	ns	ns	ns	ns
11 (bZIP)	L4	Ca-Block	ns	ns	ns	ns
11 (bZIP)	L4	Kontrolle-ABA	ns	↑	ns	ns
11 (bZIP)	L4	ABA-Block	ns	↑	ns	ns

**Tabelle 4.12:** Zusammenfassung der RT-qPCR-Ergebnisse für das Gen *PROTEINASE INHIBITOR II (PI)* der Einzelblattexpositionsszenarien (5, 6, 10) und dem mechanischen Stressszenario (7) am ältesten Blatt. Ältestes Blatt = L1, jüngstes Blatt = L4. Hellgrau = keine Unterschiede in der Genexpression im Vergleich zum Zeitpunkt e (unexponierte/ungestresste Kontrolle), **blau** = Herunterregulierung der Genexpression im Vergleich zum Zeitpunkt e (unexponierte/ungestresste Kontrolle), **gelb** = Hochregulierung der Genexpression im Vergleich zum Zeitpunkt e (unexponierte/ungestresste Kontrolle). Zeitpunkt a = 0 Minuten nach Exposition/Stressinduktion, Zeitpunkt b = 15 Minuten nach Exposition/Stressinduktion, Zeitpunkt c = 30 Minuten nach Exposition/Stressinduktion, Zeitpunkt d = 60 Minuten nach Exposition/Stressinduktion. ABA = Abszinsäure, Ca = Kalzium, ns = nicht signifikant unterschiedlich.

Szenario (Gen)	Blatt	Behandlung	Zeitpunkt a	Zeitpunkt b	Zeitpunkt c	Zeitpunkt d
5 (PI)	L1	Kontrolle-Ca	ns	ns	ns	ns
5 (PI)	L1	Ca-Block	ns	ns	ns	ns
5 (PI)	L1	Kontrolle-ABA	ns	ns	ns	ns
5 (PI)	L1	ABA-Block	ns	ns	ns	ns
5 (PI)	L4	Kontrolle-Ca	ns	↓	↓	ns
5 (PI)	L4	Ca-Block	ns	ns	ns	ns
5 (PI)	L4	Kontrolle-ABA	ns	ns	ns	↑
5 (PI)	L4	ABA-Block	ns	ns	ns	ns
6 (PI)	L1	Kontrolle-Ca	ns	ns	ns	ns
6 (PI)	L1	Ca-Block	ns	ns	ns	ns
6 (PI)	L1	Kontrolle-ABA	ns	ns	ns	ns
6 (PI)	L1	ABA-Block	↑	ns	ns	ns
6 (PI)	L4	Kontrolle-Ca	ns	ns	ns	ns
6 (PI)	L4	Ca-Block	ns	ns	ns	ns
6 (PI)	L4	Kontrolle-ABA	ns	ns	ns	ns
6 (PI)	L4	ABA-Block	ns	ns	ns	ns
10 (PI)	L1	Kontrolle-Ca	ns	ns	ns	ns
10 (PI)	L1	Ca-Block	ns	ns	ns	ns
10 (PI)	L1	Kontrolle-ABA	ns	ns	ns	ns
10 (PI)	L1	ABA-Block	ns	ns	ns	ns
10 (PI)	L4	Kontrolle-Ca	ns	ns	ns	ns
10 (PI)	L4	Ca-Block	ns	ns	ns	ns
10 (PI)	L4	Kontrolle-ABA	ns	ns	ns	ns
10 (PI)	L4	ABA-Block	ns	ns	ns	ns
7 (PI)	L1	Kontrolle-Ca	ns	ns	ns	ns
7 (PI)	L1	Ca-Block	ns	ns	ns	ns
7 (PI)	L1	Kontrolle-ABA	ns	ns	ns	ns
7 (PI)	L1	ABA-Block	ns	ns	ns	ns
7 (PI)	L4	Kontrolle-Ca	ns	ns	ns	ns
7 (PI)	L4	Ca-Block	ns	ns	Ns	↑
7 (PI)	L4	Kontrolle-ABA	↑	ns	ns	ns
7 (PI)	L4	ABA-Block	ns	ns	ns	ns

**Tabelle 4.13:** Zusammenfassung der RT-qPCR-Ergebnisse für das Gen *BASIC LEUCINE ZIPPER1* (bZIP) der Einzelblattexpositionsszenarien (Szenario 5, 6, 10) und dem mechanischen Stressszenario (Szenario 7) am ältesten Blatt. Ältestes Blatt = L1, jüngstes Blatt = L4. Hellgrau = keine Unterschiede in der Genexpression im Vergleich zum Zeitpunkt e (unexponierte/ungestresste Kontrolle), **blau** = Herunterregulierung der Genexpression im Vergleich zum Zeitpunkt e (unexponierte/ungestresste Kontrolle), **gelb** = Hochregulierung der Genexpression im Vergleich zum Zeitpunkt e (unexponierte/ungestresste Kontrolle). Zeitpunkt a = 0 Minuten nach Exposition/Stressinduktion, Zeitpunkt b = 15 Minuten nach Exposition/Stressinduktion, Zeitpunkt c = 30 Minuten nach Exposition/Stressinduktion, Zeitpunkt d = 60 Minuten nach Exposition/Stressinduktion. ABA = Abszisionsäure, Ca = Kalzium, ns = nicht signifikant unterschiedlich.

Szenario (Gen)	Blatt	Behandlung	Zeitpunkt a	Zeitpunkt b	Zeitpunkt c	Zeitpunkt d
5 (bZIP)	L1	Kontrolle-Ca	ns	↓	↓	↓
5 (bZIP)	L1	Ca-Block	ns	↓	↓	↓
5 (bZIP)	L1	Kontrolle-ABA	ns	ns	ns	↓
5 (bZIP)	L1	ABA-Block	ns	ns	ns	↓
5 (bZIP)	L4	Kontrolle-Ca	ns	↓	↓	↓
5 (bZIP)	L4	Ca-Block	↓	↓	↓	↓
5 (bZIP)	L4	Kontrolle-ABA	ns	↓	↓	↓
5 (bZIP)	L4	ABA-Block	ns	↓	↓	↓
6 (bZIP)	L1	Kontrolle-Ca	ns	ns	↓	↓
6 (bZIP)	L1	Ca-Block	ns	ns	↓	↓
6 (bZIP)	L1	Kontrolle-ABA	ns	ns	↓	↓
6 (bZIP)	L1	ABA-Block	↑	ns	ns	↓
6 (bZIP)	L4	Kontrolle-Ca	ns	ns	ns	↓
6 (bZIP)	L4	Ca-Block	ns	ns	ns	ns
6 (bZIP)	L4	Kontrolle-ABA	ns	ns	↓	↓
6 (bZIP)	L4	ABA-Block	ns	↓	↓	↓
10 (bZIP)	L1	Kontrolle-Ca	↓	↓	↓	↓
10 (bZIP)	L1	Ca-Block	ns	ns	↓	↓
10 (bZIP)	L1	Kontrolle-ABA	ns	ns	↓	↓
10 (bZIP)	L1	ABA-Block	ns	ns	↓	↓
10 (bZIP)	L4	Kontrolle-Ca	ns	↓	↓	↓
10 (bZIP)	L4	Ca-Block	ns	ns	ns	ns
10 (bZIP)	L4	Kontrolle-ABA	ns	↓	↓	↓
10 (bZIP)	L4	ABA-Block	↓	↓	↓	↓
7 (bZIP)	L1	Kontrolle-Ca	↑	ns	↓	↓
7 (bZIP)	L1	Ca-Block	ns	ns	↓	↓
7 (bZIP)	L1	Kontrolle-ABA	↑	↑	ns	ns
7 (bZIP)	L1	ABA-Block	ns	ns	ns	↓
7 (bZIP)	L4	Kontrolle-Ca	ns	ns	↓	↓
7 (bZIP)	L4	Ca-Block	ns	ns	↓	↓
7 (bZIP)	L4	Kontrolle-ABA	ns	ns	ns	ns
7 (bZIP)	L4	ABA-Block	ns	ns	↓	↓

Kurzzusammenfassungen der RT-qPCR-Ergebnisse für die Genexpressionen von *bZIP* und *PI* in den ABA-Block- und Kalzium-Blocker-Behandlungen im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollbehandlungen für die Gesamt- und Einzelblattexpositionen bzw. mechanischen Stressinduktionen sind in den Tabellen 4.14 bis 4.17 angegeben.

**Tabelle 4.14:** Zusammenfassung der RT-qPCR-Ergebnisse für das Gen *PROTEINASE INHIBITOR II (PI)* der Gesamtexpositionsszenarien (1, 2, 3, 4, 8, 9, 11). ABA = Abszissinsäure, Jüngstes Blatt = L4. Hellgrau = keine Unterschiede in der Genexpression im Kalzium-Blocker (Ca-Block) oder im ABA-Block im Vergleich zur entsprechenden Kontrollbehandlung, **blau** = Herunterregulierung der Genexpression im Ca-Block oder im ABA-Block im Vergleich zur entsprechenden Kontrollbehandlung, **gelb** = Hochregulierung der Genexpression im Ca-Block oder im ABA-Block im Vergleich zur entsprechenden Kontrollbehandlung. Zeitpunkt e = vor Exposition/Stressinduktion, Zeitpunkt a = 0 Minuten nach Exposition/Stressinduktion, Zeitpunkt b = 15 Minuten nach Exposition/Stressinduktion, Zeitpunkt c = 30 Minuten nach Exposition/Stressinduktion, Zeitpunkt d = 60 Minuten nach Exposition/Stressinduktion. ns = nicht signifikant unterschiedlich.

Szenario (Gen)	Blatt	Behandlung	Zeitpunkt e	Zeitpunkt a	Zeitpunkt b	Zeitpunkt c	Zeitpunkt d
1 (PI)	L4	Ca-Block	ns	ns	ns	ns	ns
1 (PI)	L4	ABA-Block	ns	↑	ns	ns	ns
2 (PI)	L4	Ca-Block	ns	ns	ns	ns	ns
2 (PI)	L4	ABA-Block	ns	ns	ns	ns	ns
3 (PI)	L4	Ca-Block	ns	ns	ns	ns	ns
3 (PI)	L4	ABA-Block	ns	ns	ns	ns	ns
4 (PI)	L4	Ca-Block	ns	ns	ns	ns	ns
4 (PI)	L4	ABA-Block	ns	↓	ns	ns	ns
8 (PI)	L4	Ca-Block	ns	ns	ns	ns	ns
8 (PI)	L4	ABA-Block	ns	ns	ns	ns	ns
9 (PI)	L4	Ca-Block	ns	ns	ns	ns	ns
9 (PI)	L4	ABA-Block	ns	ns	ns	ns	ns
11 (PI)	L4	Ca-Block	ns	ns	ns	ns	ns
11 (PI)	L4	ABA-Block	ns	ns	ns	ns	ns

**Tabelle 4.15:** Zusammenfassung der RT-qPCR-Ergebnisse für das Gen *BASIC LEUCINE ZIPPER1* (*bZIP*) der Gesamtexpositionsszenarien (1, 2, 3, 4, 8, 9, 11). ABA = Abszinsäure, Jüngstes Blatt = L4. Hellgrau = keine Unterschiede in der Genexpression im Kalzium-Blocker (Ca-Block) oder im ABA-Block im Vergleich zur entsprechenden Kontrollbehandlung, **blau** = Herunterregulierung der Genexpression im Ca-Block oder im ABA-Block im Vergleich zur entsprechenden Kontrollbehandlung, **gelb** = Hochregulierung der Genexpression im Ca-Block oder im ABA-Block im Vergleich zur entsprechenden Kontrollbehandlung. Zeitpunkt e = vor Exposition/Stressinduktion, Zeitpunkt a = 0 Minuten nach Exposition/Stressinduktion, Zeitpunkt b = 15 Minuten nach Exposition/Stressinduktion, Zeitpunkt c = 30 Minuten nach Exposition/Stressinduktion, Zeitpunkt d = 60 Minuten nach Exposition/Stressinduktion. ns = nicht signifikant unterschiedlich.

Szenario (Gen)	Blatt	Behandlung	Zeitpunkt e	Zeitpunkt a	Zeitpunkt b	Zeitpunkt c	Zeitpunkt d
1 (bZIP)	L4	Ca-Block	ns	ns	ns	ns	ns
1 (bZIP)	L4	ABA-Block	ns	ns	ns	ns	ns
2 (bZIP)	L4	Ca-Block	ns	ns	ns	ns	ns
2 (bZIP)	L4	ABA-Block	ns	ns	ns	ns	ns
3 (bZIP)	L4	Ca-Block	ns	ns	ns	ns	ns
3 (bZIP)	L4	ABA-Block	ns	ns	ns	ns	ns
4 (bZIP)	L4	Ca-Block	ns	ns	ns	ns	ns
4 (bZIP)	L4	ABA-Block	ns	ns	ns	↑	ns
8 (bZIP)	L4	Ca-Block	ns	ns	ns	ns	ns
8 (bZIP)	L4	ABA-Block	ns	ns	ns	ns	ns
9 (bZIP)	L4	Ca-Block	ns	ns	ns	ns	ns
9 (bZIP)	L4	ABA-Block	ns	ns	ns	ns	ns
11 (bZIP)	L4	Ca-Block	ns	ns	ns	ns	ns
11 (bZIP)	L4	ABA-Block	ns	ns	ns	ns	ns

**Tabelle 4.16:** Zusammenfassung der RT-qPCR-Ergebnisse für das Gen *PROTEINASE INHIBITOR II* (*PI*) der Einzelblattexpositionsszenarien (5, 6, 10) und dem mechanischen Stressszenario (7) am ältesten Blatt. ABA = Abszinsäure, ältestes Blatt = L1, jüngstes Blatt = L4. Hellgrau = keine Unterschiede in der Genexpression im Kalzium-Blocker (Ca-Block) oder im ABA-Block im Vergleich zur entsprechenden Kontrollbehandlung, **blau** = Herunterregulierung der Genexpression im Ca-Block oder im ABA-Block im Vergleich zur entsprechenden Kontrollbehandlung, **gelb** = Hochregulierung der Genexpression im Ca-Block oder im ABA-Block im Vergleich zur entsprechenden Kontrollbehandlung. Zeitpunkt e = vor Exposition/Stressinduktion, Zeitpunkt a = 0 Minuten nach Exposition/Stressinduktion, Zeitpunkt b = 15 Minuten nach Exposition/Stressinduktion, Zeitpunkt c = 30 Minuten nach Exposition/Stressinduktion, Zeitpunkt d = 60 Minuten nach Exposition/Stressinduktion. ns = nicht signifikant unterschiedlich.

Szenario (Gen)	Blatt	Behandlung	Zeitpunkt e	Zeitpunkt a	Zeitpunkt b	Zeitpunkt c	Zeitpunkt d
5 (PI)	L1	Ca-Block	ns	ns	ns	ns	↑
5 (PI)	L1	ABA-Block	ns	ns	ns	ns	ns
5 (PI)	L4	Ca-Block	ns	ns	ns	ns	ns
5 (PI)	L4	ABA-Block	ns	ns	ns	ns	↓
6 (PI)	L1	Ca-Block	ns	ns	ns	ns	ns
6 (PI)	L1	ABA-Block	ns	↑	ns	ns	ns
6 (PI)	L4	Ca-Block	ns	ns	ns	ns	↑
6 (PI)	L4	ABA-Block	ns	↑	↑	ns	ns
10 (PI)	L1	Ca-Block	ns	ns	ns	ns	↓
10 (PI)	L1	ABA-Block	ns	ns	↑	ns	ns
10 (PI)	L4	Ca-Block	ns	↑	ns	ns	ns

Szenario (Gen)	Blatt	Behandlung	Zeitpunkt e	Zeitpunkt a	Zeitpunkt b	Zeitpunkt c	Zeitpunkt d
10 (PI)	L4	ABA-Block	ns	ns	ns	↓	ns
7 (PI)	L1	Ca-Block	ns	ns	ns	ns	ns
7 (PI)	L1	ABA-Block	ns	ns	ns	ns	ns
7 (PI)	L4	Ca-Block	ns	ns	ns	ns	↑
7 (PI)	L4	ABA-Block	ns	↓	ns	ns	ns

**Tabelle 4.17:** Zusammenfassung der RT-qPCR-Ergebnisse für das Gen *BASIC LEUCINE ZIPPER1* (*bZIP*) der Einzelblattexpositionsszenarien (5, 6, 10) und dem mechanischen Stressszenario (7) am ältesten Blatt. ABA = Abszissinsäure, ältestes Blatt = L1, jüngstes Blatt = L4. Hellgrau = keine Unterschiede in der Genexpression im Kalzium-Blocker (Ca-Block) oder im ABA-Block im Vergleich zur entsprechenden Kontrollbehandlung, **blau** = Herunterregulierung der Genexpression im Ca-Block oder im ABA-Block im Vergleich zur entsprechenden Kontrollbehandlung, **gelb** = Hochregulierung der Genexpression im Ca-Block oder im ABA-Block im Vergleich zur entsprechenden Kontrollbehandlung. Zeitpunkt e = vor Exposition/Stressinduktion, Zeitpunkt a = 0 Minuten nach Exposition/Stressinduktion, Zeitpunkt b = 15 Minuten nach Exposition/Stressinduktion, Zeitpunkt c = 30 Minuten nach Exposition/Stressinduktion, Zeitpunkt d = 60 Minuten nach Exposition/Stressinduktion. ns = nicht signifikant unterschiedlich.

Szenario (Gen)	Blatt	Behandlung	Zeitpunkt e	Zeitpunkt a	Zeitpunkt b	Zeitpunkt c	Zeitpunkt d
5 (bZIP)	L1	Ca-Block	ns	ns	ns	ns	ns
5 (bZIP)	L1	ABA-Block	ns	ns	ns	ns	ns
5 (bZIP)	L4	Ca-Block	ns	ns	ns	ns	ns
5 (bZIP)	L4	ABA-Block	ns	ns	ns	↓	ns
6 (bZIP)	L1	Ca-Block	ns	↓	ns	ns	ns
6 (bZIP)	L1	ABA-Block	ns	↑	↑	ns	ns
6 (bZIP)	L4	Ca-Block	ns	ns	ns	ns	ns
6 (bZIP)	L4	ABA-Block	ns	ns	ns	ns	ns
10 (bZIP)	L1	Ca-Block	ns	↑	ns	ns	ns
10 (bZIP)	L1	ABA-Block	ns	ns	ns	ns	ns
10 (bZIP)	L4	Ca-Block	ns	ns	ns	ns	ns
10 (bZIP)	L4	ABA-Block	ns	ns	ns	ns	ns
7 (bZIP)	L1	Ca-Block	ns	↓	↑	ns	ns
7 (bZIP)	L1	ABA-Block	ns	↓	ns	ns	ns
7 (bZIP)	L4	Ca-Block	ns	ns	ns	ns	ns
7 (bZIP)	L4	ABA-Block	ns	ns	ns	ns	ns

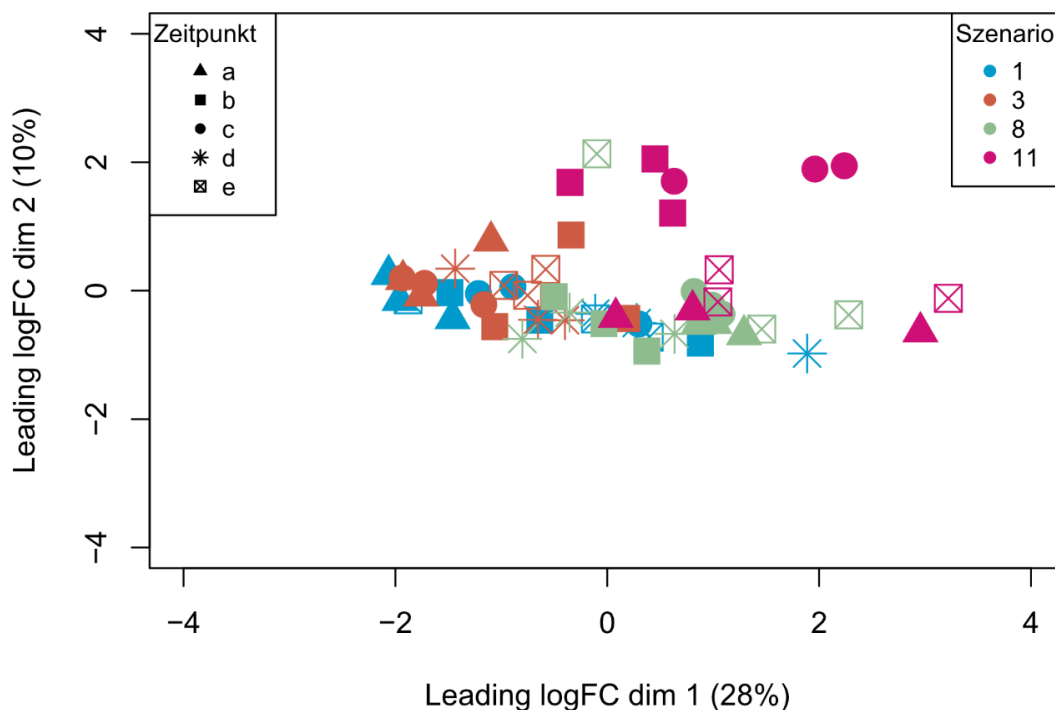
#### 4.2.10. Wiederholung der Transkriptomanalyse

Für die Wiederholung der Transkriptomanalyse wurden vergleichbare Proben zu AP3 genommen und zwar Proben aus den Szenarien 1, 3, 8 und 11. Da die Kontrollproben der Kalziumblocker-Behandlung (Besprühen mit einer 250-fachen NaOH-Verdünnung) am vergleichbarsten zu den AP3-Proben erschienen wurden diese nach RNA-Extraktion (die Qualität der RNA-Proben wurde auch hier mit dem Agilent Bioanalyzer überprüft) zum Sequenzieren an die Novogene GmbH verschickt. Die Qualität der *Read-Mappings* war sehr gut und da es diesmal zu keinen

Schwierigkeiten bei der Versuchsdurchführung kam, konnten alle Proben gleichzeitig verarbeitet werden, sodass keine Batch-Effekte entstanden.

Zur genaueren Bewertung der Datenqualität wurden die Proben in einem multidimensionalen Skalierungsplot (MDS-Plot) mit der `plotMDS()`-Funktion aus dem Bioconductor-Paket `limma` in R (R Version 3.4.0, `limma_3.32.2`) visualisiert. Die räumliche Anordnung zwischen gepaarten Proben, dargestellt als *leading log2-fold change*, liefert eine zweidimensionale Darstellung der Probenbeziehungen. Der *leading log2-fold change* ist hier definiert als geschätzte quadratische Abweichung der 500 Gene mit der größten Standardabweichung zwischen allen Proben. Für Details, siehe Arbeitspaket 3.

Der normalisierte MDS-Plot für die RNA-Sequenzierungen aus AP4 (Szenario 1, 3, 8, und 11) ist in Abbildung 4.19 dargestellt.



**Abbildung 4.19:** Normalisierter MDS-Plot der Transkriptomdaten aus AP4 (Szenario 1, 3, 8, und 11).

Die differenzielle Genexpressionsanalyse wurde wie in AP3 durchgeführt, indem zunächst alle Zeitpunkte zwischen allen Szenarien paarweise verglichen wurden. Gene wurden dann als signifikant differenziell exprimiert bezeichnet, wenn der *log2-fold change* größer gleich  $\pm 1$  war und der *False Discovery Rate*-Wert (FDR-Wert) unter 0,05 lag. Die Details zur Bestimmung von differenziell exprimierten Genen sind

unter Arbeitspaket 3 angegeben. Diese Analyse ergab die in Tabelle 4.18 gezeigte Anzahl an differenziell exprimierten Genen.

**Tabelle 4.18:** Anzahl differenziell exprimierter Gene innerhalb der einzelnen Zeitpunkte verglichen zwischen den unterschiedlichen Versuchsszenarien (1, 3, 8, 11). NA = nicht berechenbar (da es in Szenario 11 keinen Zeitpunkt d gab), Sz. = Szenario, vs = versus, verglichen mit.

Zeitpunkt	Vergleich Sz.1 vs Sz.3	Vergleich Sz.1 vs Sz.8	Vergleich Sz.1 vs Sz.11	Vergleich Sz.3 vs Sz.8	Vergleich Sz.3 vs Sz.11	Vergleich Sz.8 vs Sz.11
e	0	963	2247	2786	3546	1497
a	6	552	2470	125	2176	7
b	0	0	446	0	282	336
c	0	0	1293	41	1488	773
d	0	0	NA	0	NA	NA

Aus Tabelle 4.18 ist ersichtlich, dass es bereits zum Zeitpunkt e zu einer hohen Anzahl an differenziell exprimierten Genen kommt und somit zu einer hohen biologischen Variabilität bereits vor Beginn der einzelnen Expositions- und Stressszenarien. Deswegen ist bei dem vorliegenden Versuchsdesign, ähnlich zu AP3, der Vergleich zwischen den Szenarien wenig aufschlussreich und es wurde zudem, analog zu AP3, die Anzahl aller differenziell exprimierten Gene innerhalb jedes Szenarios im Vergleich zur unexponierten Kontrolle (Zeitpunkt e) ermittelt. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 4.19 gezeigt.

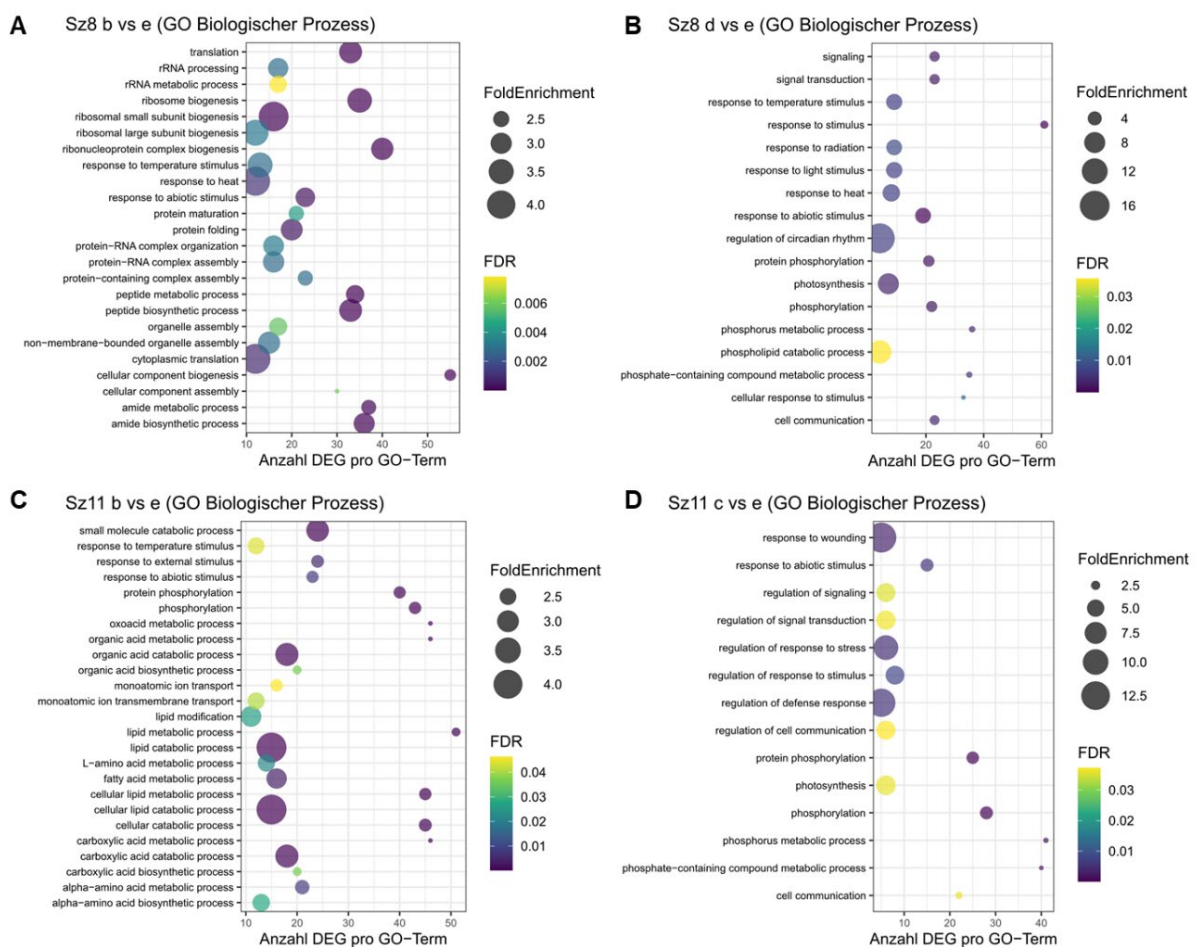
**Tabelle 4.19:** Anzahl an differenziell exprimierten Genen innerhalb der einzelnen Expositions- und Stressszenarien im Vergleich zur unexponierten Kontrolle (Zeitpunkt e). NA = nicht berechenbar, da es in Szenario 11 keinen Zeitpunkt d gab.

Zeitpunkt	Szenario 1	Szenario 3	Szenario 8	Szenario 11
a	52	33	206	147
b	2	6	2007	2788
c	4	17	543	1168
d	77	41	926	NA

In Tabelle 4.19 zeigt sich, dass es zu deutlichen Änderungen in der Genexpression in Szenario 8 und in Szenario 11 (mechanischer Stress durch Quetschen) kommt. Gerade zu Zeitpunkt b kommt es zu Expressionsänderungen bei mehr als 2000 Genen in beiden Szenarien. Im Vergleich dazu kommt es in Szenario 1 und Szenario 3 hingegen zu differenziellen Genexpressionen von nur wenigen Genen.

Um die detektierten differenziell exprimierten Gene biologischen Prozessen zuzuordnen wurde eine Genontologie-Analyse über die Panther-Datenbank durchgeführt ([Link zur Panther-Datenbank](#)). Die Ergebnisse wurden als Text-Dateien

heruntergeladen und anschließend mit dem ggplot2-Paket in R als *Bubble-Plots* visualisiert (Wickham, 2016). Analog zu AP3 spiegelt sich das Maß der Anreicherung (*FoldEnrichment*) in der Größe der dargestellten Kreise wider. Zur besseren Übersichtlichkeit der *Bubble-Plots* wurden die Ergebnislisten nach dem Maß der Anreicherung sortiert und gefiltert. Die Filterkriterien sind in den einzelnen *Plots* direkt angegeben. Die Ergebnisse für die Vergleiche Szenario 8 Zeitpunkt b gegenüber Zeitpunkt e, Szenario 8 Zeitpunkt d gegenüber Zeitpunkt e, Szenario 11 Zeitpunkt b gegenüber e und Szenario 11 Zeitpunkt c gegenüber Zeitpunkt e sind in Abbildung 4.20 gezeigt.



**Abbildung 4.20:** Genontologie-Analysen (GO-Analysen) differenziell exprimierter Gene der Szenarien 8 und 11 aus unterschiedlichen Zeitpunktsvergleichen. GO Analyse in der Kategorie biologischer Prozess aller Gene, die A) in Szenario 8 zum Zeitpunkt b im Vergleich zum Zeitpunkt e, B) in Szenario 8 zum Zeitpunkt d im Vergleich zum Zeitpunkt e, C) in Szenario 11 zum Zeitpunkt b im Vergleich zum Zeitpunkt e und D) in Szenario 11 zum Zeitpunkt c im Vergleich zum Zeitpunkt e differenziell exprimiert sind. Die Größe der Kreise in A - D repräsentiert die Anreicherung der in unseren Datensätzen detektierten Gene zu dem jeweiligen biologischen Prozess im Vergleich zur Anzahl der im Genom vorkommenden Gene zum jeweiligen biologischen Prozess. Die Farbe der Kreise zeigt die statistische Signifikanz (FDR) der Anreicherung. Die Datensätze in A und C wurden vorab nach *FoldEnrichment* > 2 und *Counts* > 10 gefiltert. Die Datensätze in B und D wurden vorab nur nach *FoldEnrichment* > 2 gefiltert. DEG = differenziell exprimierte Gene, FDR = *False Discovery Rate*, GO = Genontologie.

Abbildung 4.20 zeigt, dass sich die differenziell exprimierte Gene in Szenario 8 zum Zeitpunkt b (15 Minuten nach Exposition) im Vergleich zum unexponierten Kontrollzeitpunkt (Zeitpunkt e) in allgemeine Stressreaktionen (*response to abiotic stimulus*), „rRNA-Prozessierung“ (*rRNA processing*) oder auch in „Antwort auf Temperaturstimulus“ (*response to temperature stimulus*) gruppieren lassen. Differenziell exprimierte Gene, die in Szenario 8 zum Zeitpunkt d (60 Minuten nach Exposition) erscheinen, gruppieren unter anderem in GO-Kategorien, wie „Antwort auf Strahlung“ (*response to radiation*) und „zelluläre Antwort auf einen Stimulus“ (*cellular response to stimulus*). Differenziell exprimierte Gene aus Szenario 11 zum Zeitpunkt b (15 Minuten nach Exposition) gruppieren in GO-Kategorien „Antwort auf abiotischen Stimulus“ (*response to abiotic stimulus*), „Protein-Phosphorylierung“ (*protein phosphorylation*), und „Antwort auf einen Temperaturstimulus“ (*response to temperature stimulus*). Differenziell exprimierte Gene, die in Szenario 11 zum Zeitpunkt c (30 Minuten nach Exposition) im Vergleich zum Kontrollzeitpunkt e erscheinen gruppieren unter anderem in die GO-Kategorien „Antwort auf Verletzung“ (*response to wounding*), „Regulierung der Signaltransduktion“ (*regulation of signal transduction*), „Antwort auf einen Stimulus“ (*regulation of response to stimulus*), und „Regulierung der Abwehrantwort“ (*regulation of defense response*) und konstituieren somit die mechanische Stress-Antwort.

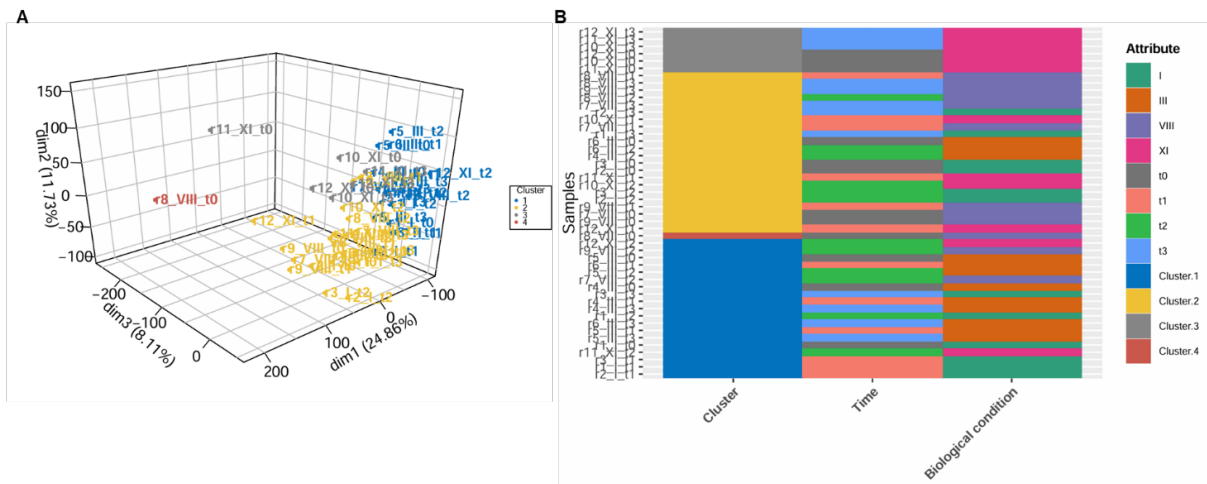
Die GO-Analyse der Liste an differenziell exprimierten Genen aus Szenario 8 und dem Vergleich Zeitpunkt c gegenüber Zeitpunkt e lieferte nur GO: 0009628 (*Response to abiotic stimulus* = Antwort auf einen abiotischen Stimulus). Die Gene, die in diese GO-Kategorie fallen, sind in Tabelle 4.20 dargestellt.

**Tabelle 4.20:** Liste an Genen, die innerhalb des Szenarios 8 zum Zeitpunkt c im Vergleich zum Kontrollzeitpunkt e differenziell exprimiert sind und der signifikant angereicherten Genontologie GO:0009628 (*response to abiotic stimulus*) zugeordnet werden können. Zusätzlich sind die detektierten Genexpressionsunterschiede als *log2-fold change* angegeben zu den entsprechenden Zeitpunkten a, b, c, d im Vergleich zum Kontrollzeitpunkt e. DEG = differenziell exprimiertes Gen, FC = *fold change*, GO = Genontologie, vs = verglichen mit.

GO-Term	Gen-ID	Annotation	log2 FC (a vs e)	log2 FC (b vs e)	log2 FC (c vs e)	log2 FC (d vs e)
GO: 0009628 <i>Response to abiotic stimulus</i>	Solyc06g011370	CHAPERONE PROTEIN CLPB4, MITOCHONDRIAL	kein DEG	kein DEG	-1,5	-1,4
	Solyc08g062960	HEAT STRESS TRANSCRIPTION FACTOR A-2	kein DEG	-1,35	-1,8	-1,4
	Solyc03g005760	CHLOROPHYLL A-B BINDING PROTEIN 1C, CHLOROPLASTIC	kein DEG	1,06	1,26	1,36

GO-Term	Gen-ID	Annotation	log2 FC (a vs e)	log2 FC (b vs e)	log2 FC (c vs e)	log2 FC (d vs e)
	Solyc07g063600	CHLOROPHYLL A-B BINDING PROTEIN, CHLOROPLASTIC	kein DEG	1,08	1,23	1,41
	Solyc07g061730	GIBBERELLIN 2-OXIDASE	-2,39	-2,37	-2,59	-2,43
	Solyc02g080410	15.4 KDA CLASS V HEAT SHOCK PROTEIN	kein DEG	kein DEG	1,12	kein DEG
	Solyc12g006140	CHLOROPHYLL A-B BINDING PROTEIN, CHLOROPLASTIC	kein DEG	kein DEG	1,06	1,28
	Solyc10g008040	EMBRYONIC PROTEIN DC-8-LIKE	kein DEG	-3,03	-2,5	-2,22
	Solyc04g014480	15.7 KDA HEAT SHOCK PROTEIN, PEROXISOMAL	kein DEG	1,95	1,66	1,6
	Solyc07g040680	HEAT STRESS TRANSCRIPTION FACTOR A-7A-LIKE	kein DEG	-1,31	-1,83	-1,48
	Solyc03g005770	CHLOROPHYLL A-B BINDING PROTEIN 1C, CHLOROPLASTIC	kein DEG	1,13	1,18	1,24

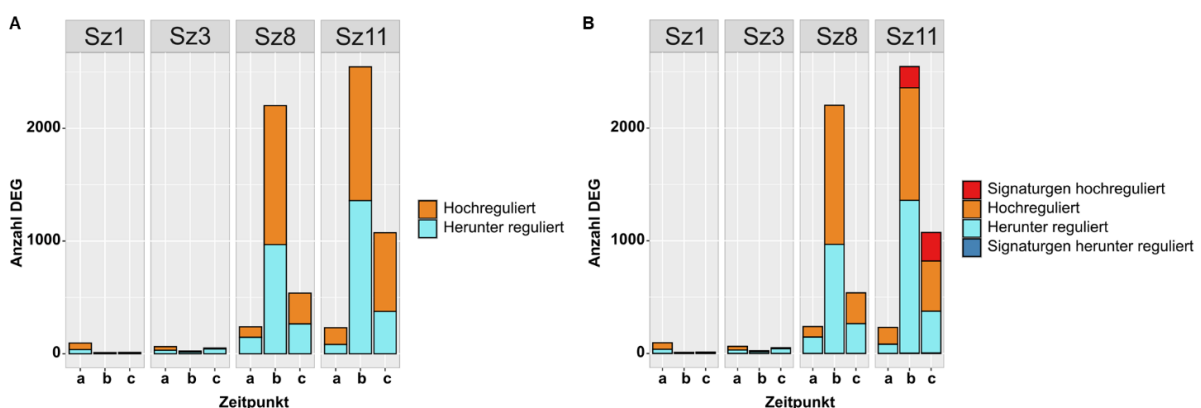
Analog zu AP3 wurde im Anschluss eine Zeitfaktoranalyse mit dem *MultiRNAFlow*-Paket in R durchgeführt (Loubaton et al., 2024). Dazu wurde aufgrund der fehlenden Daten zu Szenario 11 der Zeitpunkt d komplett ausgeschlossen. Nach dem Einlesen wurden die Daten zuerst, wie im Manual angegeben, mit einer varianzstabilisierenden Transformation normalisiert und erneut schwach exprimierte Gene aus dem Datensatz entfernt. Die Normalisierung wurde mittels der Funktion `DATANormalization()` realisiert. Die Probenbeziehungen wurden mit einer *Principal Component* Analyse (PCA) und einem anschließendem hierarchischem Clustering basierend auf den *Principal Components* (HCPC) ermittelt. Der 3D PCA-Plot mit den ermittelten HCPC-Clustern ist in Abbildung 4.21 dargestellt. Dazu wurden die Funktionen `PCAanalysis()` und `HCPCanalysis()` aus dem *MultiRNAFlow*-Paket verwendet.



**Abbildung 4.21:** *Principal Component Analysis (PCA)* und hierarchisches *Clustering* der RNA-Sequenzierdaten der Szenarien 1, 3, 8 und 11 mittels des *MultiRNAFlow*-Pakets in R. A) 3D-PCA-Plot mit HPC-Clustern der RNA-Sequenzierdaten der Szenarien 1, 3, 8 und 11. B) Zuordnung der RNA-Proben zu den detektierten HPC-Clustern.

Aus Abbildung 4.21 wird ersichtlich, dass es zwischen den technischen Replikaten der einzelnen Szenarien und Zeitpunkten deutliche Schwankungen gibt, sodass es zu keiner sauberen *Cluster*-Bildung kommt (4.21B). Grob lassen sich die Szenarien 1 und 3 in das blaue *Cluster* gruppieren, wohingegen Szenario 8 und 11 eher in das gelbe *Cluster* gruppiert werden.

Anschließend wurden mit dem *MultiRNAFlow*-Paket differenziell exprimierte Gene, spezifische Gene, und Signaturgene bestimmt (Abb. 4.22). Für Details zur Methodik und für Begriffsdefinitionen sei hier auf die detaillierten Ausführungen unter Arbeitspaket 3 verwiesen.



**Abbildung 4.22:** Differenzielle Genexpressionsanalyse mit dem R-Paket *MultiRNAFlow*. A) Darstellung der Anzahl der differenziell exprimierten Gene zu jedem Zeitpunkt (a – c) im Vergleich zur unexponierten Kontrolle (Zeitpunkt e) für jedes der getesteten Szenarien (1, 3, 8 und 11). B) Darstellung der differenziell exprimierten Gene aller Szenarien, wie in A, mit zusätzlicher Kennzeichnung sogenannter Signatur-Gene. DEG = differenziell exprimierte Gene, Sz = Szenario.

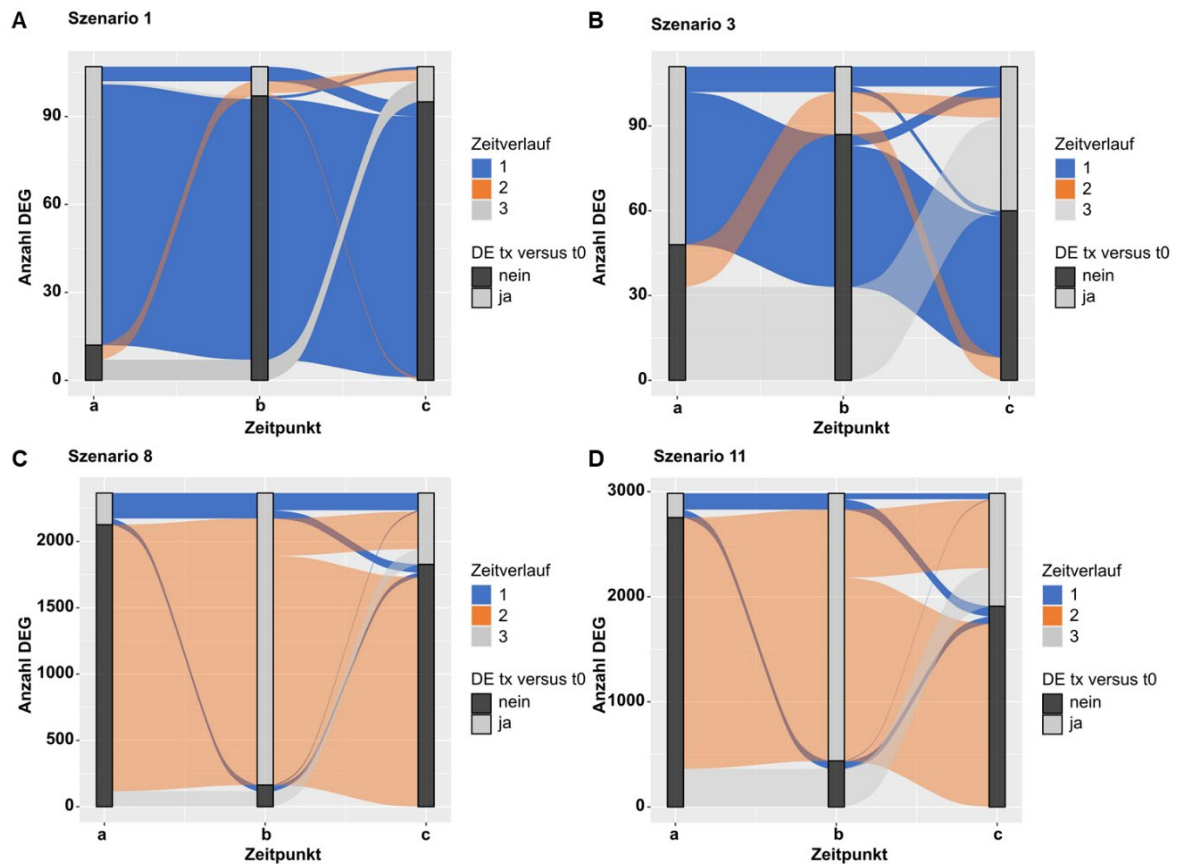
Signatur-Gene wurden nur in Szenario 11 (mechanischer Stress durch Quetschen) detektiert. Eine anschließende GO-Analyse der in Szenario 11 detektierten Signatur-Gene zeigte die in Tabelle 4.21 angegebenen GO-Terme in der Kategorie biologischer Prozess.

**Tabelle 4.21:** Genontologie-Analyse in der Kategorie biologischer Prozess der Signatur-Gene aus Szenario 11. FDR = *False Discovery Rate*, GO = Genontologie.

GO-Term	Anzahl Gene der GO-Kategorie im Genom	Anzahl Gene der GO-Kategorie im Datensatz	<i>FoldEnrichment</i>	FDR
<i>Response to wounding</i>	17	4	27,01	9,5E-03
<i>Regulation of jasmonic acid mediated signaling pathway</i>	20	4	22,95	1,52E-02
<i>Regulation of biological process</i>	2063	43	2,39	1,79E-04
<i>Biological regulation</i>	2244	44	2,25	4,55E-04
<i>Regulation of cellular process</i>	1995	43	2,47	1,79E-04

Tabelle 4.21 zeigt, dass unter anderem die GO-Terme Antwort auf Verletzung (*Response to wounding*) und Regulierung der Jasmonsäure-vermittelten Signalkaskade (*Regulation of jasmonic acid mediated signaling pathway*) signifikant angereichert sind und konstituiert somit, dass die Positivkontrolle funktioniert hat.

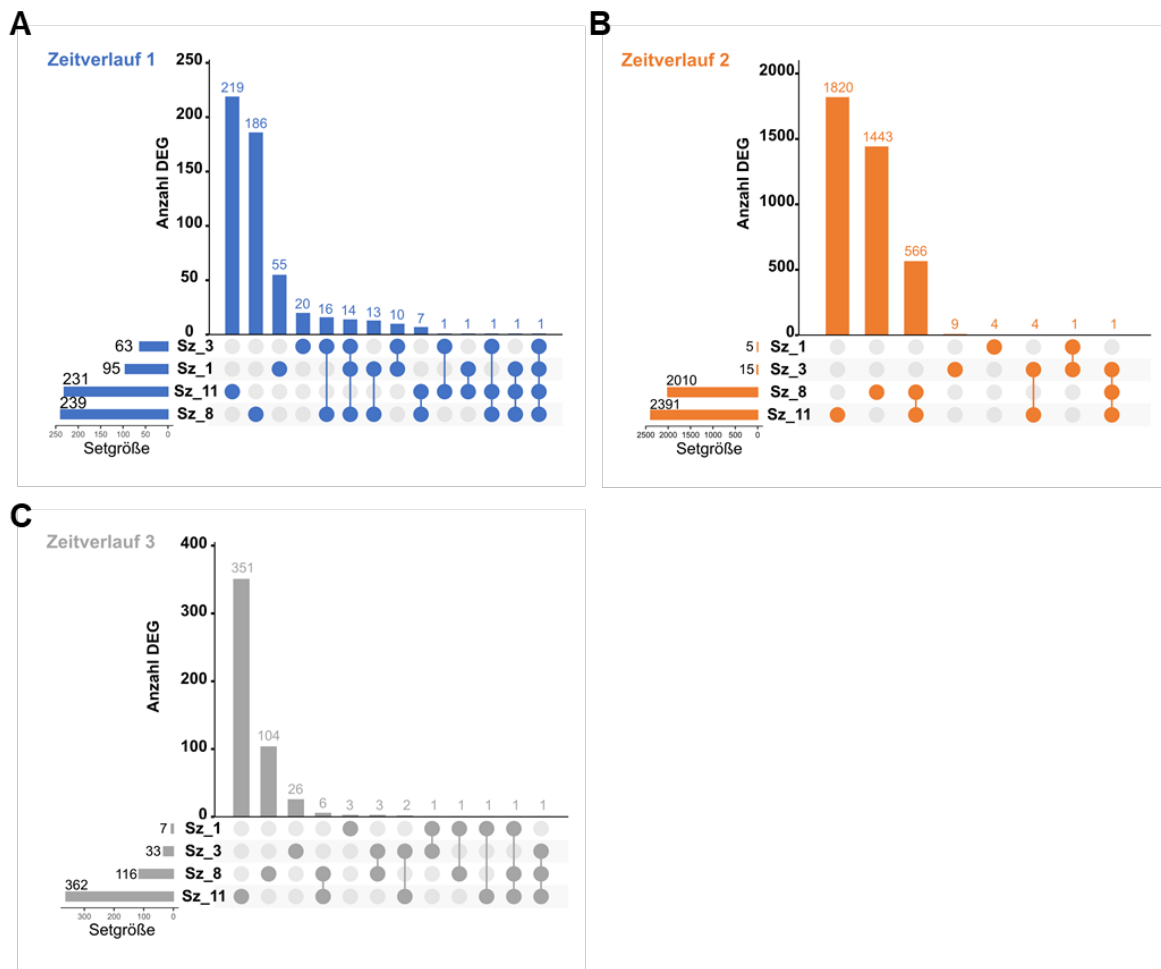
Im Anschluss wurde die Anzahl der differenziell exprimierten Gene über verschiedene Zeitverläufe ermittelt. Dabei wird pro Zeitpunkt ein Zeitverlauf bestimmt. Somit wurden in diesem Arbeitspaket drei Zeitverläufe ermittelt. In Zeitverlauf 1 werden alle Gene bestimmt, die mindestens am Zeitpunkt a differenziell exprimiert sind (sie können müssen aber nicht gleichzeitig zu Zeitpunkt b oder c differenziell exprimiert sein). Zeitverlauf 2 beinhaltet alle Gene, die zu Zeitpunkt a nicht differenziell exprimiert sind, dafür aber mindestens am Zeitpunkt b (wieder können aber müssen diese Gene nicht gleichzeitig zum Zeitpunkt c differenziell exprimiert sein). Zeitverlauf 3 beinhaltet alle Gene, die zu den Zeitpunkten a und b nicht differenziell exprimiert sind, aber mindestens zu Zeitpunkt c. Die Ergebnisse dieser Zeitverläufe sind mittels alluvialer *Plots* für die einzelnen Szenarien in Abbildung 4.23 dargestellt.



**Abbildung 4.23:** Alluviale Plots der differenziell exprimierten Gene über die einzelnen Zeitpunkte (a – c) gegenüber der unexponierten Kontrolle für die getesteten Szenarien (1, 3, 8 und 11). A) Szenario 1. B) Szenario 3. C) Szenario 8. D) Szenario 11. Zeitverlauf 1 = alle mindestens am Zeitpunkt a differenziell exprimierten Gene. Zeitverlauf 2 = alle Gene, die zum Zeitpunkt a nicht differenziell exprimiert sind, aber mindestens zum Zeitpunkt b. Zeitverlauf 3 = alle Gene, die zu den Zeitpunkten a und b nicht differenziell exprimiert sind, aber mindestens zum Zeitpunkt c. DEG = differenziell exprimierte Gene, DE tx versus t0 = differenziell exprimiert zum angegebenen Zeitpunkt tx gegenüber der unexponierten Kontrolle (t0 = Zeitpunkt e).

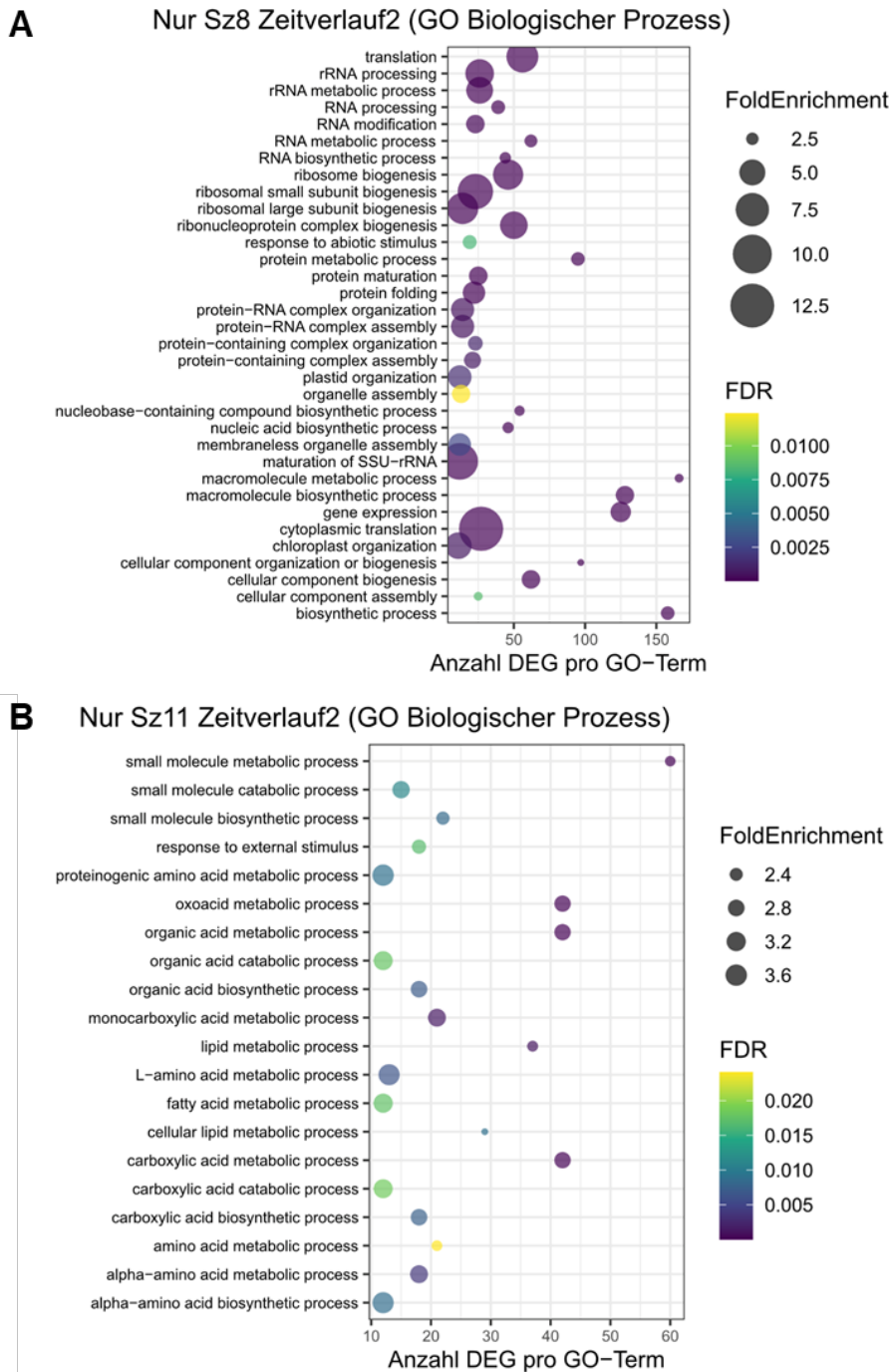
In Abbildung 4.23 lässt sich erkennen, dass die Genexpressionsänderungen in den Zeitverläufen der Szenarien 1 und 3 vergleichbar erscheinen, und die Genexpressionsänderungen der Zeitverläufe der Szenarien 8 und 11. Gerade bei den Szenarien 8 und 11 fällt auf, dass Zeitverlauf 2 am ausgeprägtesten ist.

Von den Genen innerhalb der einzelnen Zeitverläufe jedes Szenarios wurden *UpSet-Plots* mit dem UpSetR-Paket (Version 1.4.0) in R (Conway et al., 2017) erstellt, um die Schnittmengen zu bestimmen. Für die genaue Beschreibung der Methodik zur Generierung von *UpSet-Plots* sei auf Arbeitspaket 3 verwiesen. Die *UpSet-Plots* der Gene aus den einzelnen Zeitverläufen sind in Abbildung 4.24 gezeigt.



**Abbildung 4.24:** *UpSet-Plots* der einzelnen Zeitverläufe (1 – 3) aus der Zeitverlaufs-Analyse mit dem *MultiRNAFlow*-Paket aus R für die getesteten Szenarien (1, 3, 8 und 11). A) Zeitverlauf 1 = alle mindestens zum Zeitpunkt a differenziell exprimierten Gene. B) Zeitverlauf 2 = alle Gene, die zum Zeitpunkt a nicht differenziell exprimiert sind, aber mindestens zum Zeitpunkt b. C) Zeitverlauf 3 = alle Gene, die zu den Zeitpunkten a und b nicht differenziell exprimiert sind, aber mindestens zum Zeitpunkt c. DEG = differenziell exprimierte Gene.

Aus den *UpSet-Plots* der Zeitverläufe (Abb. 4.24) wird hauptsächlich ersichtlich, dass die einzelnen Szenarien eher spezifische Gene differenziell regulieren. Um diese Gene in biologische Prozesse zu gruppieren wurden erneut GO-Analysen durchgeführt und diese mittels *ggplot2* durch *Bubble-Plots* visualisiert (Abb. 4.25). Da nur für die individuellen differenziell regulierten Gene im Zeitverlauf 2 der Szenarien 8 und 11 angereicherte GO-Terme detektiert wurden, wurden die *Bubble-Plots* nur dafür erstellt.



**Abbildung 4.25:** Genontologie Analysen (GO-Analysen) der in Szenarien 8 und 11 mindestens zu Zeitpunkt b (15 Minuten nach HF-EMF Exposition oder nach Quetschen) differenziell exprimierte Gene (Zeitverlauf 2). GO-Analyse aller Gene, die A) nur in Szenario 8, aber nicht in Szenario 11 Zeitverlauf 2 folgen, und B) nur in Szenario 11, aber nicht in Szenario 8 Zeitverlauf 2 folgen. Dargestellt in A – B sind ausgewählte GO-Terme in der Kategorie biologischer Prozess (BP). Die Größe der Kreise gibt die Anreicherung der in unserem Datensatz detektierten Gene zu dem jeweiligen biologischen Prozess im Vergleich zur Anzahl der im Genom vorkommenden Gene zum jeweiligen biologischen Prozess wieder. Die Farbe der Kreise zeigt die statistische Signifikanz (FDR) der Anreicherung. Der Datensatz in A wurde vorab nach *FoldEnrichment* > 2,1 und Genanzahl > 10 gefiltert. Der Datensatz in B wurden vorab nach *FoldEnrichment* > 2,1 und Genanzahl > 11 gefiltert. DEG = differenziell exprimierte Gene, FDR = *False Discovery Rate*, GO = Genontologie, Sz = Szenario.

In Abbildung 4.25 sieht man, dass differenziell exprimierte Gene in Szenario 8, die Zeitverlauf 2 folgen, sich unter anderem in die GO-Kategorien „rRNA-Prozessierung“

(*rRNA processing*) und „Antwort auf abiotischen Stimulus“ (*response to abiotic stimulus*) gruppieren lassen. Differenziell exprimierte Gene, die in Szenario 11 Zeitverlauf 2 folgen, lassen sich unter anderem in die GO-Kategorien „Metabolischer Prozess kleiner Moleküle“ (*small molecule metabolic process*), oder auch in „Antwort auf externen Stimulus“ (*response to external stimulus*) gruppieren.

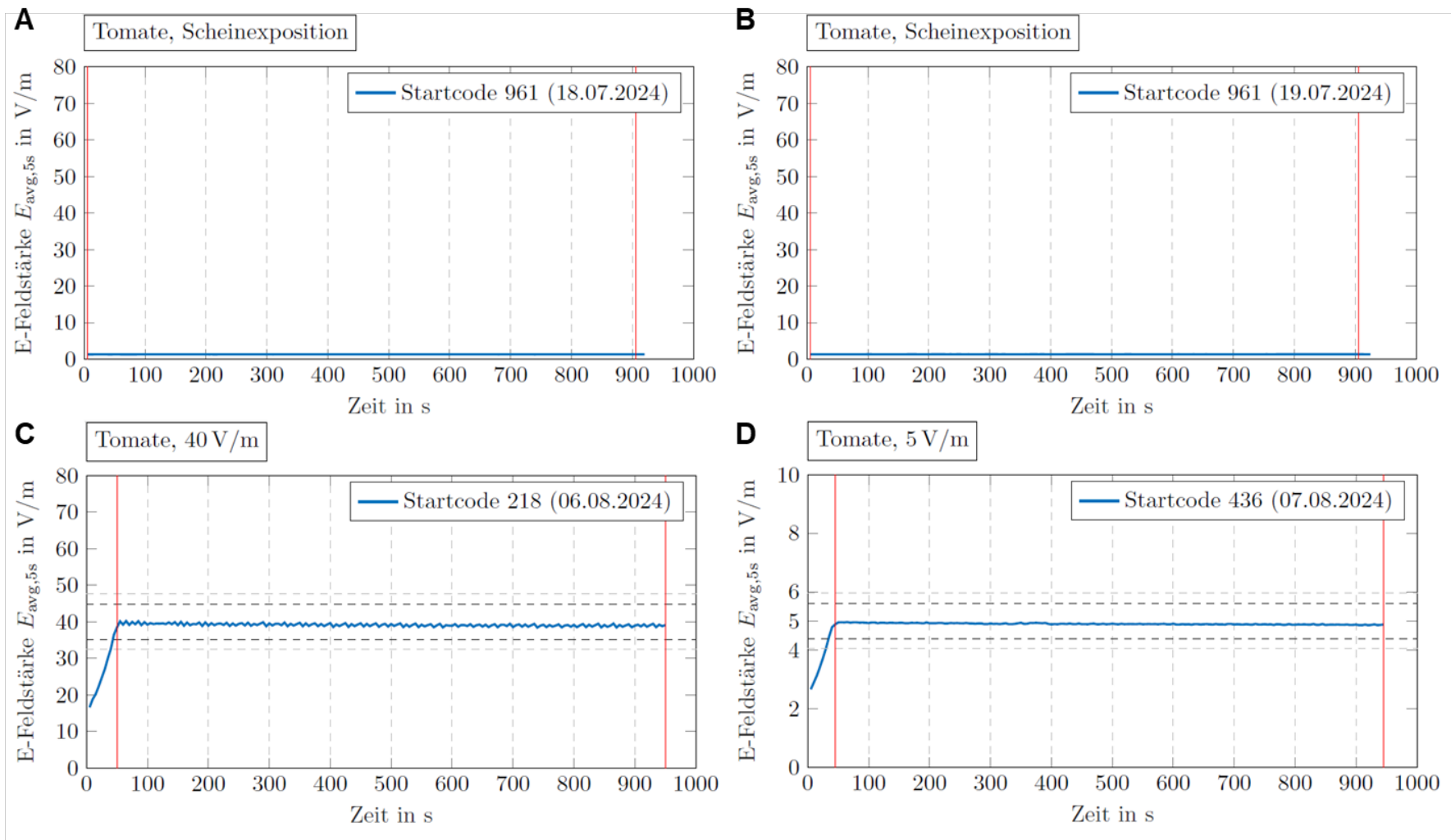
#### 4.2.11. Auflösung der Verblindung

Daraufhin wurde die Verblindung aufgelöst, in dem die Feldstärken den durchgeführten Szenarien und Startcodes zugeordnet wurden. Die Zuordnung ist in Tabelle 4.22 angegeben.

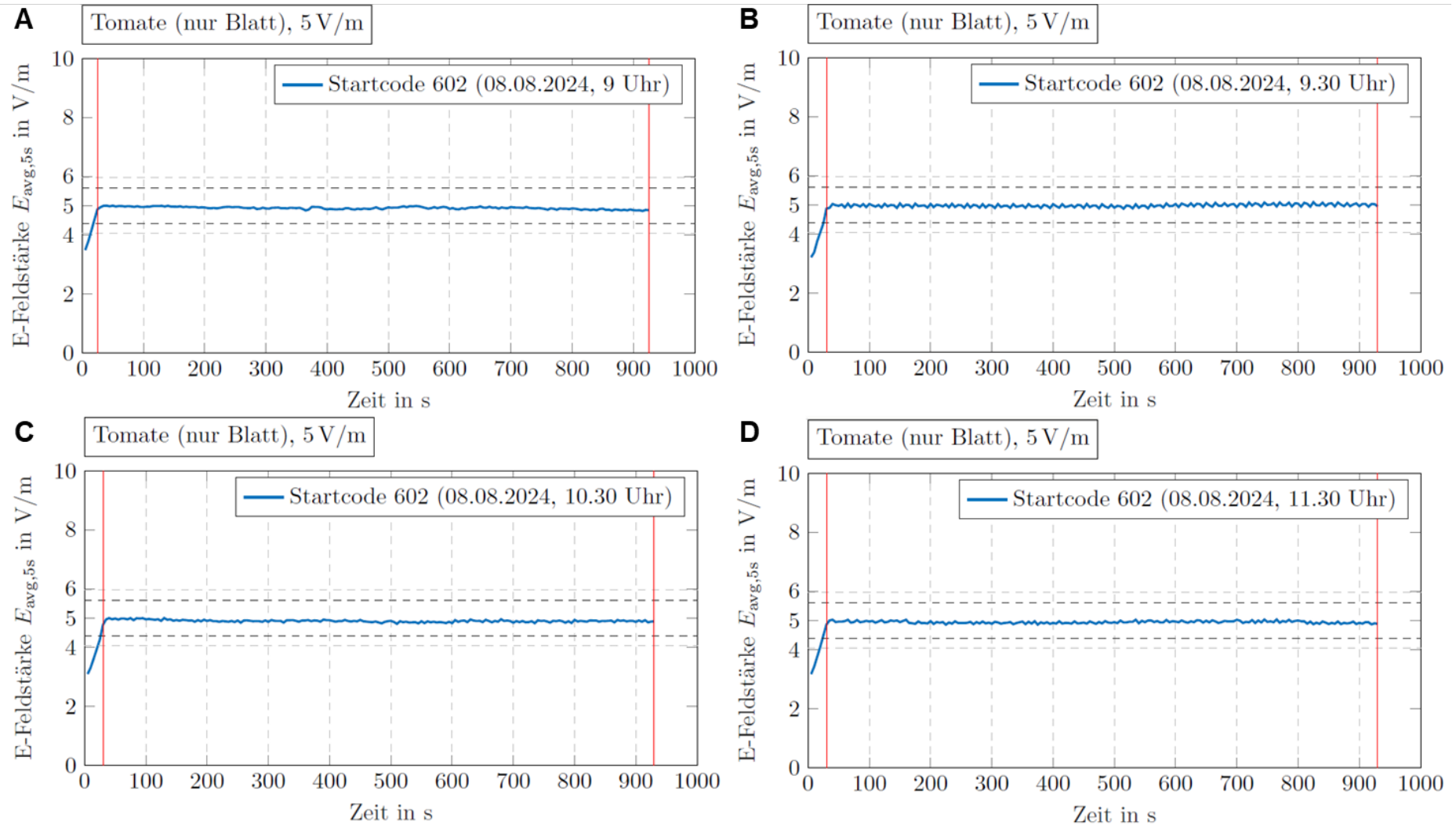
**Tabelle 4.22:** Auflösung der Verblindung durch Zuordnung der verschiedenen Szenarien und Startcodes zu den entsprechenden Feldstärken, sowie Datumsangabe der jeweiligen Versuchstage. L1 = erstes und ältestes Blatt, L4 = viertes und jüngstes Blatt. \* ein mechanischer Stress wurde immer innerhalb der Modenverwirbelungskammer und ohne Scheinexposition durchgeführt.

Szenario-Nummer	Bedingung	Datum	Exposition, Schirmung, oder mechanischer Stress: Beprobung Blatt	Feldstärke
1	Startcode: 961	18.07.2024	Gesamte Pflanze exponiert: L4	0 V/m
2	Startcode: 961	19.07.2024	Gesamte Pflanze geschirmt: L4	0 V/m
3	Startcode: 218	06.08.2024	Gesamte Pflanze exponiert: L4	40 V/m
4	Startcode: 218	06.08.2024	Gesamte Pflanze geschirmt: L4	40 V/m
5	Startcode: 602	08.08.2024	Nur ältestes Blatt (L1) exponiert: L1, L4	5 V/m
6	Startcode: 490	16.07.2024	Nur ältestes Blatt (L1) exponiert: L1, L4	40 V/m
7*	Mechanischer Stress durch Quetschen des 1. Blatts	22.07.2024	Mechanischer Stress am ältesten Blatt (L1): L1, L4	
8	Startcode: 436	07.08.2024	Gesamte Pflanze exponiert: L4	5 V/m
9	Startcode: 436	07.08.2024	Gesamte Pflanze geschirmt: L4	5 V/m
10	Startcode: 832	17.07.2024	Nur ältestes Blatt (L1) exponiert: L1, L4	0 V/m
11*	Mechanischer Stress durch Quetschen des 4. Blatts	09.08.2024	Mechanischer Stress am jüngsten Blatt (L4): L4	

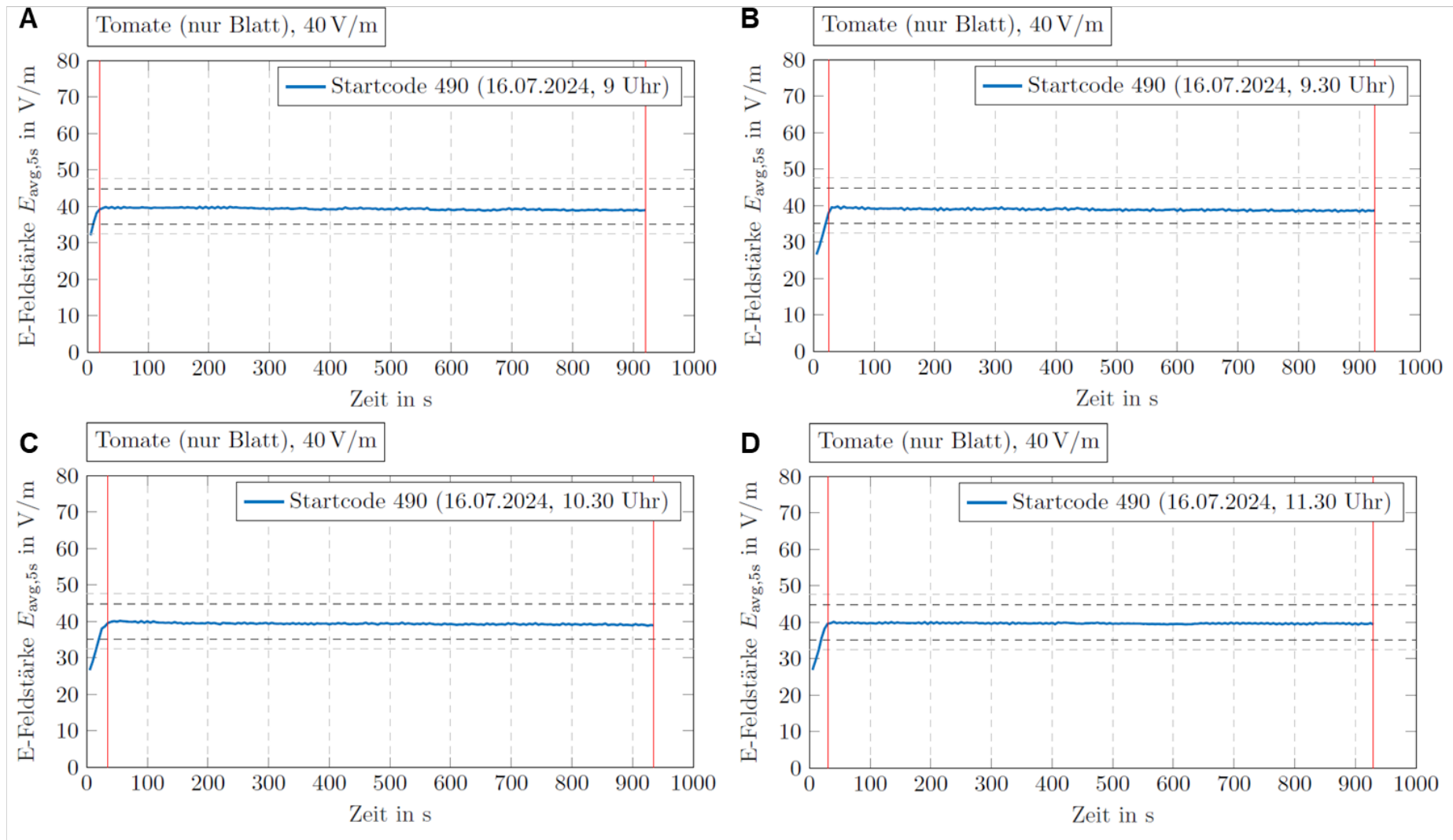
Die zugrundeliegenden Feldsondenplots sind in der Abb. 4.26 (Gesamtexpositionen) und den Abb. 4.27 - 29 (Einzelblattexpositionen) dargestellt.



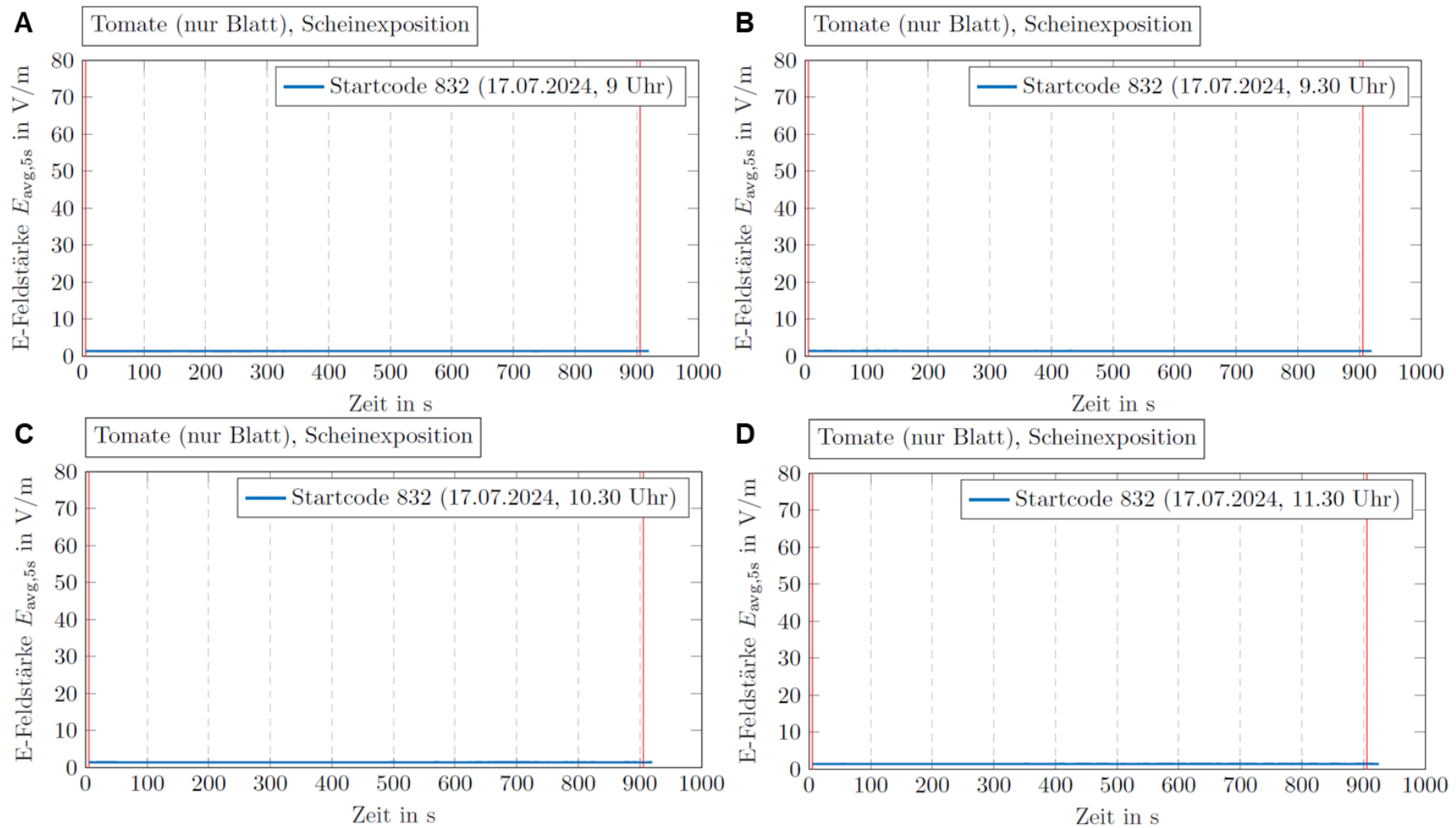
**Abbildung 4.26:** Plots der zeitlichen Verläufe der Expositionsfeldstärke für die einzelnen Versuchstage der Gesamtexpositionsszenarien (Szenarios 1, 2, 3, 4, 8 und 9). A) Szenario 1 = 0 V/m, B) Szenario 2 = 0 V/m, C) Szenarien 3 und 4 = 40 V/m, D) Szenarien 8 und 9 = 5 V/m.



**Abbildung 4.27:** Plots der zeitlichen Verläufe der Expositionsfeldstärke der unterschiedlichen Einzelblattexpositionen für Szenario 5 (Startcode: 602 = 5 V/m). A) 08.08.2024, 9:00. B) 08.08.2024, 09:30. C) 08.08.2024, 10:30. D) 08.08.2024, 11:30.



**Abbildung 4.28:** Plots der zeitlichen Verläufe der Expositionsfeldstärke der unterschiedlichen Einzelblattexpositionen für Szenario 6 (Startcode: 490 = 40 V/m). A) 16.07.2024, 9:00. B) 16.07.2024, 09:30. C) 16.07.2024, 10:30. D) 16.07.2024, 11:30.



**Abbildung 4.29:** Plots der zeitlichen Verläufe der Expositionsfeldstärke der unterschiedlichen Einzelblattexpositionen für Szenario 10 (Startcode: 832 = 0 V/m). A) 17.07.2024, 9:00. B) 17.07.2024, 09:30. C) 17.07.2024, 10:30. D) 17.07.2024, 11:30.

- 1 In den Abbildungen 4.26 – 4.29 sieht man, dass die gewünschten Feldstärken in allen
- 2 Expositionsszenarien eingehalten wurden.

## Arbeitspaket 5 Wachstum von Rosen

### 5.1. Einleitung und Zielsetzung

Ziel dieses Arbeitspakets war es, das Sprosswachstum von Rosenstecklingen der Sorte *Rosa hybrida* Knock Out® Radrazz (Meilland International) nach kurzfristiger Exposition mit hochfrequenten elektromagnetischen Feldern (HF-EMF; 900 MHz, 5 V/m) zu untersuchen. Die Experimente wurden als Replikationsstudie nach Grémiaux *et al.*, 2016 durchgeführt. Es sollten bewurzelte Rosenstecklinge verwendet werden, bei denen allerdings noch kein Sprosswachstum auftritt (ca. 10-14 Tage nach Stecklingsschnitt). Die Stecklinge sollten dann insgesamt dreimal für je 30 Minuten exponiert werden. Die einzelnen Expositionen lagen jeweils 48 h auseinander.

### 5.2. Versuchsdurchführung, Methodik, und Ergebnisse

#### 5.2.1. Modenverwirbelungskammer

Für die kontrollierte Exposition der Rosenstecklinge mit einem gleichmäßig und statistisch isotropen Feld wurde die unter Arbeitspaket 2 beschriebene mobile Modenverwirbelungskammer verwendet.

#### 5.2.2. Exposition, Verblindung, und Expositionsszenarien

Die Durchführung von im Vorfeld definierten Expositionsszenarien wurde mittels der im Projekt entwickelten Software *Fields'N'Roses* ermöglicht. Ein Expositionsszenario wurde durch eine Zielfeldstärke und eine Expositionszeit definiert. In diesem Arbeitspaket wurden insgesamt zwei Expositionsszenarien durchgeführt, nämlich 900 MHz mit der Feldstärke 0 V/m (Scheinexposition) und 900 MHz mit der Feldstärke 5 V/m. Jedes Expositionsszenario wurde pro Experiment jeweils dreimal durchgeführt und zwar mit jeweils 48 h zwischen den einzelnen Expositionen (siehe detaillierte Ausführung bei 5.2.3). Den unterschiedlichen Expositionsszenarien (900 MHz; 5 V/m für 30 Minuten oder 0 V/m für 30 Minuten) wurden im *Backend* der Software eindeutige Startcodes fest zugeordnet. Der Startcode ist eine dreistellige Zahlenkombination, die vom Institut für elektromagnetische Verträglichkeit festgelegt wurde. Die Kodierung von Expositionsszenarien mit Startcodes ermöglichte die verblindete Durchführung von Experimenten. Die Details zur Software sind unter Arbeitspaket 2 nach zu lesen. Die Untersuchung möglicher Effekte von HF-EMF auf das Sprosswachstum von Rosenstecklingen wurde insgesamt dreimal verblindet durchgeführt. Diese drei Experimente werden im Folgenden mit Rosenexperiment 1, Rosenexperiment 2 und

Rosenexperiment 3 bezeichnet. In jedem Rosenexperiment wurden die zwei oben angegebenen Expositionsszenarien durchgeführt. Da die Expositionsszenarien der einzelnen Experimente verblindet waren und wiederholt wurden, wurden die Expositionsszenarien in jedem Experiment neu nummeriert, um Verwechslungen zu vermeiden. Die Expositionsszenarien in Rosenexperiment 1 wurden mit Szenario 1 und 2 bezeichnet, in Rosenexperiment 2 mit Szenario 3 und 4, und in Rosenexperiment 3 mit Szenario 5 und 6 (Tabelle 5.1).

**Tabelle 5.1:** Zuordnung der Expositionsszenarien mit den entsprechenden Startcodes zu den drei durchgeführten Rosenexperimenten.

Rosenexperiment	Szenario und Startcode
Rosenexperiment 1	Szenario 1; 233
	Szenario 2; 193
Rosenexperiment 2	Szenario 3; 193
	Szenario 4; 233
Rosenexperiment 3	Szenario 5; 173
	Szenario 6; 567

Für Szenario 1 und 2 des Rosenexperiments 1 wurden zunächst zwei Startcodes festgelegt (Szenario 1 = 233 und Szenario 2 = 193). Die Zuordnung der Startcodes zu den definierten Expositionen blieben den Versuchsdurchführenden an der Universität Bonn bis nach der vollständigen Auswertung verborgen. Für Rosenexperiment 2 wurden dieselben Startcodes wie in Rosenexperiment 1 verwendet (Szenario 3 = 193 und Szenario 4 = 233). Für Rosenexperiment 3 wurden zwei weitere Startcodes vergeben (Szenario 5 = 173, Szenario 6 = 567; Tabelle 5.1).

### 5.2.3. Rosenaufzucht

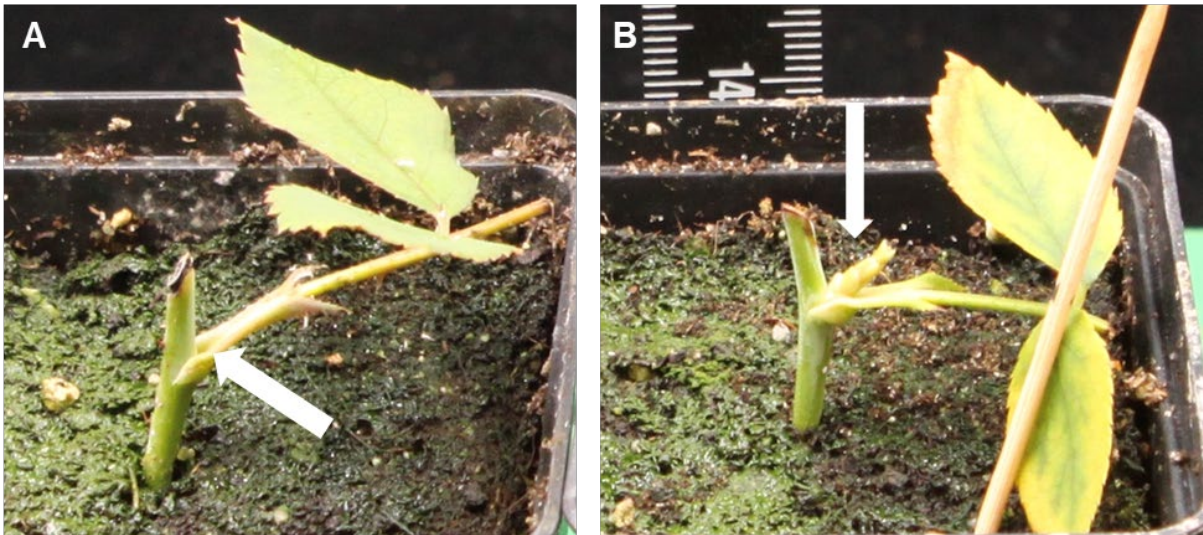
Um die Auswirkungen von HF-EMF auf das Sprosswachstum von Rosenstecklingen zu untersuchen, wurde die Sorte *Rosa hybrida* Knockout® Radrazz verwendet, da diese Sorte auch in der zu replizierenden Studie verwendet wurde (Grémiaux et al., 2016). Sogenannte „Mutterpflanzen“, d.h. Pflanzen, von denen Stecklinge gemacht werden konnten, wurden von dem Rosenzüchter Meiland International SA (Frankreich) zur Verfügung gestellt.

Stecklinge wurden von Neutrieben der Mutterpflanzen gewonnen, wobei die Stecklinge bevorzugt aus der Mitte des Neutriebs geschnitten wurden. Die Größe der Stecklinge bestand einheitlich aus zwei Knoten. Bevor der Steckling gepflanzt wurde,

wurde das geschnittene Ende des Stecklings mit Bewurzelungshormon (*TakeRoot-Rooting Hormone, GardenSafe*, bezogen über Amazon.de) bepudert, um die Bewurzelung der Stecklinge zu fördern. Die genaue Methodik zur Stecklingsgenerierung ist in den entsprechenden Studien der Arbeitsgruppe Vian nicht angegeben (Furet et al., 2014; Grémiaux et al., 2016). Insgesamt wurden für Rosenexperiment 1 pro Expositionsszenario 24 Töpfe mit jeweils 100 g Erde befüllt (ein 10:1:1 Mix aus Floragard B fein, Sand, und Perligran G), anschließend bis zur vollen Feldkapazität gewässert, d.h. vollständig mit Wasser gesättigt, und abschließend gewogen (mittleres Gewicht = 198,5 g ± 2.1 g). Pro Topf wurde ein Steckling in die Erde gepflanzt, so dass der untere Knoten komplett in der Erde war und der zweite Knoten aus der Erde herausschaute (Abb. 5.1). 24 Töpfe wurden auf eine Pflanzschale gestellt. Jede Pflanzschale erhielt eine Plastikhaube (zur Erhöhung der Luftfeuchtigkeit). Die Pflanzschalen wurden in die Pflanzenanzuchtkammer (Klimakammer 1) überführt (16 h Tag, 8 h Nacht, 26 °C Tag, 21 °C Nacht, 70% Luftfeuchtigkeit und *photosynthetic active radiation* (PAR) = 150  $\mu\text{mol} / \text{m}^2\text{s}$ ). Die Plastikhaube verblieb bis zur Durchführung des Experiments über den Pflanzschalen und wurde erst bei der Überführung der Stecklinge in die Expositions-kammer (Klimakammer 2) entfernt. Die Rosenstecklinge wurden während der Bewurzelung einheitlich feucht gehalten.

Für das Rosenexperiment 2 wurden pro Expositionsszenario 45 Stecklinge geschnitten und analog zu Rosenexperiment 1 aufgezogen. Für das Rosenexperiment 3 wurden pro Expositionsszenario 41 Stecklinge geschnitten und analog zu den beiden anderen Rosenexperimenten aufgezogen.

Für die Rosenexperimente 1 und 2 wurden die einzelnen Expositionsszenarien jeweils eine Woche zeitversetzt gestartet, da die Pflanzen über den gesamten Expositionszeitraum in der Expositions-kammer verblieben (5 Tage). Am Vorabend (18:00) zur jeweils ersten Exposition wurde die Plastikhaube der Pflanzschalen entfernt und jeder Topf mit 50 ml H<sub>2</sub>O gegossen. Zusätzlich wurde die Entwicklung des Hauptssprosses phänotypisiert (0 = kein Wachstum, 1 = Hauptssprosswachstum bereits begonnen; Abb. 5.1).



**Abbildung 5.1:** Kategorisierung der Rosenstecklinge. A) Rosensteckling, bei dem nur die Hauptsprossveranlagung (Auge) zu sehen ist (Phänotypisierung mit 0 = kein Wachstum). B) Rosensteckling, bei dem das Hauptsprosswachstum bereits begonnen hat (Phänotypisierung mit 1 = Hauptsprosswachstum bereits begonnen). Die weißen Pfeile in A und B zeigen jeweils auf die Sprossveranlagung (A) oder bereits auf den wachsenden Spross (B).

Anschließend wurden die Stecklinge in die Expositions-kammer überführt. Die Töpfe mit den Stecklingen wurden zusätzlich vor der Überführung in die Expositions-kammer auf den Pflanzschalen randomisiert verteilt, um mögliche Positionseffekte der Aufzucht auszugleichen. Die einzelnen Expositionen wurden jeweils um 09:00 gestartet (Samstag, Montag, Mittwoch). Jede Exposition dauerte 30 Minuten. Nach jeder Exposition wurde erneut ein beginnendes Hauptsprosswachstum der Rosenstecklinge dokumentiert (0 = kein Wachstum, 1 = Hauptsprosswachstum bereits begonnen). Die Stecklinge verblieben während der gesamten Expositionsphase (Freitag bis Mittwoch) in der Expositions-kammer und wurden erst nach Ende der Expositionsphase wieder in die Anzucht-kammer zur weiteren Phänotypisierung überführt. Die Durchführung des zweiten Szenarios erfolgte eine Woche zeitversetzt mit einer zweiten Charge an Stecklingen.

Für Rosenexperiment 3 wurde die für AP4 modifizierte Expositions-kammer verwendet, sodass die zwei unterschiedlichen Expositionsszenarien (Szenario 5 und Szenario 6) an denselben Tagen durchgeführt werden konnten. Eine detaillierte Beschreibung zur modifizierten Expositions-kammer findet sich unter Arbeitspaket 4. Hier wurde ein zweiter Bereich mit dem Material des Expositions-zelts innerhalb der Expositions-kammer (Klimakammer 2) abgetrennt (Abb. 4.1A), sodass innerhalb der Expositions-kammer ein Expositionsabschnitt (Abschnitt: Exposition) und ein

Schirmungsabschnitt (Abschnitt: Schirmung) realisiert wurde. Somit konnten innerhalb der Expositions-kammer gleichzeitig Pflanzen akklimatisiert und exponiert werden.

Im Rosenexperiment 3 wurden deswegen die Stecklinge beider Expositionsszenarien (Szenario 5 und Szenario 6) am Vorabend (18:00) zur Akklimatisierung in die Expositions-kammer überführt, wobei 41 Stecklinge in den Expositionsabschnitt (Abb. 4.1 Abschnitt „Exposition“) und 41 Stecklinge in den Schirmungsabschnitt (Abb. 4.1 Abschnitt „Schirmung“) überführt wurden. Am ersten Expositionstag (Samstag) wurde Szenario 5 um 09:00 gestartet. Nach Ablauf der Exposition wurden um 09:30 die Stecklinge, die im Schirmungsabschnitt waren in den Expositionsabschnitt überführt und die soeben exponierten Stecklinge in den Schirmungsabschnitt transferiert. Anschließend erfolgte die Exposition mit Szenario 6. Nach Ablauf dieser Exposition verblieben die Stecklinge in den jeweiligen Bereichen bis zur nächsten Exposition (Montag), die analog ablief, außer dass am 2. Expositionstag mit Szenario 6 gestartet wurde, da sich die Stecklinge dieses Szenarios bereits im Expositionsabschnitt befanden.

Bei allen drei Rosenexperimenten wurden nach Ablauf aller Expositionen (Mittwoch) alle Stecklinge hinsichtlich der Entwicklung und der Länge des Hauptsprosses phänotypisiert und wieder in die Anzucht-kammer (Klimakammer 1) überführt.

Der zeitliche Ablauf aller Rosenexperimente (1, 2 und 3) ist in Tabelle 5.2 dargestellt.

**Tabelle 5.2:** Zeitlicher Ablauf aller Rosenexperimente. min = Minuten.

Rosenexperiment	Datum des Stecklingschnitts	Szenario und Startcode	Datum und Dauer der Expositionen
Rosenexperiment 1	19.3.24	Szenario 1; 233	6.4.24 (30 min) 8.4.24 (30 min) 10.4.24 (30 min)
	26.3.24	Szenario 2; 193	13.4.24 (30 min) 15.4.24 (30 min) 17.4.24 (30 min)
Rosenexperiment 2	12.4.24	Szenario 3; 193	27.4.24 (30 min) 29.4.24 (30 min) 01.05.24 (30 min)
	19.4.24	Szenario 4; 233	04.05.24 (30 min) 06.05.24 (30 min) 08.05.24 (30 min)

Rosenexperiment	Datum des Stecklingsschnitts	Szenario und Startcode	Datum und Dauer der Expositionen
Rosenexperiment 3	15.7.24	Szenario 5; 173	25.07.24 (30 min)
		Szenario 6; 567	27.07.24 (30 min) 29.07.24 (30 min)

Alle Rosenstecklinge verblieben nach den Expositionen in der Pflanzenanzuchtkammer (Klimakammer 1) für den gesamten Zeitraum der nachfolgenden Phänotypisierungen (bis 72 Tage nach Ende der Exposition). Um Positionseffekte während der Phänotypisierung zu vermeiden, wurden die Stecklinge regelmäßig (1x wöchentlich) sowohl auf den Pflanzschalen als auch innerhalb der Anzuchtkammer randomisiert positioniert.

#### 5.2.4. Bewurzelung und Austrieb Hauptspross

Nach Grémiaux *et al.* (2016) wurden für die Exposition Stecklinge verwendet, die bereits bewurzelt waren, bei denen allerdings während der gesamten Expositionsphase kein Hauptsprosswachstum zu beobachten war, sondern nur die Hauptsprossveranlagung (= Auge; Abb. 5.1A). In der zu replizierenden Studie wurde angegeben, dass die zu exponierenden Rosenstecklinge 4 - 5 Wochen alt waren (Grémiaux *et al.*, 2016). Unsere Vorversuche zeigten jedoch, dass nach 4 - 5 Wochen, 100 % aller Rosenstecklinge bereits ein Hauptsprosswachstum aufweisen. Deswegen wurde für unseren ersten Rosenversuch eine erste Exposition 3 Wochen nach Stecklingsschnitt angepeilt. Die Phänotypisierung der Hauptsprossentwicklung im Rosenexperiment 1 zeigte allerdings, dass es bereits 14 Tage nach Stecklingsschnitt (DAC) zu einem Hauptsprosswachstum kam (Abbildung 5.1B).

Die Expositionen von Rosenexperiment 1 fanden 18, 20 und 22 DAC statt. Nach der letzten Exposition (22 DAC) hatte bereits bei 19 Rosenstecklingen von Szenario 1 (~ 79 %) und bei 20 Rosenstecklingen von Szenario 2 (~ 83 %) das Hauptsprosswachstum begonnen. Somit blieben von den ursprünglichen 24 Rosenstecklingen nur jeweils 5 (Szenario 1) bzw. 4 (Szenario 2) Stecklinge übrig, die aufgrund der geringen Individuenzahl und aufgrund eines Personalwechsels nicht ausgewertet wurden.

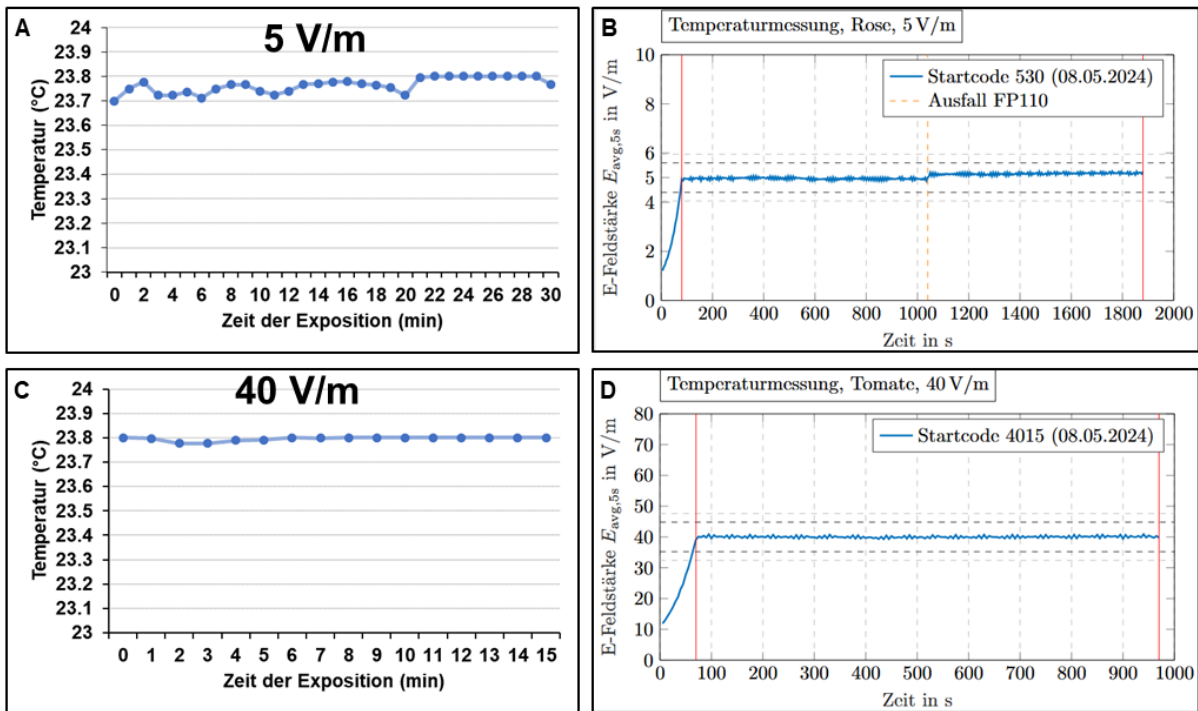
Aufgrund des frühen Hauptsprosswachstums sollte deswegen für Rosenexperiment 2 bereits 15 DAC mit den Expositionen begonnen werden. In diesem Experiment zeigte sich bereits 14 DAC bei 21 Rosenstecklingen von Szenario 3 (46,67 %) und bei 8

Rosenstecklingen von Szenario 4 (17,78 %) ein beginnendes Hauptprosswachstum. Nach Ablauf der Expositionen (19 DAC) waren es 35 Rosenstecklinge (77,78 % = Szenario 3) und 33 Rosenstecklinge (73,33 % = Szenario 4). Bei einem Rosensteckling aus Szenario 3 brach während der Phänotypisierungsphase der Hauptpross ab, sodass insgesamt 9 Stecklinge (Szenario 3) und 12 Stecklinge (Szenario 4) vollständig hinsichtlich des Haupt- und Seitensprosswachstums phänotypisiert wurden.

Diverse weitere Vorversuche zeigten, dass ab 10 DAC von einer Bewurzelung der Stecklinge ausgegangen werden kann. Um den Anteil der Stecklinge, bei denen während der Expositionsphase kein Hauptprosswachstum zu beobachten ist, möglichst hoch zu halten, wurden die Expositionen von Rosenexperiment 3 bereits 10, 12, und 14 DAC durchgeführt. Auch hier kam es zu einem beginnenden Hauptprosswachstum bei einigen Stecklingen, sodass insgesamt in diesem Experiment 24 Stecklinge (Szenario 5) und 26 Stecklinge (Szenario 6) vollständig hinsichtlich des Haupt- und Seitensprosswachstums phänotypisiert wurden.

#### 5.2.5. Temperaturmessung in Erde während verschiedener Expositionen

Zur Überprüfung, ob es zu einer Temperaturänderung in der Topferde während der verschiedenen Expositionen kommt, wurde ein bis auf 0,1°C genaues Thermometer mit Datenlogger der Firma Xylem Analytics Germany GmbH-EBRO (Deutschland) verwendet (Modell: 1340-6337 EBI 310 TE). Dazu wurde der mitgelieferte Sensor in die Erde eines bepflanzten Topfs gesteckt und Temperaturmessungen während unterschiedlicher Expositionen durchgeführt (900 MHz, 5 V/m für 30 Minuten und 900 MHz, 40 V/m für 15 Minuten). Der Datenlogger des Thermometers zeichnet jede Sekunde einen Messwert auf. Zur Auswertung wurden die Mittelwerte pro Minute berechnet (= 60 Messwerte pro Mittelwert). Gleichzeitig wurden auch für diese Versuche die Expositionsfeldstärken über die gesamte Expositionszeit aufgezeichnet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.2 dargestellt.



**Abbildung 5.2:** Temperaturmessungen in Erde während verschiedener Expositionen mit HF-EMF (900 MHz, 5 V/m oder 40 V/m) mit den entsprechenden Plots über die zeitlichen Verläufe der Expositionsfeldstärke. A) Temperaturmessung während einer 30-minütigen Exposition mit HF-EMF (5 V/m). B) Plot des zeitlichen Verlaufs der Expositionsfeldstärke zum Expositionsszenario 5 V/m für 30 Minuten während der Temperaturmessung, wie in A gezeigt. C) Temperaturmessung während einer 15-minütigen Exposition mit HF-EMF (40 V/m). D) Plot des zeitlichen Verlaufs der Expositionsfeldstärke zum Expositionsszenario 40 V/m für 15 Minuten während der Temperaturmessung, wie in C gezeigt. Dargestellt in A und C sind Mittelwerte aus 60 Messwerten pro Minute über die jeweiligen Zeiträume. Gemessen wurde mit einem EBRO-Thermometer (1340-6337 EBI 310 TE von Xylem Analytics Germany GmbH-EBRO, Deutschland; Messgenauigkeit: 0,1°C).

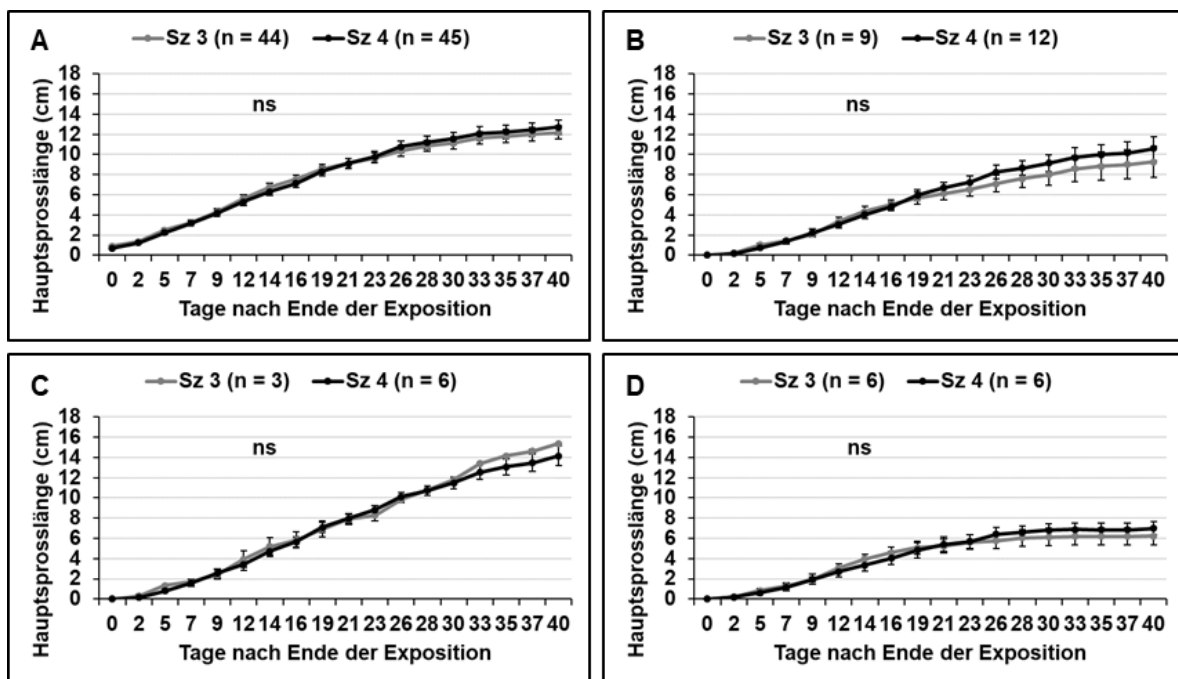
Aus Abbildung 5.2 wird ersichtlich, dass sich die geringen Temperaturunterschiede, die während der getesteten Expositionen gemessen wurden, im Bereich der Messgenauigkeit des Thermometers liegen ( $\pm 0,1^\circ\text{C}$ ). Da sowohl die Temperaturkurven als auch die zeitlichen Verläufe der Expositionsfeldstärke keine extremen oder zufälligen Schwankungen zeigen, kann geschlussfolgert werden, dass sich die beiden Messungen (Temperaturmessung und Exposition) nicht gegenseitig beeinflussen oder stören (Abb. 5.2).

### 5.2.6. Phänotypisierung und Auswertung des Hauptprosswachstums

Die Entwicklung des Hauptprosses wurde für die Rosenexperimente 1 und 2 ab 14 DAC bis zum 3. Expositionstag, wie folgt, phänotypisiert: 0 = kein Wachstum und 1 = Hauptprosswachstum bereits begonnen. Im Rosenexperiment 3 wurde bereits ab 9 DAC mit dieser Phänotypisierung begonnen. Anschließend wurden alle Stecklinge bezüglich der Hauptprosslänge phänotypisiert, indem die Länge des Hauptprosses mit einem Lineal immer montags, mittwochs, und freitags über einen Zeitraum bis 40

Tage nach Ende der Exposition (DAE) auf 0,1 cm genau gemessen wurde. Die Auswertung erfolgte einmal über alle Stecklinge, aber auch getrennt nach Stecklingen, bei denen nach Ende der Exposition das Hauptsprowswachstum noch nicht begonnen hatte. Dazu wurden Mittelwerte über alle Stecklinge eines Szenarios und jeder Kategorie (alle, Hauptsprows nach Exposition noch nicht entwickelt) berechnet. Die statistische Signifikanz zwischen den beiden Szenarien wurde für jede Kategorie mit dem *Student's t-Test* (Student, 1908) ermittelt (Signifikanzniveau  $p < 0,05$ ).

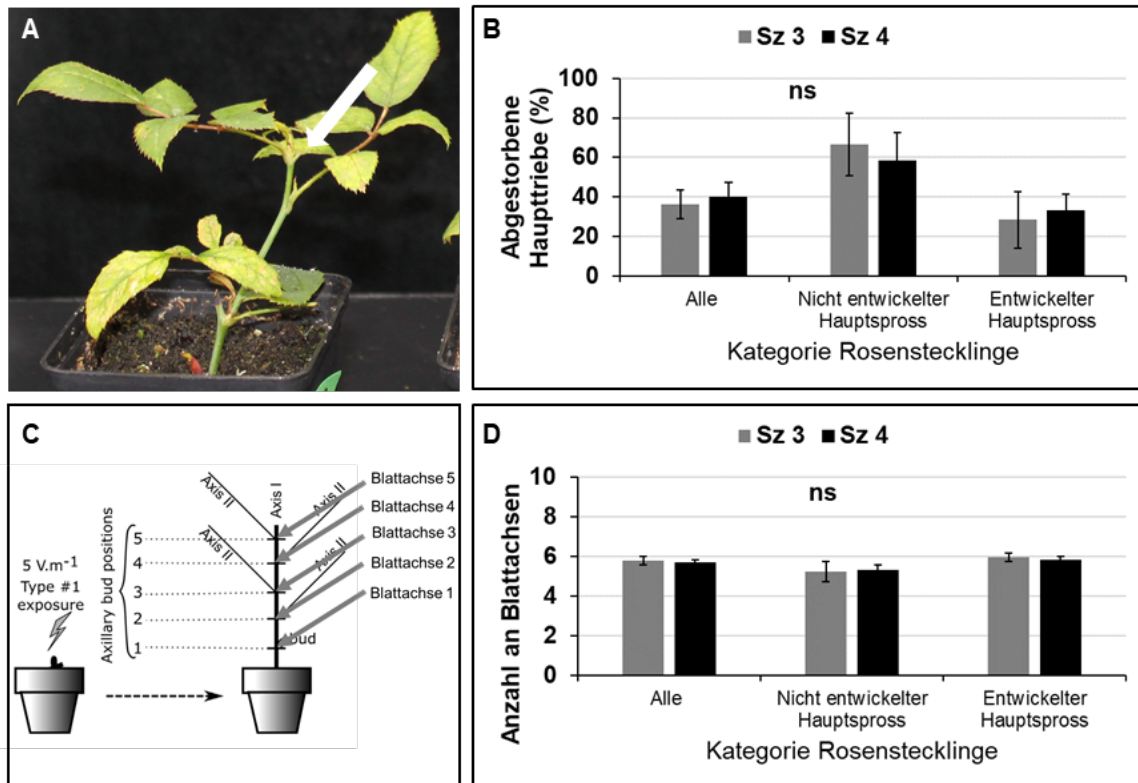
Die Ergebnisse der Hauptsprowslängen aus Rosenexperiment 2 für alle Stecklinge sind in Abbildung 5.3A und die Ergebnisse der Hauptsprowslängen aller Stecklinge, bei denen nach Ende der Exposition noch kein Hauptsprowswachstum zu beobachten war, sind in Abbildung 5.3B dargestellt.



**Abbildung 5.3:** Länge des Hauptsprows (Rosenexperiment 2) bis 40 Tage nach Exposition mit HF-EMF (900 MHz; 5 V/m) oder nach Scheinexposition (900 MHz, 0 V/m). A) Länge des Hauptsprows aller geschnittenen Stecklinge (inklusive Stecklinge, bei denen am Ende der Exposition bereits ein Hauptsprowswachstum zu beobachten war). B) Länge des Hauptsprows von ausschließlich Stecklingen, bei denen am Ende der Exposition noch kein Hauptsprows entwickelt war. C) Länge des Hauptsprows von Stecklingen, bei denen der Hauptsprows am Ende der Exposition noch nicht entwickelt war und bei denen der Hauptsprows kontinuierlich weitergewachsen ist. D) Länge des Hauptsprows von Stecklingen, bei denen der Hauptsprows am Ende der Exposition noch nicht entwickelt war und bei denen der Hauptsprows während der Wachstumsphase abgestorben ist. Gezeigt sind jeweils Mittelwerte (die Individuenzahl = n ist in den einzelnen Graphen direkt angegeben). Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Statistische Signifikanz wurde mittels *Student's t-Test* auf einem Signifikanzniveau  $p < 0,05$  ermittelt. ns = statistisch nicht signifikant unterschiedlich, Sz = Szenario.

In Rosenexperiment 2 fiel auf, dass es bei einigen Stecklingen zum Absterben des Hauptsprows während der Versuchslaufzeit kam (Abb. 5.4A). Die Häufigkeit dieses

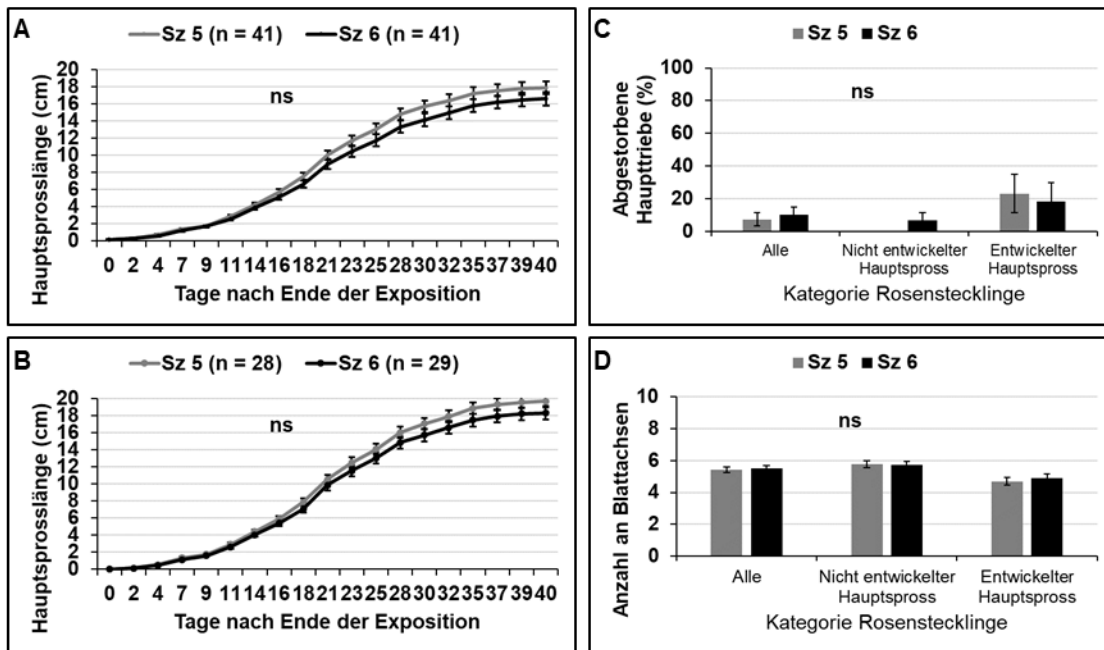
Absterbens war zwischen den Expositionsszenarien statistisch nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 5.4B).



**Abbildung 5.4:** Absterbens des Hauptsprosses und Phänotypisierung der Seitensprosse. A) Rosensteckling, bei dem der Hauptspross während der Versuchsphase abgestorben ist. Der weiße Pfeil in A zeigt auf den abgestorbenen Hauptspross. B) Statistische Auswertung zum Absterben der Hauptsprosse (Rosenexperiment 2). C) Übersicht über die verschiedenen Blattachsen eines Rosenstecklings, die sich am Hauptspross entwickeln. D) Statistische Auswertung der Anzahl der Blattachsen bei den untersuchten Rosenstecklingen (Rosenexperiment 2). Dargestellt in B und D sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler mit Unterscheidung von Stecklingen, bei denen der Hauptspross nach Ende der Exposition bereits entwickelt war und von Stecklingen, bei denen der Hauptspross nach Ende der Exposition noch nicht entwickelt war. Individuenzahlen der einzelnen Stecklings-Kategorien sind: Alle (Sz 3 = 44, Sz 4 = 45), Nicht entwickelter Hauptspross (Sz 3 = 9, Sz 4 = 12), Entwickelter Hauptspross (Sz 3 = 35, Sz 4 = 33). Statistische Signifikanz wurde mittels *Student's t*-Test auf einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  ermittelt. ns = statistisch nicht signifikant unterschiedlich, Sz = Szenario.

Das Wachstum des Hauptsprosses wurde deswegen auch zusätzlich noch nach Stecklingen unterschieden, bei denen der Hauptspross vorzeitig abstarb (Abb. 5.3C) oder nicht (Abb. 5.3D). Aus Abbildungen 5.3 und 5.4 wird ersichtlich, dass sich das Hauptsprosswachstum von Rosenstecklingen zwischen den einzelnen Expositionsszenarien (Szenario 3 gegenüber Szenario 4) statistisch nicht signifikant voneinander unterscheidet.

Die Ergebnisse des Hauptsprosswachstums aus Rosenexperiment 3 (Szenario 5 und Szenario 6) sind in Abbildung 5.5 dargestellt.



**Abbildung 5.5:** Länge des Hauptprosses bis 40 Tage nach Exposition mit HF-EMF (900 MHz; 5 V/m) oder nach Scheinexposition (900 MHz; 0 V/m) sowie Analysen zur Anzahl der Blattaachsen und zum Absterben der Haupttriebe (Rosenexperiment 3). A) Länge des Hauptprosses aller geschnittenen Stecklinge (inklusive Stecklinge, bei denen nach Ende der Exposition bereits ein Hauptprosswachstum zu beobachten war). B) Länge des Hauptprosses von ausschließlich Stecklingen, bei denen der Hauptpross nach Ende der Exposition noch nicht entwickelt war. C) Statistische Auswertung zum Absterben des Hauptprosses 42 Tage nach Ende der Exposition. D) Statistische Auswertung zur Anzahl der vom Hauptpross gebildeten Blattaachsen 42 Tage nach Ende der Exposition. In A - D sind jeweils Mittelwerte gezeigt. Die Individuenzahlen der einzelnen Stecklings-Kategorien sind: Alle (Szenario 5 = 41, Szenario 6 = 41), Nicht entwickelter Hauptpross (Szenario 5 = 28, Szenario 6 = 29), Entwickelter Hauptpross (Szenario 5 = 13, Szenario 6 = 12). Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Die statistische Signifikanz wurde mittels *Student's t-Test* auf einem Signifikanzniveau  $p < 0,05$  ermittelt. ns = statistisch nicht signifikant unterschiedlich, Sz = Szenario.

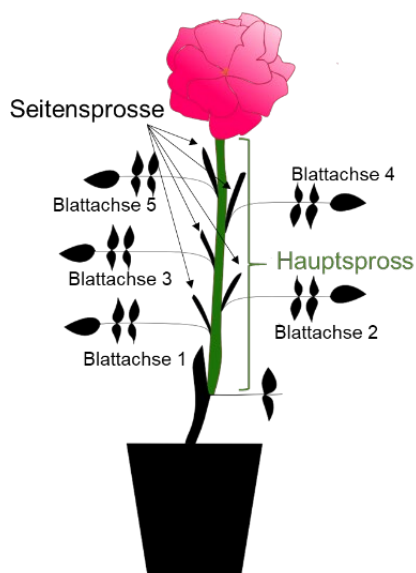
Auch in Rosenexperiment 3 konnte kein statistisch signifikant unterschiedliches Hauptprosswachstum der Rosenstecklinge zwischen den unterschiedlichen Expositionsszenarien (Szenario 5 gegenüber Szenario 6) gemessen werden. Auch das Absterben des Hauptprosses wurde nicht signifikant durch das Expositionsszenario beeinflusst (Abb. 5.5C).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass das Hauptprosswachstum von Rosenstecklingen in allen hier beschriebenen Experimenten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den jeweiligen Expositionsszenarien und über einen Zeitraum von bis zu 40 Tagen nach Exposition zeigte. Demnach konnte in unseren Untersuchungen durch eine Exposition mit HF-EMF (900 MHz; 5 V/m) im Vergleich zu einer Scheinexposition (900 MHz; 0 V/m) kein Einfluss auf das Hauptprosswachstum von Rosenstecklingen nachgewiesen werden. Dies wurde auch in Grémiaux *et al.*, 2016 geschlussfolgert. Somit konnten diese Ergebnisse repliziert werden.

### 5.2.7. Phänotypisierung und Auswertung des Seitenspross-Wachstums

Das Seitensprosswachstum wurde für jede Blattachse individuell ermittelt, sobald ein Seitensprosswachstum zu beobachten war. Dazu wurden in Rosenexperiment 2 ab 28 DAE und bis 72 DAE immer montags, mittwochs, und freitags die Seitensprosslängen der jeweiligen Blattachsen mit einem Lineal (auf 0,1 cm genau) gemessen. Zur Phänotypisierung wurden die Blattachsen von unten nach oben durchnummeriert.

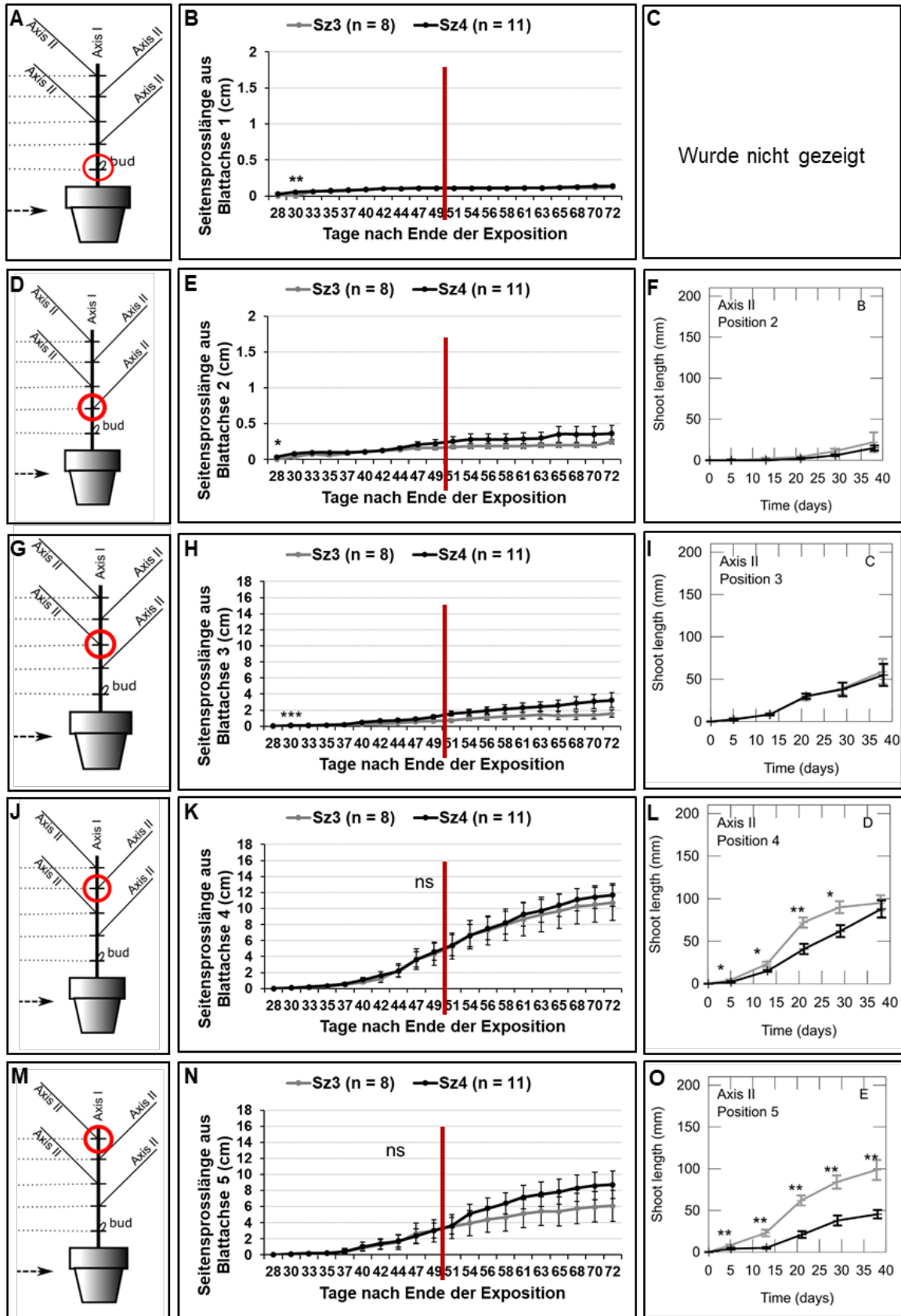
Nachdem die Phänotypisierung des Hauptsprosses abgeschlossen war (40 DAE), wurde zusätzlich die Anzahl der Blattachsen bestimmt (Abb. 5.4D). Auch bei diesem Merkmal konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Expositionsszenarien beobachtet werden. Es zeigte sich, dass meist mehr als fünf Blattachsen pro Hauptspross entstehen. Während der Phänotypisierung wurden die Seitensprosslängen aller Blattachsen gemessen. Zur Auswertung der Seitensprosslängen wurden dann, wie in Grémiaux *et al.* (2016), pro Steckling nur die ersten 5 Blattachsen von oben (von der Blüte gezählt) analysiert (Abb. 5.6). Stecklinge, die weniger als 5 Blattachsen entwickelt hatten, wurden aus der Analyse der Seitensprosse entfernt.



**Abbildung 5.6:** Graphische Darstellung des Hauptspross- und Seitensprosswachstums von Rosenstecklingen.

Aufgrund des Kriteriums „Weniger als 5 Blattachsen“ wurden im Rosenexperiment 2 ein Rosensteckling des Szenarios 3 und ein Rosensteckling des Szenarios 4 von der Analyse ausgeschlossen, sodass sich bezüglich der Seitensprossanalyse  $n = 8$  für

Szenario 3 und  $n = 11$  für Szenario 4 ergab. Die Ergebnisse des Seitensprosswachstums von Rosenexperiment 2 sind in Abbildung 5.7 dargestellt. Als Vergleich sind auch die zu reproduzierenden Ergebnisse aus Grémiaux *et al.*, 2016 mit abgebildet (sofern verfügbar).



**Abbildung 5.7:** Länge der Seitensprosse aus den Blattachsen 1 – 5 bis 72 Tage nach Ende der Exposition mit HF-EMF (900 MHz; 5 V/m) oder nach Scheinexposition (900 MHz; 0 V/m) (Rosenexperiment 2). Linke Spalte (A, D, G, J, M): Cartoon eines Rosenstecklings, der die Position der entsprechenden Blattachse mit einem roten Kreis hervorhebt (Grémiaux et al., 2016). Mittlere Spalte (B, E, H, K, N): Statistische Auswertung der Seitensprosslängen

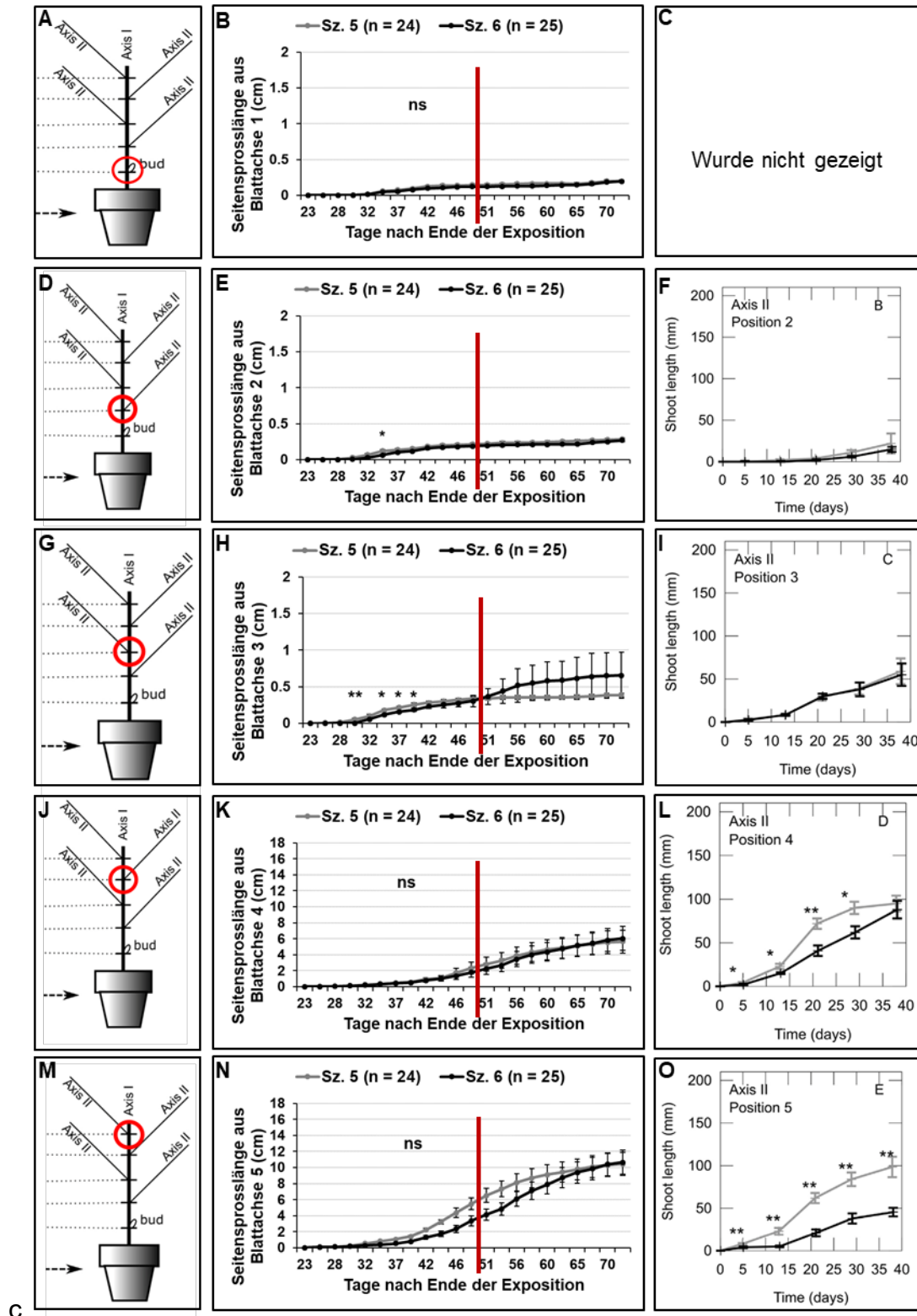
der entsprechenden Blattachse bis 72 Tage nach Ende der Exposition (im vorliegenden Projekt erhobene Daten). Die statistischen Auswertungen in B, E, H, K, N zeigen Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (Individuenzahl = n ist in den jeweiligen Graphen direkt angegeben). Die roten, vertikalen Linien zeigen den Endzeitpunkt der Phänotypisierungen aus Grémiaux et al., 2016 an. Die statistische Signifikanz wurde mittels *Student's t-Test* auf einem Signifikanzniveau  $p < 0,05$  ermittelt. Rechte Spalte (C, F, I, L, O): Ergebnisse der Seitensprosslängen aus den entsprechenden Blattachsen aus Grémiaux et al., 2016. Die statistischen Auswertungen von Grémiaux et al., 2016 zeigen auch Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. Die dort ermittelte statistische Signifikanz wurde auch mittels *Student's t-Test* auf einem Signifikanzniveau  $p < 0,05$  ermittelt. A - C) Blattachse 1. Es sei angemerkt, dass in Grémiaux et al., 2016 keine Ergebnisse für Blattachse 1 gezeigt wurden. D - F) Blattachse 2. G - I) Blattachse 3. J - L) Blattachse 4. M - O) Blattachse 5. ns = statistisch nicht signifikant unterschiedlich, Sz = Szenario. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,005$ .

Vergleichbar zur Analyse des Hauptprosswachstums, zeigte auch die Auswertung der Seitensprosslängen im Rosenexperiment 2 keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den getesteten Expositionsszenarien. Die Ausnahmen bei den Seitensprosslängen an einzelnen Tagen aus Blattachse 1 (30 DAE; Abb. 5.7B), Blattachse 2 (28 DAE; Abb. 5.7E) und Blattachse 3 (30 DAE; Abb. 5.7H) sind zwar statistisch signifikant, wohl aber nicht biologisch signifikant, da in allen Fällen noch kein richtiges Wachstum zu erkennen ist (Seitensprosslänge  $< 0,5$  cm). Unsere Ergebnisse für die Seitensprosslängen aus Blattachse 4 und 5 stehen im Gegensatz zu den veröffentlichten Ergebnissen von Grémiaux *et al.*, 2016, die für das Seitensprosswachstum aus Blattachse 4 und Blattachse 5 statistisch signifikante Unterschiede zwischen der HF-EMF Exposition (900 MHz; 5 V/m) und der Scheinexposition (900 MHz; 0 V/m) festgestellt hatten (Grémiaux et al., 2016).

Die Phänotypisierung der Seitensprosslängen aus Rosenexperiment 3 erfolgte ab 23 DAE immer montags, mittwochs, und freitags, indem die Seitensprosslängen der jeweiligen Blattachsen mit einem Lineal (auf 0,1 cm genau) gemessen wurden (insgesamt bis 72 DAE). Zur Phänotypisierung wurden auch hier die Blattachsen von unten nach oben durchnummeriert und die Längen aller Seitensprosse aus allen Blattachsen dokumentiert.

Nachdem die Phänotypisierung des Hauptprosses abgeschlossen war, wurde zusätzlich die Anzahl der Blattachsen bestimmt (42 DAE; Abb. 5.5D). Auch bei diesem Merkmal konnten erneut keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Expositionsszenarien gemessen werden. Dabei zeigte sich auch erneut, dass meist mehr als fünf Blattachsen pro Hauptpross entstehen. Zur Auswertung der Seitensprosse wurden deswegen wieder pro Steckling nur die ersten fünf Blattachsen von oben (von der Blüte gezählt) analysiert (Abb. 5.6). Stecklinge mit weniger als 5 Blattachsen wurden erneut aus der Analyse entfernt. In beiden Expositionsszenarien, also Szenario 5 und Szenario 6, waren das jeweils vier Stecklinge. Bezüglich der

Seitensprossanalyse ergab sich damit  $n = 24$  für Szenario 5 und  $n = 25$  für Szenario 6. Die Ergebnisse der Seitensprosslängen aus Rosenexperiment 3 sind in Abbildung 5.8 dargestellt.



**Abbildung 5.8:** Länge der Seitensprosse aus den Blattachsen 1 – 5 bis 72 Tage nach Ende der Exposition mit HF-EMF (900 MHz; 5 V/m) oder nach Scheinexposition (900 MHz; 0 V/m) (Rosenexperiment 3). Linke Spalte (A,

D, G, J, M): Cartoon eines Rosenstecklings, der die Position der entsprechenden Blattachse mit einem roten Kreis hervorhebt (Grémiaux et al., 2016). Mittlere Spalte (B, E, H, K, N): Statistische Auswertung der Seitensproslängen der entsprechenden Blattachse bis 72 Tage nach Ende der Exposition (im vorliegenden Projekt erhobene Daten). Die statistischen Auswertungen in B, E, H, K, N zeigen Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (Individuenzahl = n ist in den jeweiligen Graphen direkt angegeben). Die roten, vertikalen Linien zeigen den Endzeitpunkt der Phänotypisierungen aus Grémiaux et al., 2016 an. Die statistische Signifikanz wurde mittels *Student's t*-Test auf einem Signifikanzniveau  $p < 0,05$  ermittelt. Rechte Spalte (C, F, I, L, O): Ergebnisse der Seitensproslängen aus den entsprechenden Blattachsen aus Grémiaux et al., 2016. Die statistischen Auswertungen von Grémiaux et al., 2016 zeigen auch Mittelwerte und Standardfehler. Die dort ermittelte statistische Signifikanz wurde auch mittels *Student's t*-Test auf einem Signifikanzniveau  $p < 0,05$  ermittelt. A - C) Blattachse 1. Es sei angemerkt, dass in Grémiaux et al., 2016 keine Ergebnisse für Blattachse 1 gezeigt wurden. D - F) Blattachse 2. G - I) Blattachse 3. J - L) Blattachse 4. M - O) Blattachse 5. ns = statistisch nicht signifikant unterschiedlich, Sz = Szenario. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,005$ .

In Abbildung 5.8 wird ersichtlich, dass die berichteten Unterschiede des Seitensprosswachstum aus Blattachse 4 und 5 von Grémiaux *et al.*, 2016 auch im Rosenexperiment 3 nicht bestätigt werden konnten. Die signifikanten Unterschiede des Seitensprosswachstums an einzelnen Tagen aus Blattachsen 2 und 3, wo im Prinzip kein wirkliches Wachstum auftritt (Abb. 5.8E und Abb. 5.8H), sind erneut entweder Messfehlern oder auch der biologischen Variabilität zuzuordnen. Ein HF-EMF-Expositionseffekt erscheint nicht plausibel. In diesem Zusammenhang soll darauf hingewiesen werden, dass das Phänotypisieren von kleinen ( $< 0,5$  cm und zudem nicht geraden) Sprosslängen aus einer Blattachse mit einem Lineal (oder auch anderen Messwerkzeugen, wie einer Schublehre, die in der zu replizierenden Studie der Arbeitsgruppe Vian verwendet wurde) sehr schwierig und somit recht fehlerbehaftet ist.

#### 5.2.8. Auflösung der Verblindung

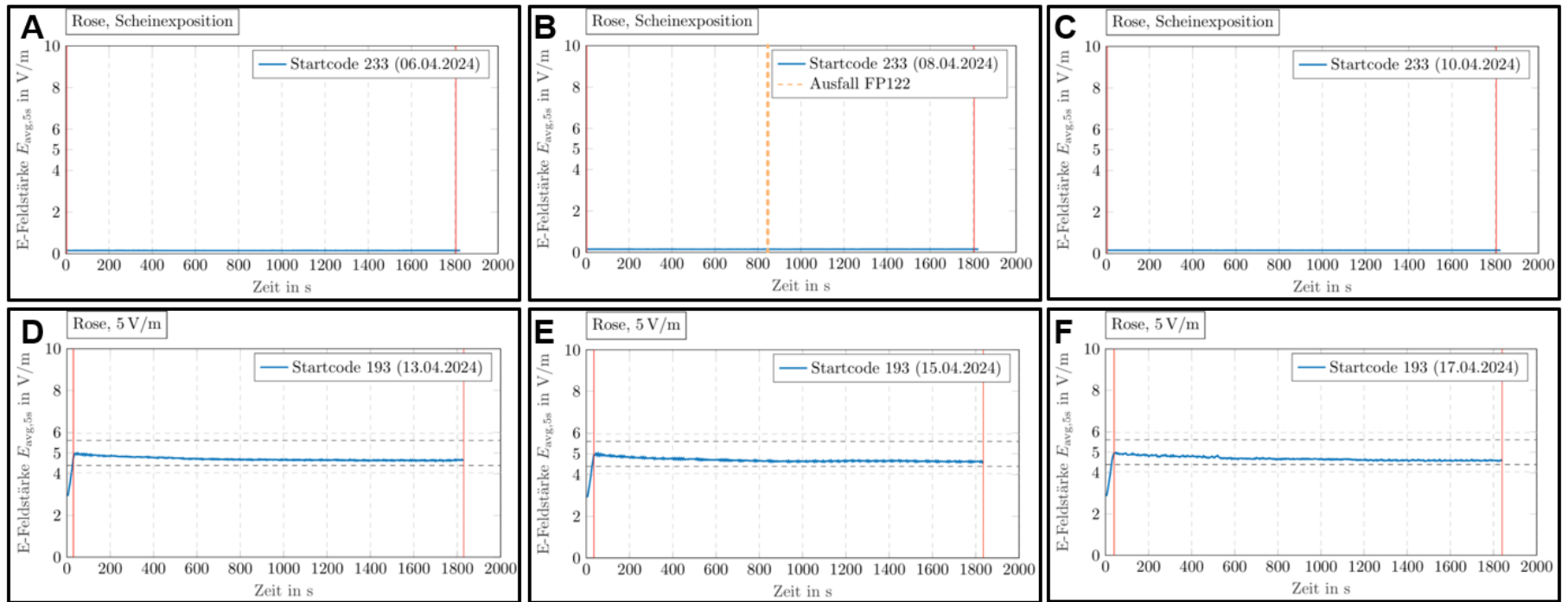
Die Auflösung der Verblindung wurde nach vollständiger Auswertung aller Rosenexperimente an der Technischen Universität Braunschweig durchgeführt, indem die Startcodes den zu testenden Expositionsszenarien zugeordnet wurden (Tabelle 5.3).

**Tabelle 5.3:** Auflösung der Verblindung durch Zuordnung der Startcodes zu den tatsächlichen Expositionen.

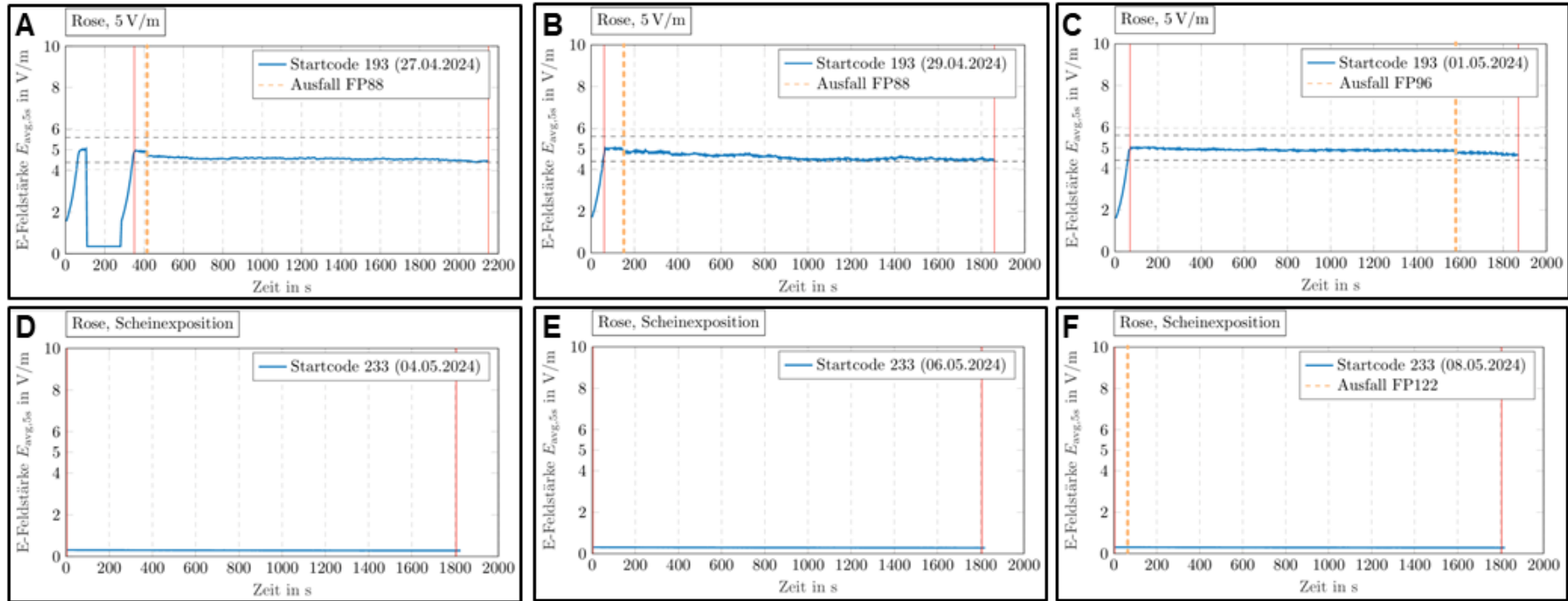
Szenario	Startcode	Exposition
1	233	0 V/m
2	193	5 V/m
3	193	5 V/m
4	233	0 V/m
5	173	5 V/m
6	567	0 V/m

Die Plots der zeitlichen Verläufe der Expositionsfeldstärken wurden aus den mit allen acht Feldsonden aufgenommenen Rohdaten erstellt (Abb. 5.9 – 5.11). Die

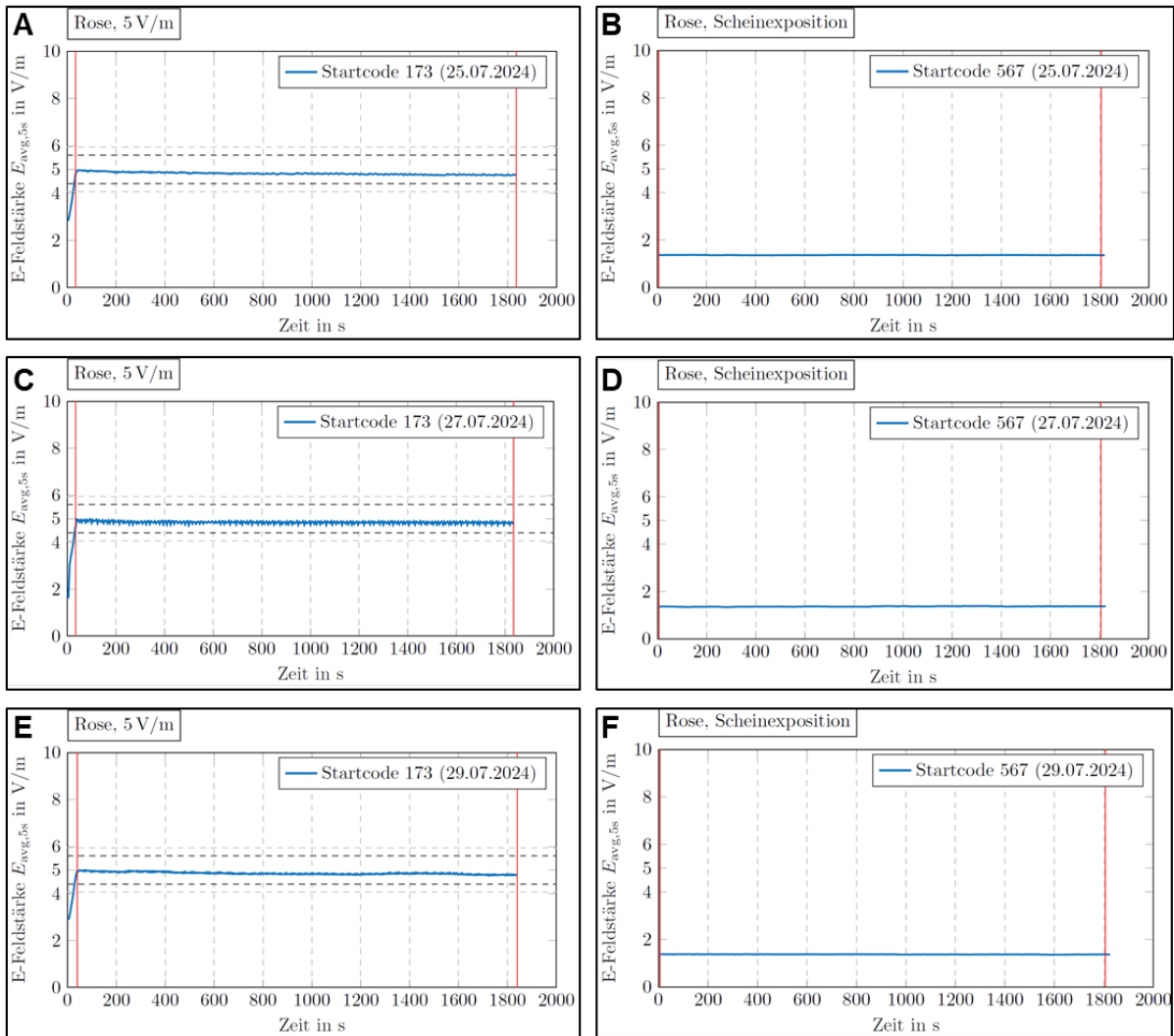
Aufzeichnung erfolgte mit einer Abtastrate von 100 Messergebnissen oder *Samples* pro sek (S/s). Für jeden Feldsensor ist zunächst für jeden Zeitpunkt der Absolutbetrag aus den Beiträgen der drei einzelnen Feldstärkewerte je kartesischer Raumdimension gebildet worden. Dargestellt ist die statistische Feldstärke, gebildet als arithmetisches Mittel über einen Betrachtungszeitraum von 5 sek je Datenpunkt, sowie über alle acht Feldsonden.



**Abbildung 5.9:** Plots der zeitlichen Verläufe der Expositionsfeldstärke für die einzelnen Versuchstage von Rosenexperiment 1 (Zeitraum 06.04.2024 bis 17.04.2024: Szenario 1 = Startcode 233 und Szenario 2 = Startcode 193). In A), B), und C) Scheinexposition (900 MHz, 0 V/m). In D), E), und F) HF-EMF-Exposition (900 MHz, 5 V/m).



**Abbildung 5.10:** Plots der zeitlichen Verläufe der Expositionsfeldstärke für die einzelnen Versuchstage von Rosenexperiment 2 (Zeitraum 27.04.2024 bis 08.05.2024: Szenario 3 = Startcode 193 und Szenario 4 = Startcode 233). In A), B), und C) HF-EMF-Exposition (900 MHz, 5 V/m). In D), E), und F) Scheinexposition (900 MHz, 0 V/m).



**Abbildung 5.11:** Plots der zeitlichen Verläufe der Expositionsfeldstärke für die einzelnen Versuchstage von Rosenexperiment 3 (Zeitraum 25.07.2024 bis 29.07.2024: Szenario 5 = Startcode 173 und Szenario 6 = Startcode 567). In A), C), und E) HF-EMF Exposition (900 MHz, 5 V/m). In B), D), und F) Scheinexposition (900 MHz, 0 V/m).

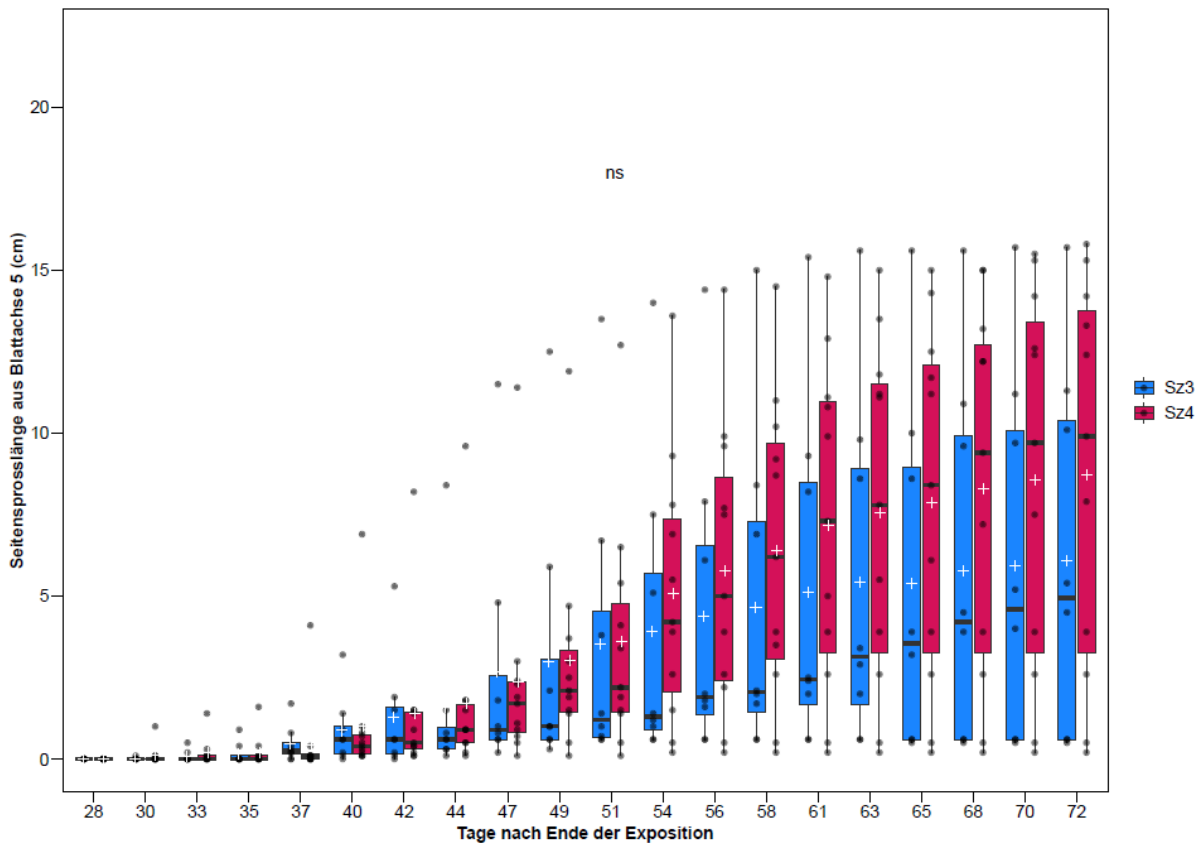
Aus den Abbildungen 5.9 – 5.11 wird ersichtlich, dass die angestrebte Feldstärke für alle Expositionen innerhalb des Toleranzniveaus geblieben ist und somit die Versuchspflanzen über den gesamten Zeitraum von 30 Minuten einem gleichmäßigen und statistisch isotropen Feld mit der angestrebten Feldstärke ausgesetzt waren. Der abgebrochene Einregelungsvorgang am ersten Expositionstag von Rosenexperiment 2 (Abb. 5.10A; Startcode 193 (27.04.2024)) lässt sich durch einen Bedienerfehler begründen. Es wurde zuerst ein falscher Startcode eingegeben, dies ist aber noch vor der kompletten Einregelung aufgefallen und wurde abgebrochen, sodass eine Beeinflussung der Ergebnisse hierdurch als äußerst unwahrscheinlich anzusehen ist. Ähnlich zu den berichteten Tomatenexperimenten (siehe Arbeitspaket 3) kam es auch bei den Rosenexperimenten 1 und 2 zu einigen Feldsondenausfällen (Abb. 5.9B, Abb.

5.10A - C, 5.10F). In Rosenexperiment 3, bei den Wiederholungsversuchen von AP3, sowie im gesamten Arbeitspaket 4 kam ein neueres Feldsondensystem zum Einsatz, mit dem es zu keinen Ausfällen einzelner Feldsonden mehr kam.

### 5.3. Zusammenfassung

Es fiel auf, dass es gerade bei den Seitensprosslängen aus Blattachse 5 wiederholt zu leichten (nicht signifikanten) Wachstumsunterschieden zwischen den verschiedenen Expositionsszenarien kam (Abb. 5.7N und Abb. 5.8N). Nach der Entblindung zeigte sich allerdings, dass das tendenziell geringere Wachstum einmal in der HF-EMF-Exposition (Rosenexperiment 2) und einmal in der Scheinexposition auftrat (Rosenexperiment 3). Die beobachteten Schwankungen lassen sich deswegen eher auf Wachstumsunterschiede der einzelnen Rosenstecklinge zurückführen und wohl nicht auf Expositionseffekte. Nach unseren Erfahrungen (sowie nach Erfahrungen der Rosenzüchter Meilland International SA und Rosenhof Odendahl, der Gärtnerei Blumen und Pflanzen GbR, Baumeister, und der Landwirtschaftskammer Nordrhein-Westfalen) ist das Wachstum einzelner Rosenstecklinge äußerst variabel, sodass sich das Wachstum einzelner Stecklinge eigentlich nicht vergleichen lässt. Diese Variabilität zwischen den einzelnen Stecklingen zeigt sich auch an den relativ großen Standardfehlern und wird noch deutlicher mit einer *Boxplot*-Darstellung (Abb. 5.12).

C



**Abbildung 5.12:** Seitensprosslänge aus Blattachse 5 (Rosenexperiment 2), wie auch in Abb. 5.7N dargestellt. Dargestellt sind hier für jedes Expositionsszenario *Boxplots* über die einzelnen Tage nach Ende der Exposition, um die Verteilungen der Einzeldaten abzubilden. Die grauen Punkte zeigen die Einzelmessungen der Stecklinge, die Boxplots geben das untere Quartil (25 %-Perzentil) und das obere Quartil (75 %-Perzentil) an. Die Box wird durch die oberen und unteren Antennen (*Whisker*) verlängert, welche die Werte außerhalb der Box darstellen. Die Länge der oberen Antenne entspricht dem Abstand des oberen Quartils bis zum größten Wert, bzw. maximal 1,5-mal der Interquartilsabstand. Die Länge der unteren Antenne entspricht dem Abstand des unteren Quartils bis zum kleinsten Wert, bzw. maximal 1,5-mal der Interquartilsabstand. Die weißen Kreuze innerhalb der Boxen repräsentieren die Mittelwerte und die schwarzen Linien innerhalb der Boxen die Mediane. ns = statistisch nicht signifikant unterschiedlich, Sz = Szenario.

Diese hohe Variabilität lässt Rosenstecklinge für derartige Versuche eher als ungeeignet einstufen.

Es erschien zusätzlich auffällig, dass die in Grémiaux et al., 2016 angegebenen Entwicklungsstadien der Rosenstecklinge in unseren Händen nicht reproduziert werden konnten und sogar deutlich abwichen. Laut Grémiaux et al., 2016 wurden 4 - 5 Wochen alte Stecklinge verwendet, die zwar bewurzelt waren, aber noch kein Hauptsprosswachstum zeigten. In unseren Händen war bereits nach 14 Tagen bei einer signifikanten Zahl an Rosenstecklingen ein Hauptsprosswachstum zu beobachten. Wenn man davon ausgeht, dass es ab ca. 9 Tagen zu einer Bewurzelung kommt, liegen zwischen Bewurzelung und Hauptsprosswachstum unter den

angegebenen Wachstumsbedingungen ca. vier bis fünf Tage. Da die Expositionsphase allein fünf Tage dauert, erscheint das in Grémiaux et al., 2016 angegebene Entwicklungsstadium der Rosenstecklinge fraglich. Die von uns verwendete Rosensorte war, wie in Grémiaux et al., 2016, *Rosa hybrida* Knockout® Radrazz und die Aufzucht erfolgte unter hoher Luftfeuchtigkeit bei vergleichbaren Umweltbedingungen und war somit zumindest sehr ähnlich. Somit erscheint es eher unwahrscheinlich, dass die Unterschiede der Stecklings-Entwicklung auf die Biologie der Rosensorte oder die Aufzuchtbedingungen zurückzuführen sind.

## Allgemeine Diskussion

Im vorliegenden Forschungsvorhaben sollten mehrere Studien der Arbeitsgruppe Vian verifiziert und analysiert werden. Im Speziellen wurde in diesen Studien eine erhöhte Expression bestimmter Botenstoffe, sowie Veränderungen im Energiemetabolismus und in der Genexpression von *PROTEINASE INHIBITOR II (PI)* und *BASIC LEUCINE ZIPPER1 (bZIP)* in Tomaten nach HF-EMF-Exposition gefunden, die als Stressreaktion gewertet werden können. Diese Reaktionen schienen durch das Phytohormon Abszinsäure (ABA) und durch Kalzium vermittelt zu sein. Die Reaktionen sind zudem systemisch, was bedeutet, dass die gesamte Pflanze reagiert, auch wenn zum Beispiel nur ein Blatt exponiert wurde. Um längerfristige Wirkungen zu beobachten hat dieselbe Arbeitsgruppe Rosen untersucht. Bereits bestehende Triebe wurden durch HF-EMF nicht beeinflusst. Eine Exposition von sich entwickelnden Knospen führte allerdings zu einer Wachstumsreduktion.

### I. Konzeptionierung einer Modenverwirbelungskammer innerhalb einer Pflanzenanzuchtkammer

In diesem Forschungsvorhaben wurde eine mobile Modenverwirbelungskammer in einer begehbaren Pflanzenwachstumschamber konzipiert und realisiert, die für kontrollierte und verblindete HF-EMF-Expositionen von Pflanzen bei einer Betriebsfrequenz von 900 MHz verwendet werden kann. In seiner bisher beispiellosen Form erzeugt die Modenverwirbelungskammer statistisch gleichmäßige (d.h. Feldhomogenität und Isotropie) und stabile elektrische Felder im Bereich von 0 V/m bis zu 40 V/m. Höhere elektrische Feldstärken sind in der entwickelten Modenverwirbelungskammer theoretisch möglich und hängen hauptsächlich von der Eingangsleistung ab. Höhere elektrische Feldstärken müssten jedoch empirisch getestet werden. Das hier implementierte Konzept ermöglicht eine Echtzeitüberwachung der elektrischen Feldstärke über die gesamte Expositionszeit innerhalb eines definierten Arbeitsvolumens, in dem die Pflanzen platziert werden. Während Echtzeitmessungen der elektrischen Feldstärke in EMV-Prüfaufbauten zu finden sind (Mandaris et al., 2018), sind bisher keine Pflanzenstudien bekannt, die ein ähnliches, hochauflösendes Echtzeit-Überwachungssystem für elektrische Felder verwendet haben.

Die Echtzeitüberwachung der statistischen momentanen Feldstärke wurde mit einem Feldsondensystem realisiert, das aus acht einzelnen dreiachsigen lasergespeisten Feldsensoren besteht. Durch die permanente Echtzeitüberwachung der Feldstärke während der HF-EMF-Exposition von Pflanzen kann die Feldqualität für jedes durchgeführte Experiment anhand der aufgezeichneten Felddaten explizit validiert werden. Für die beschriebenen HF-EMF-Expositionen von Pflanzen wurde die Feldgleichmäßigkeit als Hauptindikator für die Validierung der Feldqualität verwendet. Zusätzlich sind andere Methoden zur Bewertung der Feldqualität mit den aufgezeichneten elektrischen Feldstärkedaten möglich. Beispiele hierfür wäre die Autokorrelationsfunktion (Serra et al., 2017) und statistische *Goodness-of-fit* Tests (Lemoine et al., 2007). Somit ist eine explizite Überprüfung der Feldeigenschaften für jedes durchgeführte Expositionsexperiment gemäß allen Prinzipien der Modenverwirbelungskammer-Theorie möglich. Die Möglichkeit, die Feldstärke kontinuierlich zu überwachen und die Feldqualität in jedem einzelnen Experiment zu überprüfen, gewährleistet die Kontrolle, sowie datengestützte Kenntnisse über gleichmäßige Feldverteilungen während der tatsächlichen Exposition der Pflanzen.

Eine Besonderheit der vorgestellten Echtzeit-Feldstärkenüberwachung ist die Implementierung einer vollautomatischen *Closed-Loop*-Regelung. Bislang ist sie nur in der ISO-Norm für die Störfestigkeitsprüfung von Fahrzeugen (ISO 11452-5, 2023) enthalten. Durch eine solche Regelung kann auf eine Beladungs-Kalibrierung der Modenverwirbelungskammer verzichtet werden. In biologischen Aufbauten, in denen die Verfügbarkeit von Proben begrenzt ist, ist der Verzicht auf den Kalibrierungsprozess ein großer Vorteil.

Die Implementierung der Modenverwirbelungskammer innerhalb einer Pflanzenanzuchtkammer liefert mehrere Vorteile: Erstens kann eine große Probenanzahl realisiert werden, sodass biologische und technische Replikate einbezogen werden können. Die hier realisierte Modenverwirbelungskammer wurde für die Aufnahme von bis zu 48 Pflanztopfen (7 cm × 7 cm × 10 cm) innerhalb des Arbeitsvolumens konzipiert. Arbeitsvolumina, die fast so groß sind wie die tatsächliche Modenverwirbelungskammer, sind möglich, solange sie ausreichend weit von allen Begrenzungen entfernt sind (Hill, 1998a). Zweitens wurde das elektrische Feld innerhalb der Modenverwirbelungskammer erzeugt, wo sich auch die Pflanzen befinden. Daher wird das elektrische Feld nicht durch Material abgeschwächt, das um

die Pflanzen herum platziert ist, was in den Studien der Arbeitsgruppe Vian zutraf, da dort ein Pflanzenanzuchtschrank aus Holz in eine Modenverwirbelungskammer gestellt wurde (Roux et al., 2006; Vian et al., 2006; Beaubois et al., 2007; Roux et al., 2008b; Grémiaux et al., 2016). Drittens ermöglichte die Installation der Modenverwirbelungskammer innerhalb einer Pflanzenanzuchtkammer die Aufrechterhaltung einheitlicher Wachstumsbedingungen für die Pflanzen. Dies wurde durch die Auswahl eines Stahlmaterials mit einer Maschenweite von 0,077 mm erreicht, das eine wirksame Abschirmung von HF-EMF bei 900 MHz ermöglichte und gleichzeitig ausreichend Licht durchlässt. Das geringe Gewicht des gewählten Stahlmaterials erleichterte zusätzlich die Änderung der Randbedingungen der Modenverwirbelungskammer, indem deren Wände einfach mechanisch bewegt wurden. Aufgrund seiner Maschenweite war das ausgewählte Material für die vorgesehene Frequenz von 900 MHz geeignet. Für andere Frequenzanforderungen müssten möglicherweise andere Materialien ausgewählt werden.

## **II. Auswirkungen von HF-EMF auf das Transkriptom von Tomaten und das Wachstum von Rosen**

Mittels globaler Transkriptomanalysen zeigten unsere Studien wiederholt, dass das Transkriptom von Tomatenpflanzen stärker auf die Feldstärke 5 V/m als auf die 40 V/m Feldstärke reagiert. Im Speziellen hatte die höhere Feldstärke (40 V/m) nur geringe Auswirkungen auf das Transkriptom von Tomatenpflanzen. Eine ähnliche Schlussfolgerung wurde mittels einer *Microarray*-Analyse mit *Arabidopsis* Suspensionskulturen gezogen, die 24 Stunden mit 1,9 GHz exponiert wurden (Engelmann et al., 2008). Diese Studie detektierte nur 10 Gene, die auf diese Exposition mit einer schwachen, aber signifikanten differenziellen Genexpression reagierten. Interessant erscheint, dass diese Gene keine Verbindung zu Stressreaktionen zeigen, sondern zu Genen, die auf sich ändernde Lichtverhältnisse reagieren, weswegen die Autoren schlussfolgerten, dass HF-EMF, die auch in der UMTS-Kommunikation verwendet werden, von der Pflanze als Bestrahlung wahrgenommen werden, aber nicht als Stresssignal. Die Gene, die in unseren Experimenten bei 40 V/m differenziell reguliert waren, fielen unter Kategorien wie Transmembran-Transport oder Zellzyklus, sodass sich hieraus weder eine Verbindung zu einer Stressantwort noch auf sich ändernde Lichtbedingungen ergibt.

Im Gegensatz dazu führte die Exposition mit 5 V/m in unseren Versuchen zu differenziellen Genexpressionen von mehreren Tausend Genen, was zum Einen im Gegensatz zur Studie an Arabidopsis Zellkulturen steht (Engelmann et al., 2008), aber auch zu Schlussfolgerungen der Arbeitsgruppe Vian, die durch gezielte Analysen unter anderem mit den Genen *PI* und *bZIP* schlussfolgerten, dass die molekulare Antwort auf HF-EMF eine *All-or-nothing-response* ist, da die beobachteten Effekte sowohl bei 5 V/m als auch bei 40 V/m auftraten (Roux et al., 2006). Unsere Studien zeigen eher, dass das Transkriptom von Tomaten differentiell auf unterschiedliche Feldstärken reagiert, was auf einen Fenster-Effekt hindeuten könnte. Dieser wurde bereits im Bereich von elektromagnetischen Feldern diskutiert und besagt, dass biologische Effekte nur in einem gewissen „Expositionsfenster“ auftreten (Markov, 2011). Solche Fenstereffekte zeigen sich zusätzlich beispielsweise bei Trockenstress-Versuchen in der frühen Gersten-Wurzel (Klaus et al., 2024). Die Gene, die bei 5 V/m als differenziell exprimiert detektiert wurden, gruppierten in Prozesse, die auch von der Arbeitsgruppe Vian berichtet wurden. Hierunter fallen beispielsweise „ATP-abhängige Prozesse“, „oxidativer Stress“, und „Kalzium-Homöostase“ und könnten somit in der Tat mit einer Stressantwort assoziiert werden. Zusätzlich gruppierten die von uns detektierten Gene bei 5 V/m in den Prozess „Antwort auf Licht“ bzw. „Antwort auf Strahlung“, was die Ergebnisse der Arabidopsis-Suspensionskultur-Studie unterstützt (Engelmann et al., 2008). Zusätzlich wurden HF-EMF-Reaktionen auch von der Arbeitsgruppe Vian mit variierenden Lichtbedingungen assoziiert und es wurde geschlussfolgert, dass Licht ein ausschlaggebender Parameter ist, der die pflanzliche Antwort auf einen HF-EMF Stimulus reguliert (Roux et al., 2005; Faure et al., 2007).

Unsere Studien stützen somit eher die generellen Schlussfolgerungen der Arbeitsgruppe Vian, nämlich dass molekulare Effekte von HF-EMF mit der Feldstärke 5 V/m bei Tomaten ähnlich einer Stressantwort sind. Allerdings konnten wir weder die gezielten Analysen mit den Genen *bZIP* und *PI*, inklusive möglicher systemischer Reaktionen und die Beteiligung von ABA und Kalzium, noch die Änderungen des ATP-Gehalts nach HF-EMF-Exposition replizieren. Gerade im Bezug auf die Versuche zu systemischen Reaktionen muss angemerkt werden, dass sowohl in unserer Studie als auch in den Vian-Studien unterschiedliche Pflanzen nie einer statistisch homogenen HF-EMF-Exposition ausgesetzt waren, aufgrund der Nähe zu den metallischen

Wänden innerhalb der Modenverwirbelungskammer. Der experimentelle Aufbau ist zur Untersuchung systemischer Reaktionen somit nicht geeignet. Dazu kommt, dass die Interpretation von Chemikalienbehandlungen häufig schwierig ist. Das ist zum einen darin begründet, dass bei Eingießen oder Besprühen nicht gewährleistet werden kann, dass jede Pflanze dieselbe Menge der Chemikalie aufnimmt. Zum anderen sind die Kontrollbehandlungen Verdünnungen der entsprechenden Lösungsmittel für die entsprechenden Chemikalien, wie bspw. Ethanol bei dem verwendeten Naproxen. Die Lösungsmittel können sich zusätzlich auf den pflanzlichen Metabolismus auswirken oder gar mit dem applizierten Stress interagieren. Folglich müsste eine hohe Variabilität in den Daten zu sehen sein, was bei uns auch der Fall war, sodass gezielte Schlussfolgerungen auf mögliche Effekte einer HF-EMF-Exposition unmöglich sind.

Abweichend zu den Vian-Studien, in denen die Tomatensorte *Lycopersicon esculentum* cv. VFN-8 verwendet wurde, wurde in unseren Versuchen die Tomatensorte *Solanum lycopersicum* Sweet-100 (Alonge et al., 2022) verwendet. Da wir weder mittels Transkriptomanalysen noch durch RT-qPCR replizieren konnten, dass sich die Expression der Gene *bZIP* und *PI* nach HF-EMF-Exposition ändert, könnte es sein, dass diese Gene nur in bestimmten Tomatensorten auf eine solche Behandlung reagieren, sodass diese Gene vermutlich keinen generellen funktionellen Mechanismus nach HF-EMF bedingen. Unter Berücksichtigung, dass die umgebenden Lichtverhältnisse ein ausschlaggebender Faktor für mögliche HF-EMF-Effekte auf molekularer Ebene darzustellen scheinen, könnten sich die Unterschiede in unserer Studie und den zu replizierenden Studien auch darin begründen, dass möglicherweise unterschiedliche Lichtverhältnisse vorherrschten. Zwar wurden in unserer Studie ähnliche Lichtmengen ( $\mu\text{mol} / \text{m}^2\text{s}$ ) verwendet, allerdings wurde in den zu replizierenden Studien keine Angaben zum verwendeten Lichtspektrum gemacht. Da sowohl die optimale Lichtintensität als auch das optimale Lichtspektrum Pflanzenspezifisch ist, sollten mögliche HF-EMF-Effekte nicht nur Pflanzen-spezifisch, sondern auch Licht-spezifisch dokumentiert und untersucht werden.

Zusätzlich konnte in den hier beschriebenen Versuchen wiederholt keine Veränderung des Sprosswachstums von Rosenstecklingen beobachtet werden. Dies traf sowohl auf das Hauptsprosswachstum über einen Zeitraum bis 40 Tage nach HF-EMF-Exposition, als auch auf das Seitensprosswachstum aus unterschiedlichen

Blattachsen über einen Zeitraum bis 72 Tage nach HF-EMF-Exposition zu. Somit konnten wir die berichteten Ergebnisse der Arbeitsgruppe Vian für das Hauptsprosswachstum, aber nicht für das Seitensprosswachstum replizieren (Grémiaux et al., 2016). Unsere Ergebnisse in Kombination mit den Ergebnissen von Grémiaux et al., 2016, deuten somit darauf hin, dass eine kurzfristige HF-EMF-Exposition (900 MHz, 5 V/m, 3 × 30 min), keine reproduzierbaren Auswirkungen auf das Sprosswachstum von Rosenstecklingen (*Rosa hybrida* Knock Out® Radrazz) hat. Da das Wachstum der Seitentriebe einzelner Rosenstecklinge zwischen den getesteten Individuen und über die Experimente hinweg große Unterschiede aufwies, deuten unsere Daten darauf hin, dass mögliche Auswirkungen der Exposition (falls vorhanden) geringer sind als die bei einzelnen Rosenstecklingen beobachteten biologischen Schwankungen. Über die Mechanismen, die dieser Variabilität zugrunde liegen, kann nur spekuliert werden, aber sie könnten mit Faktoren zusammenhängen, die in Experimenten mit Rosenstecklingen schwer zu standardisieren sind. Darunter fallen beispielsweise das Entwicklungsalter der Mutterpflanze, die für die Rosenstecklinge verwendet wird, die Position entlang der Mutterpflanze, an der der Steckling geschnitten wird, oder sogar der Stecklingsprozess selbst, der möglicherweise einen mehr oder weniger starken mechanischen Stress durch das Schneiden auslösen könnte.

## Referenzen

- Akbal, A., Kiran, Y., Sahin, A., Turgut-balik, D., and Balik, H. H.** (2012). Effects of electromagnetic waves emitted by mobile phones on germination, root growth, and root tip cell mitotic division of *Lens culinaris* Medik. *Polish J. Environ. Stud.* **21**:23–29.
- Akter, S., Khan, M. S., Smith, E. N., and Flashman, E.** (2021). Measuring ROS and redox markers in plant cells. *RSC Chem. Biol.* **2**:1384–1401.
- Al-Kathiri, F., Al-Raisi, K., Al-Hinai, K., Al-Droushi, M., Khan, M., and Nadir, Z.** (2016). Impact of RF electromagnetic field on cucumber and tomato plants. In *7th IEEE Annual Information Technology, Electronics and Mobile Communication Conference, IEEE IEMCON 2016*, pp. 1–6. IEEE.
- Alattar, E., and Radwan, E.** (2020). Investigation of the effects of radio frequency water treatment on some characteristics of growth in pepper (*Capsicum annuum*) plants. *Adv. Biosci. Biotechnol.* **11**:22–48.
- Alattar, E. M., Elwasife, K. Y., Radwan, E. S., and Elrifi, Y. A.** (2017). Response of corn (*Zea mays*), Basil (*Ocimum basilicum*) and eggplant (*Solanum melongena*) seedlings to Wi-Fi radiation. *Rom. J. Biophys.* **27**:137–150.
- Albaqami, M., Hammad, M., Pooam, M., Procopio, M., Sameti, M., Ritz, T., Ahmad, M., and Martino, C. F.** (2020). *Arabidopsis* cryptochrome is responsive to radiofrequency (RF) electromagnetic fields. *Sci. Rep.* **10**:1–8.
- Alonge, M., Lebeigle, L., Kirsche, M., Jenike, K., Ou, S., Aganezov, S., Wang, X., Lippman, Z. B., Schatz, M. C., and Soyk, S.** (2022). Automated assembly scaffolding using RagTag elevates a new tomato system for high-throughput genome editing. *Genome Biol.* **23**:1–19.
- Amralah, N.** (2021). Shielding effectiveness of metal mesh and radio frequency shielding film for optical applications. In *2021 Antenna Measurement Techniques Association Symposium (AMTA)*, pp. 1–5.
- Andrieu, G.** (2021). On the possible benefits of inserting metallic diffractors to improve low frequency performance of reverberation chambers. *IEEE Trans. Electromagn. Compat.* **63**:304–307.

- Andrieu, G., Meddeb, N., Jullien, C., and Ticaud, N.** (2020). Complete framework for frequency and time-domain performance assessment of vibrating intrinsic reverberation chambers. *IEEE Trans. Electromagn. Compat.* **62**:1911–1920.
- Bag, U., Narasimhan, S., and Bindu, S.** (2022). Effect of flame treatment and radiofrequency electromagnetic radiations on phenolic content in *in vitro* cultures of *Ipomoea batatas* (L.) Lam. *Plant Sci. Today* **9**:372–375.
- Balodis, V., Brumelis, G., Kalviškis, K., Nikodemus, O., Tjarve, D., and Znotiņa, V.** (1996). Does the Skrunđa Radio Location Station diminish the radial growth of pine trees? *Sci. Total Environ.* **180**:57–64.
- Beaubois, É., Girard, S., Lallechere, S., Davies, E., Paladian, F., Bonnet, P., Ledoigt, G., and Vian, A.** (2007). Intercellular communication in plants: Evidence for two rapidly transmitted systemic signals generated in response to electromagnetic field stimulation in tomato. *Plant, Cell Environ.* **30**:834–844.
- Bigu-Del-Blanco, J., Bristow, J. M., and Romero-Sierra, C.** (1977). Effects of low-level microwave radiation on germination and growth rate in corn seeds. *Proc. IEEE* **65**:1086–1088.
- Billah, M., Aktar, S., Sikder, R. K., Ahammed, G. J., Hu, W., Li, F., and Yang, Z.** (2024). Exploring regulatory roles of plant thylakoid-bound proteins involved in abiotic stress responses. *J. Plant Growth Regul.* **43**:1570–1591.
- Bowles, D.** (1998). Signal transduction in the wound response of tomato plants. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **353**:1495–1510.
- Bureau, C., Lanau, N., Ingouff, M., Hassan, B., Meunier, A. C., Divol, F., Sevilla, R., Mieulet, D., Dievart, A., and Périn, C.** (2018). A protocol combining multiphoton microscopy and propidium iodide for deep 3D root meristem imaging in rice: Application for the screening and identification of tissue-specific enhancer trap lines. *Plant Methods* **14**:1–9.
- Bürstenbinder, K., Waduwara, I., Schoor, S., Moffatt, B. A., Wirtz, M., Minocha, S. C., Oppermann, Y., Bouchereau, A., Hell, R., and Sauter, M.** (2010). Inhibition of 5'-methylthioadenosine metabolism in the Yang cycle alters polyamine levels, and impairs seedling growth and reproduction in *Arabidopsis*.

*Plant J.* **62**:977–988.

**Casey, K. F.** (1988). Electromagnetic shielding behavior of wire-mesh screens. *IEEE Trans. Electromagn. Compat.* **30**:298–306.

**Cheeseman, J. M.** (2007). Hydrogen peroxide and plant stress : A challenging relationship. *Plant Stress* **1**:4–15.

**Chen, H. Y., and Chen, C.** (2014). Effects of mobile phone radiation on germination and early growth of different bean species. *Polish J. Environ. Stud.* **23**:1949–1958.

**Chen, Y. P., Jia, J. F., and Wang, Y. J.** (2009). Weak microwave can enhance tolerance of wheat seedlings to salt stress. *J. Plant Growth Regul.* **28**:381–385.

**Clark, S., Yu, F., Gu, L., and Min, X. J.** (2019). Expanding alternative splicing identification by integrating multiple sources of transcription data in tomato. *Front. Plant Sci.* **10**:1–12.

**Cock, P. J. A., Fields, C. J., Goto, N., Heuer, M. L., and Rice, P. M.** (2009). The Sanger FASTQ file format for sequences with quality scores, and the Solexa/Illumina FASTQ variants. *Nucleic Acids Res.* **38**:1767–1771.

**Conway, J. R., Lex, A., and Gehlenborg, N.** (2017). UpSetR: An R package for the visualization of intersecting sets and their properties. *Bioinformatics* **33**:2938–2940.

**Czerwiński, M., Vian, A., Woodcock, B. A., Goliński, P., Recuero Virto, L., and Januszkiewicz, Ł.** (2023). Do electromagnetic fields used in telecommunications affect wild plant species? A control impact study conducted in the field. *Ecol. Indic.* **150**:110267.

**Davletova, S., Schlauch, K., Coutu, J., and Mittler, R.** (2005). The zinc-finger protein Zat12 plays a central role in reactive oxygen and abiotic stress signaling in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **139**:847–856.

**de Menidburu, F., and Yaseen, M.** (2020). *agricolae: Statistical procedures for agricultural research. R package version 1.4.0.*  
<https://myaseen208.github.io/agricolae/https://cra>.

- Di Ferdinando, M., Brunetti, C., Fini, A., and Tattini, M.** (2012). Flavonoids as antioxidants in plants under abiotic stresses. In *Abiotic stress responses in plants: metabolism, productivity and sustainability* (ed. Ahmad, P.) and Prasad, M.), pp. 171–180. New York, NY: Springer New York.
- Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., and Gingeras, T. R.** (2013). STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **29**:15–21.
- Dorstener Drahtwerke** (2023). *Datenblatt MeshArt Soft Silver*.
- Dragolova, D., Dimitrova, M., and Kouzmanova, M.** (2009). Does 900 MHz electromagnetic field induce oxidative stress in wheat plants? In *Proceeding of the 2nd International Symposium —NEW RESEARCH IN BIOTECHNOLOGY*, pp. 317–329. Bucharest, Romania.
- Dwivedi, S. L., Quiroz, L. F., Spillane, C., Wu, R., Mattoo, A. K., and Ortiz, R.** (2024). Unlocking allelic variation in circadian clock genes to develop environmentally robust and productive crops. *Planta* **259**:1–20.
- Ellingsrud, S., and Johnsson, A.** (1993). Perturbations of plant leaflet rhythms caused by electromagnetic radio-frequency radiation. *Bioelectromagnetics* **14**:257–271.
- Engelmann, J. C., Deeken, R., Müller, T., Nimtz, G., Roelfsema, M. R. G., and Hedrich, R.** (2008). Is gene activity in plant cells affected by UMTS-irradiation? A whole genome approach. *Adv. Appl. Bioinforma. Chem.* **1**:71–83.
- Eulig, N.** (2004). *Eignung der Feldvariablen-Kammer (FVK) für EMV-Störfestigkeitstests (Berichte aus der Elektrotechnik)*. ISBN: 9783832229450, Shaker.
- Faraz Ali, M., Sajid Aqeel Ahmad, M., Gaafar, A. R. Z., and Shakoor, A.** (2024). Seed pre-treatment with electromagnetic field (EMF) differentially enhances germination kinetics and seedling growth of maize (*Zea mays* L.). *J. King Saud Univ. - Sci.* **36**:103184.
- Faure, C., Roux, D., Beaubois, E., Girard, S., Bonnet, P., Paladian, F., Ledoigt, G., and Vian, A.** (2007). Systemic response after local exposition to low

amplitude HF-EMF in tomato plants. In *Proceedings of the 18th International Zurich Symposium on Electromagnetic Compatibility, EMC*, pp. 277–280.

- Feng, M., Zhang, M., Adhikari, B., and Chang, L.** (2024). Novel strategies for enhancing quality stability of edible flower during processing using efficient physical fields: A review. *Food Chem.* **448**:139077.
- Furet, P. M., Lothier, J., Demotes-Mainard, S., Travier, S., Henry, C., Guérin, V., and Vian, A.** (2014). Light and nitrogen nutrition regulate apical control in *Rosa hybrida* L. *J. Plant Physiol.* **171**:7–13.
- Gaff, D. F., and Ziegler, H.** (1989). ATP and ADP contents in leaves of drying and rehydrating desiccation tolerant plants. *Oecologia* **78**:407–410.
- González, A. M., Morcillo, A. D., Lopez Martinez, M., Temnani, A., Reyes, P. B., and Garcia, S. Z.** (2024). The impact of low and medium intensity electromagnetic field exposure on pepper seed germination. *IEEE Access* **12**:152087–152096.
- Goss, R., and Latowski, D.** (2020). Lipid dependence of xanthophyll cycling in higher plants and algae. *Front. Plant Sci.* **11**:1–22.
- Graebner, F.** (2016). Schirmdaempfung eines Drahtgeflechtes. In *EMV-gerechte Schirmung* (ed. Graebner, F.), pp. 169–170. Wiesbaden: Springer Fachmedien Wiesbaden.
- Grémiaux, A., Girard, S., Guérin, V., Lothier, J., Baluška, F., Davies, E., Bonnet, P., and Vian, A.** (2016). Low-amplitude, high-frequency electromagnetic field exposure causes delayed and reduced growth in *Rosa hybrida*. *J. Plant Physiol.* **190**:44–53.
- Gustavino, B., Carboni, G., Petrillo, R., Rizzoni, M., and Santovetti, E.** (2014). Micronucleus induction by 915 MHz radiofrequency radiation in *Vicia faba* root tips. *arXiv Advance Access* published 2014.
- Gustavino, B., Carboni, G., Petrillo, R., Paoluzzi, G., Santovetti, E., and Rizzoni, M.** (2016). Exposure to 915 MHz radiation induces micronuclei in *Vicia faba* root tips. *Mutagenesis* **31**:187–192.
- Haggerty, K.** (2010). Adverse influence of radio frequency background on trembling

Aspen seedlings: Preliminary observations. *Int. J. For. Res.* **2010**:1–7.

**Haider, T., Knasmueller, S., Kundi, M., and Haider, M.** (1994). Clastogenic effects of radiofrequency radiations on chromosomes of *Tradescantia*. *Mutat. Res.* **324**:65–68.

**Halmagyi, A., Surducan, E., and Surducan, V.** (2017). The effect of low- and high-power microwave irradiation on in vitro grown *Sequoia* plants and their recovery after cryostorage. *J. Biol. Phys.* **43**:367–379.

**Han, J. P., Köster, P., Drerup, M. M., Scholz, M., Li, S., Edel, K. H., Hashimoto, K., Kuchitsu, K., Hippler, M., and Kudla, J.** (2019). Fine-tuning of RBOHF activity is achieved by differential phosphorylation and Ca<sup>2+</sup> binding. *New Phytol.* **221**:1935–1949.

**Handa, A. P., Vian, A., Singh, H. P., Kohli, R. K., Kaur, S., and Batish, D. R.** (2023). Effect of 2850 MHz electromagnetic field radiation on the early growth, antioxidant activity, and secondary metabolite profile of red and green cabbage (*Brassica oleracea* L.). *Environ. Sci. Pollut. Res.* Advance Access published 2023, doi:10.1007/s11356-023-31434-3.

**Handa, A. P., Vian, A., Singh, H. P., Kohli, R. K., Kaur, S., and Batish, D. R.** (2024). Effect of 2850 MHz electromagnetic field radiation on the early growth, antioxidant activity, and secondary metabolite profile of red and green cabbage (*Brassica oleracea* L.). *Environ. Sci. Pollut. Res.* **31**:7465–7480.

**Harte, C.** (1975). Mutagenesis by radiowaves in *Anirrhinum majus* L. *Mutat. Res.* **29**:71–75.

**Havas, M., and Symington, M. S.** (2016). Effects of Wi-Fi radiation on germination and growth of broccoli, pea, red clover and garden cress seedlings: A partial replication study. *Curr. Chem. Biol.* **10**:65–73.

**Hill, D. A.** (1998a). *Electromagnetic Theory of Reverberation Chambers*. Technical Note (NIST TN), National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD.

**Hill, D. A.** (1998b). Plane wave integral representation for fields in reverberation chambers. *IEEE Trans. Electromagn. Compat.* **40**:209–217.

- Horton, P., and Ruban, A.** (2005). Molecular design of the photosystem II light-harvesting antenna: Photosynthesis and photoprotection. *J. Exp. Bot.* **56**:365–373.
- Huseynova, I. M., Aliyeva, D. R., and Aliyev, J. A.** (2013). Plant responses to stresses: Role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. *Peroxidases Biochem. Charact. Funct. Potential Appl.* **4**:142–158.
- Hussein, R. A., and El-Maghraby, R. A.** (2014). Effect of two brands of cell phone on germination rate and seedling of wheat (*Triticum aestivum*). *J. Environ. Pollut. Hum. Heal.* **2**:85–90.
- IEC 61000-4-21** (2011). *Electromagnetic compatibility (EMC) - Part 4-21: Testing and measurement techniques - Reverberation chamber test methods*. International Electrotechnical Commission. Standard.
- ISO 11452-5** (2023). *Road vehicles — Vehicle test methods for electrical disturbances from narrowband radiated electromagnetic energy — Part 5: Reverberation chamber*. International Organization for Standardization. Standard.
- Izzo, D., Rommel, A., Aidam, M., Vogt-Ardatjew, R., and Leferink, F.** (2020). A Closed-Loop Calibration Method for the Vibrating Intrinsic Reverberation Chamber. In *2020 International Symposium on Electromagnetic Compatibility - EMC EUROPE*, pp. 1–6.
- Jinapang, P., Prakob, P., Wongwattananard, P., Islam, N. E., and Kirawanich, P.** (2010). Growth characteristics of mung beans and water convolvuluses exposed to 425-MHz electromagnetic fields. *Bioelectromagnetics* **31**:519–527.
- Jo, J. W., Yang, S. W., Lee, G. W., Kim, J. H., Kim, Y. J., Choi, Y. K., Kim, K. J., Lee, H. S., Bang, S. W., and Kim, H. J.** (2024). Effect of a directional electromagnetic field on the early stages of plant (*Raphanus sativus* and *Saccharum officinarum*) growth. *Horticultrae* **10**.
- Johal, N., Batish, D., Pal, A., Chandel, S., and Pal, M.** (2022). Investigating the effects of 2850 MHz electromagnetic field radiations on the growth, germination and antioxidative defense system of chickpea (*Cicer arietinum* L.) seedlings.

*Russ. J. Plant Physiol.* **69**:1–8.

**Kafi, S. T., Ahmed, A. M., Sabah-Alkhair, M. K., Mohamed, D. A., Ahmed, R. S., and Hassaan, Z. O.** (2014). Effects of RF/MW exposure from mobile-phone base-stations on the growth of green mint plant using *Chl a* fluorescence emission. *Adv. Electromagn.* **3**:11–14.

**Karipidis, K., Brzozek, C., Mate, R., Bhatt, C. R., Loughran, S., and Wood, A. W.** (2023). What evidence exists on the impact of anthropogenic radiofrequency electromagnetic fields on animals and plants in the environment: a systematic map. *Environ. Evid.* **12**:1–23.

**Kaur, S., Vian, A., Chandel, S., Singh, H. P., Batish, D. R., and Kohli, R. K.** (2021). Sensitivity of plants to high frequency electromagnetic radiation: cellular mechanisms and morphological changes. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* **20**:55–74.

**Keller, J., Geier, U., and Tran, N. T.** (2025). In-depth analysis of chlorophyll fluorescence rise kinetics reveals interference effects of a radiofrequency electromagnetic field (RF-EMF) on plant hormetic responses to drought stress. *Int. J. Mol. Sci.* **26**:7038.

**Khalafallah, A. A., and Sallam, S. M.** (2009). Response of maize seedlings to microwaves at 945 MHz. *Rom. J. Biophys.* **19**:49–62.

**Klaus, A., Marcon, C., and Hochholdinger, F.** (2024). Spatiotemporal transcriptomic plasticity in barley roots: unravelling water deficit responses in distinct root zones. *BMC Genomics* **25**:1–15.

**Koleva, M., and Sirakov, K.** (2024). Study of the effect of pre-sowing electromagnetic impact on the development of primary root system of cotton seeds after different duration of storage. II. Mass of sprout and root. *Bulg. J. Agric. Sci.* **30**:717–727.

**Krauthäuser, H. G.** (2007). *Grundlagen und Anwendungen von Modenverwirbelungskammern*. Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg: Habilitationsschrift.

**Krishnan, R., Manoj, G., Harish, S., Sunukumar, S., Satheesh, L., Rajan, S., and**

- Murugan, K.** (2010). Effects of mobile phone radiation on root growth and meristematic cells of *Allium cepa* L. *J. Phytol. Res.* **23**:175–181.
- Kumar, K., Debnath, P., Singh, S., and Kumar, N.** (2023). An overview of plant phenolics and their involvement in abiotic stress tolerance. *Stresses* **3**:570–585.
- Kundu, A., Vangaru, S., Bhowmick, S., Bhattacharyya, S., Mallick, A. I., and Gupta, B.** (2021a). One-time electromagnetic irradiation modifies stress-sensitive gene expressions in rice plant. *Bioelectromagnetics* **42**:649–658.
- Kundu, A., Vangaru, S., Bhattacharyya, S., Mallick, A. I., and Gupta, B.** (2021b). Electromagnetic irradiation evokes physiological and molecular alterations in rice. *Bioelectromagnetics* **42**:173–185.
- Küpper, H., Benedikty, Z., Morina, F., Andresen, E., Mishra, A., and Trtílek, M.** (2019). Analysis of OJIP chlorophyll fluorescence kinetics and  $Q_A$  reoxidation kinetics by direct fast imaging. *Plant Physiol.* **179**:369–381.
- Langfelder, P., and Horvath, S.** (2008). WGCNA: An R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinformatics* **9**.
- Leferink, F.** (2008). In-situ high field strength testing using a transportable reverberation chamber. In *2008 Asia-Pacific Symposium on Electromagnetic Compatibility and 19th International Zurich Symposium on Electromagnetic Compatibility*, pp. 379–382.
- Leferink, F., and van Etten, W.** (2001). *Generating an EMC test field using a vibrating intrinsic reverberation chamber*. EMC Society Newsletter, 19 - 25.
- Leferink, F., Boudenot, J.-C., and van Etten, W.** (2000). Experimental results obtained in the vibrating intrinsic reverberation chamber. In *IEEE International Symposium on Electromagnetic Compatibility. Symposium Record (Cat. No.00CH37016)*, pp. 639–644.
- Lemoine, C., Besnier, P., and Drissi, M.** (2007). Investigation of reverberation chamber measurements through high-power goodness-of-fit tests. *IEEE Trans. Electromagn. Compat.* **49**:745–755.
- Liu, X., Li, L., Li, M., Su, L., Lian, S., Zhang, B., Li, X., Ge, K., and Li, L.** (2018). AhGLK1 affects chlorophyll biosynthesis and photosynthesis in peanut leaves

during recovery from drought. *Sci. Rep.* **8**:1–11.

- Loubaton, R., Champagnat, N., Vallat, L., and Vallouis, P.** (2024). MultiRNAflow: An R package for integrated analysis of temporal RNA-seq data with multiple biological conditions. *Bioinformatics* **40**:btac315.
- Love, M. I., Huber, W., and Anders, S.** (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **15**:1–21.
- Ma, H., Xu, X., Wang, S., Wang, J., and Peng, W.** (2021). Effects of microwave irradiation on the expression of key flavonoid biosynthetic enzyme genes and the accumulation of flavonoid products in *Fagopyrum tataricum* sprouts. *J. Cereal Sci.* **101**:103275.
- Magone, I.** (1996). The effect of electromagnetic radiation from the Skrunda Radio Location Station on *Spirodela polyrhiza* (L.) Schleiden cultures. *Sci. Total Environ.* **180**:75–80.
- Mandaris, D., Vogt-Ardatjew, R., Zaher Mahfouz, M. H. ., Suthau, E., and Leferink, F.** (2018). Time efficient reverberation chamber performance analysis using simultaneous multiprobe measurement technique. In *2018 International Symposium on Electromagnetic Compatibility (EMC EUROPE)*, pp. 1–5.
- Maoka, T.** (2020). Carotenoids as natural functional pigments. *J. Nat. Med.* **74**:1–16.
- Markov, M. S.** (2011). How living systems recognize applied electromagnetic fields. *Environmentalist* **31**:89–96.
- Mironova, E., and Romanovskii, Y.** (2001). Effect of low-intensity infrared and millimeter radiation on higher plants' biopotentials. *Crit. Rev. Biomed. Eng.* **29**:430–439.
- Monselise, E. B. I., Levkovitz, A., Gottlieb, H. E., and Kost, D.** (2011). Bioassay for assessing cell stress in the vicinity of radio-frequency irradiating antennas. *J. Environ. Monit.* **13**:1890–1896.
- Mukherjee, N., Kundu, A., and Mitra, M.** (2023). Study of SAR data and spatial distribution in a peace lily plant model under different electromagnetic exposure scenarios. *Prog. Electromagn. Res. C* **136**:61–74.

- Oluwajobi, A. O., Falusi, O. A., and Zubair, N. A.** (2014). Flower bud abscission reduced in *Hibiscus sabdariffa* by radiation from GSM mast. *Environ. Pollut.* **4**:53–58.
- Oppermann, L., and Löser, L.** (2022). On excitation periodicity in continuously stirred reverberation chambers. In *2022 International Symposium on Electromagnetic Compatibility -- EMC Europe*, pp. 195–200.
- Oppermann, L., and Weidemeier, M.** (2022). Use of textile structures for fast-stirring action in a rigid reverberation chamber. In *2022 ESA Workshop on Aerospace EMC (Aerospace EMC)*, pp. 01–06.
- Ozel, H. B., Cetin, M., Sevik, H., Varol, T., Isik, B., and Yaman, B.** (2021). The effects of base station as an electromagnetic radiation source on flower and cone yield and germination percentage in *Pinus brutia* Ten. *Biol. Futur.* **72**:359–365.
- Panda, D. K., Das, D. P., Behera, S. K., and Dhal, N. K.** (2024). Review on the impact of cell phone radiation effects on green plants. *Environ. Monit. Assess.* **196**.
- Parihar, L., and Mawal, P.** (2015). Effects of 2G and 3G mobile phone radiations on germination of seeds and growth of seedlings of pulses. *J. Chem. Pharm. Res.* **7**:268–271.
- Pesnya, D. S., and Romanovsky, A. V.** (2013). Comparison of cytotoxic and genotoxic effects of plutonium-239 alpha particles and mobile phone GSM 900 radiation in the *Allium cepa* test. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* **750**:27–33.
- Porcher, A., Girard, S., Bonnet, P., Rouveure, R., Guérin, V., Paladian, F., and Vian, A.** (2023). Non thermal 2.45 GHz electromagnetic exposure causes rapid changes in *Arabidopsis thaliana* metabolism. *J. Plant Physiol.* **286**:153999.
- Potters, G., Horemans, N., Bellone, S., Caubergs, R. J., Trost, P., Guisez, Y., and Asard, H.** (2004). Dehydroascorbate influences the plant cell cycle through a glutathione-independent reduction mechanism. *Plant Physiol.* **134**:1479–1487.
- Qureshi, S. T., Memon, S. A., Abassi, A. R., Sial, M. A., and Bughio, F. A.** (2017).

Radiofrequency radiations induced genotoxic and carcinogenic effects on chickpea (*Cicer arietinum* L.) root tip cells. *Saudi J. Biol. Sci.* **24**:883–891.

**R Core Team** (2021). *R: A language and environment for statistical computing*. version 4.4.3.

**Răcuciu, M., and Miclăuș, S.** (2007). Low-level 900 MHz electromagnetic field influence on vegetal tissue. *Rom. J. Biophys. Biophys* **17**:149–156.

**Răcuciu, M., Iftode, C., and Miclaus, S.** (2015). Inhibitory effects of low thermal radiofrequency radiation on physiological parameters of *Zea mays* seedlings growth. *Rom. J. Phys.* **60**:603–612.

**Răcuciu, M., Iftode, C., and Miclăuș, S.** (2018). Influence of 1 GHz radiation at low specific absorption rate of energy deposition on plant mitotic division process. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* **15**:1233–1242.

**Răcuciu, M.** (2009). Effects of radiofrequency radiation on root tip cells of *Zea mays*. *Rom. Biotechnol. Lett.* **14**:4365–4369.

**Răcuciu, M., Miclăuș, S., and Creangă, D. E.** (2008). Non-thermal, continuous and modulated RF field effects on vegetal tissue developed from exposed seeds. In *Electromagnetic Field, Health and Environment: Proceedings of EHE'07* (ed. Krawczyk, A.), pp. 142–148.

**Radic, S., Cvjetko, P., Malaric, K., Tkalec, M., and Pevalek-Kozlina, B.** (2007). Radio frequency electromagnetic field (900 MHz) induces oxidative damage to DNA and biomembrane in tobacco shoot cells (*Nicotiana tabacum*). In *IEEE MTT-S International Microwave Symposium*, pp. 2213–2216. IEEE, Honolulu, Hawaii, USA.

**Ragha, L., Mishra, S., Ramachandran, V., and Bhatia, M. S.** (2011). Effects of low-power microwave fields on seed germination and growth rate. *J. Electromagn. Anal. Appl.* **03**:165–171.

**Rana, H., and Parihar, L.** (2014). Effect of mobile phone radiations on protein contents of soybean seeds. *Int. J. Bot. Res.* **4**:1–10.

**Razek, A.** (2024). Analysis and control of ornamental plant responses to exposure to electromagnetic fields. *Ornam. Plant Res.* **4**.

- Recuero Virto, L., Thielens, A., Czerwiński, M., and Froidevaux, J.** (2024). The exposure of nonhuman living organisms to mobile communication emissions: A survey to establish European stakeholders' policy option preferences. *Risk Anal.* **44**:2554–2568.
- Ritchie, M. E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C. W., Shi, W., and Smyth, G. K.** (2015). Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* **43**:e47.
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., and Smyth, G. K.** (2009). edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **26**:139–140.
- Roche, J., Didyk, N. P., Ivanytska, B. O., Zaimenko, N. V., and Chudovska, O. O.** (2020). Effects of the electromagnetic field of Wi-Fi systems and experimental gadget M4 on growth, development and photosynthesis of wheat. *Plant Introd.* **85–86**:15–24.
- Roux, D., Vian, A., Goupil, P., Girard, S., Bonnet, P., and Paladian, F.** (2005). *Systemic accumulation of bZIP mRNA after Low Amplitude 900 MHz stimulation in plant.*  
[https://www.researchgate.net/publication/228411542\\_Systemic\\_accumulation\\_of\\_bZIP\\_mRNA\\_after\\_Low\\_Amplitude\\_900\\_MHz\\_stimulation\\_in\\_plant](https://www.researchgate.net/publication/228411542_Systemic_accumulation_of_bZIP_mRNA_after_Low_Amplitude_900_MHz_stimulation_in_plant).
- Roux, D., Vian, A., Girard, S., Bonnet, P., Paladian, F., Davies, E., and Ledoigt, G.** (2006). Electromagnetic fields (900 MHz) evoke consistent molecular responses in tomato plants. *Physiol. Plant.* **128**:283–288.
- Roux, D., Faure, C., Bonnet, P., Girard, S., Ledoigt, G., Davies, E., Gendraud, M., Paladian, F., and Vian, A.** (2008a). A possible role for extra-cellular ATP in plant responses to high frequency, low amplitude electromagnetic field. *Plant Signal. Behav.* **3**:383–385.
- Roux, D., Vian, A., Girard, S., Bonnet, P., Paladian, F., Davies, E., and Ledoigt, G.** (2008b). High frequency (900 MHz) low amplitude (5 V m<sup>-1</sup>) electromagnetic field: A genuine environmental stimulus that affects transcription, translation, calcium and energy charge in tomato. *Planta* **227**:883–891.

- Roux, D., Catrain, A., Lallechere, S., and Joly, J. C.** (2015). Sunflower exposed to high-intensity microwave-frequency electromagnetic field: Electrophysiological response requires a mechanical injury to initiate. *Plant Signal. Behav.* **10**:e972787.
- Rusakova, A., Nosachev, I., Lysenko, V., Guo, Y., Logvinov, A., Kirichenko, E., Varduny, T., Cherednikov, S., and Chugueva, O.** (2017). Impact of high strength electromagnetic fields generated by Tesla transformer on plant cell ultrastructure. *Inf. Process. Agric.* **4**:253–258.
- Sandu, D. D., Goiceanu, C., Ispas, A., Creanga, I., Miclăus, S., and Creangă, D. E.** (2005). A preliminary study on ultra high frequency electromagnetic fields effect on black locust chlorophylls. *Acta Biol. Hung.* **56**.
- Schmutz, P., Siegenthaler, J., Stäger, C., Tarjan, D., and Bucher, J. B.** (1996). Long-term exposure of young spruce and beech trees to 2450-MHz microwave radiation. *Sci. Total Environ.* **180**:43–48.
- Scialabba, A., and Tamburello, C.** (2002). Microwave effects on germination and growth of radish (*Raphanus sativus* L.) seedlings. *Acta Bot. Gall.* **149**:113–123.
- Selga, T., and Selga, M.** (1996). Response of *Pinus sylvestris* L. needles to electromagnetic fields. Cytological and ultrastructural aspects. *Sci. Total Environ.* **180**:65–73.
- Senavirathna, M. D. H. J., and Asaeda, T.** (2014). Radio-frequency electromagnetic radiation alters the electric potential of *Myriophyllum aquaticum*. *Biol. Plant.* **58**:355–362.
- Senavirathna, M. D. H. J., Takashi, A., and Kimura, Y.** (2014). Short-duration exposure to radiofrequency electromagnetic radiation alters the chlorophyll fluorescence of duckweeds (*Lemna minor*). *Electromagn. Biol. Med.* **33**:327–334.
- Serra, R.** (2009). *Introduction of randomness in deterministic, physically-consistent descriptions of reverberation chambers and experimental verification*. Politecnico di Torino: Doktorarbeit.
- Serra, R., and Leferink, F.** (2010). Optimizing the stirring strategy for the vibrating

intrinsic reverberation chamber. In *9th International Symposium on EMC and 20th International Wroclaw Symposium on Electromagnetic Compatibility*, pp. 457–462.

**Serra, R., Marvin, A., Moglie, F., Primiani, V., Cozza, A., Arnaut, L., Huang, Y., Hatfield, M., Klingler, M., and Leferink, F. (2017).** Reverberation Chamber à la carte: An overview of the different mode-stirring techniques. *IEEE Electromagn. Compat. Mag.* **6**:63–78.

**Sharma, V. E. D. P., Singh, H. P. A. L., and Kohli, R. K. (2009a).** Effect of mobile phone EMF on biochemical changes in emerging seedlings of *Phaseolus aureus* Roxb. *The Ecoscan* **3**:211–214.

**Sharma, V. P., Singh, H. P., Kohli, R. K., and Batish, D. R. (2009b).** Mobile phone radiation inhibits *Vigna radiata* (mung bean) root growth by inducing oxidative stress. *Sci. Total Environ.* **407**:5543–5547.

**Sharma, S., Bahel, S., and Kaur Katnoria, J. (2023a).** Evaluation of oxidative stress and genotoxicity of 900 MHz electromagnetic radiations using *Trigonella foenum-graecum* test system. *Protoplasma* **260**:209–224.

**Sharma, S., Sharma, P., Bahel, S., Singh, J., and Katnoria, J. K. (2023b).** Comprehensive analysis of genotoxic effects and antioxidative defence mechanisms in plant test system exposed to 1800 MHz electromagnetic radiations: a root chromosomal aberration and FTIR spectroscopy approach. *Toxicol. Environ. Health Sci.* **15**:385–398.

**Sharma, S., Sharma, P., Singh, J., Bahel, S., Dutta, R., Vig, A. P., and Katnoria, J. K. (2025a).** Assessing cell viability and genotoxicity in *Trigonella foenum-graecum* L. exposed to 2100 MHz and 2300 MHz electromagnetic field radiations. *Plant Physiol. Biochem.* **219**:109311.

**Sharma, A., Bala, N., Sharma, M., Katnoria, J. K., and Bahel, S. (2025b).** Study on evaluation of effects of electromagnetic radiation on pollen viability in some commonly occurring plant species following different staining methods. *Protoplasma* Advance Access published 2025, doi:10.1007/s00709-025-02093-7.

- Singh, H. P., and Sharma, V. P.** (2011). Electromagnetic radiations from cell phone inhibit plant root growth through induction of oxidative damage. *Epidemiology* **1**:S249.
- Singh, H. P., Sharma, V. P., Batish, D. R., and Kohli, R. K.** (2012). Cell phone electromagnetic field radiations affect rhizogenesis through impairment of biochemical processes. *Environ. Monit. Assess.* **184**:1813–1821.
- Skiles, J. W.** (2006). Plant response to microwaves at 2.45 GHz. *Acta Astronaut.* **58**:258–263.
- Stefi, A. L., Margaritis, L. H., and Christodoulakis, N. S.** (2017). The aftermath of long-term exposure to non-ionizing radiation on laboratory cultivated pine plants (*Pinus halepensis* M.). *Flora Morphol. Distrib. Funct. Ecol. Plants* **234**:173–186.
- Stefi, A. L., Vassilacopoulou, D., Margaritis, L. H., and Christodoulakis, N. S.** (2018). Oxidative stress and an animal neurotransmitter synthesizing enzyme in the leaves of wild growing myrtle after exposure to GSM radiation. *Flora Morphol. Distrib. Funct. Ecol. Plants* **243**:67–76.
- Strasser, R. J., Srivastava, A., and Tsimili-Michael, M.** (2014). The fluorescent transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. In *Probing Photosynthesis*, pp. 445–483.
- Student** (1908). The probable error of a mean. *Biometrika* **6**:1–25.
- Surducan, E., Surducan, V., Butiuc-Keul, A., and Halmagy, A.** (2013). Microwaves irradiation experiments on biological samples. *Stud. Ubb Biol.* **58**:83–98.
- Suzuki, N., Hasegawa, Y., Kadomatsu, K., Yamakawa, K., Sameshima, M., Ando, A., and Horikoshi, S.** (2025). Microwave pre-stimulation methodology for plant growth promotion. *Sci. Rep.* **15**:1–17.
- Szollosi, R.** (2014). Superoxide Dismutase (SOD) and abiotic stress tolerance in plants: An overview. In *Oxidative damage to plants: Antioxidant networks and signaling*, pp. 89–129.
- Tafforeau, M., Verdus, M.-C., Norris, V., White, G., Demarty, M., Thellier, M., and Ripoll, C.** (2002). SIMS Study of the calcium-deprivation step related to

epidermal meristem production induced in flax by cold shock or radiation from a GSM telephone. *J. Trace Microprobe Tech.* **20**:611–623.

**Tafforeau, M., Verdus, M., Norris, V., White, G., Cole, M., Demarty, M., Thellier, M., and Ripoll, C.** (2004). Plant sensitivity to low intensity 105 GHz electromagnetic radiation. *Bioelectromagnetics* **25**:403–407.

**Tang, C., Yang, C., Yu, H., Tian, S., Huang, X., Wang, W., and Cai, P.** (2018). Electromagnetic radiation disturbed the photosynthesis of *Microcystis aeruginosa* at the proteomics level. *Sci. Rep.* **8**:8–15.

**Tran, N. T., Jokic, L., Keller, J., Geier, J. U., and Kaldenhoff, R.** (2023). Impacts of radio-frequency electromagnetic field (RF-EMF) on lettuce (*Lactuca sativa*)—Evidence for RF-EMF interference with plant stress responses. *Plants* **12**:1–25.

**Upadhyaya, T.** (2017). Carbohydrate content modifications in plant due to electromagnetic wave exposure. *Int. J. Innov. Res. Multidiscip. F.* **3**:360–361.

**Upadhyaya, C., Patel, I., Upadhyaya, T., Desai, A., Patel, U., and Pandya, K.** (2021a). Investigation of mobile communication radio frequency exposure on the medicinal property of *Jasminum grandiflorum* L. In *Proceedings - 5th International Conference on Computing Methodologies and Communication, ICCMC 2021*, pp. 212–218.

**Upadhyaya, C., Patel, I., Upadhyaya, T., and Desai, A.** (2021b). Exposure effect of 900 MHz electromagnetic field radiation on antioxidant potential of medicinal plant *Withania somnifera*. In *Lecture Notes in Networks and Systems*, pp. 951–964. Springer Singapore.

**Upadhyaya, C., Upadhyaya, T., and Patel, I.** (2022a). Exposure effects of non-ionizing radiation of radio waves on antimicrobial potential of medicinal plants. *J. Radiat. Res. Appl. Sci.* **15**:1–10.

**Upadhyaya, C., Upadhyaya, T., and Patel, I.** (2022b). Attributes of non-ionizing radiation of 1800 MHz frequency on plant health and antioxidant content of Tomato (*Solanum lycopersicum*) plants. *J. Radiat. Res. Appl. Sci.* **15**:54–68.

**Ursache, M., Mindru, G., Creangă, D. E., Tufescu, F. M., and Goiceanu, C.** (2009). The effects of high frequency electromagnetic waves on the vegetal

organisms. *Rom. Reports Phys.* **54**:133–145.

**Vian, A., Roux, D., Girard, S., Bonnet, P., Paladian, F., Davies, E., and Ledoigt, G.** (2006). Microwave irradiation affects gene expression in plants. *Plant Signal. Behav.* **1**:67–69.

**Vian, A., Davies, E., Gendraud, M., and Bonnet, P.** (2016). Plant responses to high frequency electromagnetic fields. *Biomed Res. Int.* **2016**:1830262.

**Vishwakarma, K., Upadhyay, N., Kumar, N., Yadav, G., Singh, J., Mishra, R. K., Kumar, V., Verma, R., Upadhyay, R. G., Pandey, M., et al.** (2017). Abscisic acid signaling and abiotic stress tolerance in plants: A review on current knowledge and future prospects. *Front. Plant Sci.* **8**:1–12.

**Waldmann-Selsam, C., Balmori-de la Puente, A., Breunig, H., and Balmori, A.** (2016). Radiofrequency radiation injures trees around mobile phone base stations. *Sci. Total Environ.* **572**:554–569.

**Wasternack, C., Stenzel, I., Hause, B., Hause, G., Kutter, C., Maucher, H., Neumerkel, J., Feussner, I., and Miersch, O.** (2006). The wound response in tomato - Role of jasmonic acid. *J. Plant Physiol.* **163**:297–306.

**Wickham, H.** (2016). *ggplot2: Elegant graphics for data analysis*.  
<https://ggplot2.tidyverse.org>.

**Xie, X., He, Z., Chen, N., Tang, Z., Wang, Q., and Cai, Y.** (2019). The roles of environmental factors in regulation of oxidative stress in plant. *Biomed Res. Int.* **2019**:21–27.

**Zare, H., Mohsenzadeh, S., and Moradshahi, A.** (2015). Effects of high frequency electromagnetic wave and salicylic acid on the growth and some physiological and biochemical parameters in *Lycopersicon esculentum*. *Cumhur. Univ. Fac. Sci. Sci. J.* **3**:2120–2128.

**Zhang, Y., Luan, Q., Jiang, J., and Li, Y.** (2021). Prediction and utilization of malondialdehyde in exotic pine under drought stress using near-infrared spectroscopy. *Front. Plant Sci.* **12**:1–9.

**Zhang, X. H., Vichyavichien, P., Nifakos, N., Kaplan, N., Jin, X. L., Wellman, A., Spanoudis, A., and Klingler, M.** (2023). KED gene expression in early

response to wounding stress in tomato plants. *Physiol. Plant.* **175**.