
Untersuchung von toten Bergföhren im Schweizerischen
Nationalpark mit stabilen Isotopen



BACHELORARBEIT
EIDGENÖSSISCHE TECHNISCHE HOCHSCHULE ZÜRICH
DEPARTEMENT UMWELTSYSTEMWISSENSCHAFTEN USYS

Autorin:
Anna BALICKA

Betreuung:
Dr. Olga CHURAKOVA
Dr. Christof BIGLER

29. Juni 2015

Titelbild: Bergföhren im Schweizerischen Nationalpark, Foto von Antonia Ulmann

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	4
2	Einleitung	5
3	Theorie	6
3.1	Stabile Isotope	6
3.2	Fraktionierung	6
3.3	Nicht-Strukturkohlenhydrate und organische Säuren	8
3.4	Massenspektrometrie	10
4	Methoden	11
4.1	Die Bergföhre	11
4.2	Das Untersuchungsgebiet	11
4.3	Probenentnahme	15
4.4	Datierung	15
4.5	Vorbereitung der Proben	17
4.5.1	Zuckerextraktion	18
4.5.2	Reinigung der Zucker und Extraktion der organischen Säuren	18
4.6	Isotopenanalyse	20
5	Resultate	23
5.1	Datierung	23
5.2	$\delta^{13}C$ von Zucker und organischen Säuren	26
6	Diskussion	28
7	Schlussfolgerung	32
8	Dank	33

1 Zusammenfassung

In dieser Bachelorarbeit wurden abgestorbene Bergföhren (*Pinus mugo* var. *uncinata*) aus dem Schweizerischen Nationalpark in Bezug auf das Verhältnis der Kohlenstoffisotope ^{13}C und ^{12}C untersucht. Das Ziel war es, die Methode der Isotopenanalyse anzuwenden und aus den gewonnenen Daten Aussagen über mögliche Mortalitätsursachen wie Trockenheit und Zuckermangel machen zu können. Bei vier toten Bäumen wurden je eine Stammscheibe entnommen, die Jahrringbreiten gemessen und die Jahrringe datiert. Das Holz der letzten Jahrringe wurde entnommen und im Paul Scherrer Institut in Villingen verarbeitet, damit der Zucker und die organischen Säuren in einem Massenspektrometer analysiert werden konnten. Dazu musste der Zucker aus dem Holz gelöst und gereinigt werden, bis schliesslich der Zucker und organische Säuren in je einer Probe vorlagen.

Die untersuchten Jahrringe waren sehr schmal und somit waren die daraus gewonnenen Holzmenngen gering. Auch die Datierung dieser Jahrringe wurde dadurch erschwert. Die Ergebnisse der Isotopenanalyse deckten sich zum Teil mit Resultaten aus anderen Studien. Bei einigen Bäumen wurde ein saisonaler Trend gefunden, nämlich eine Verringerung des $\delta^{13}\text{C}$ im Spätholz. Dies könnte den Wechsel von Reservekohlenstoffen zu diesjährig assimilierten Kohlenstoffen widerspiegeln. In den untersuchten organischen Säuren gab es Hinweise auf den Einfluss der Trockenheit. Um konkrete Aussagen über den Zusammenhang von Kohlenstoffisotopen und den Mortalitätsursachen bei Pflanzen machen zu können, sind weitere Untersuchungen nötig.

2 Einleitung

Durch die Bildung von Holzzellen im Kambium wächst der Baum in die Höhe und in die Breite, wozu mehrheitlich Kohlenstoff aus der Luft und Wasser- und Sauerstoff aus dem aufgenommenen Wasser verwendet werden. In saisonalen Klimazonen werden anfangs Jahr grosse Zellen gebildet, gegen den Winter werden sie kleiner, bis der Baum über den Winter überhaupt nicht mehr wächst. Die sich daraus ergebende Holzstruktur ist charakterisiert von Jahrringen in unterschiedlichen Breiten. Jeder Jahrring widerspiegelt Umweltbedingungen der Zeit, als er gebildet wurde, beispielsweise kann bei guten Wachstumsbedingungen und genügend Wasser ein breiterer Jahrring gebildet werden als in einem sehr trockenen Jahr. Die Dendrochronologie setzt sich mit der Analyse der Jahrringbreiten auseinander. Es werden Ursachen für Muster in den Jahrringbreiten gesucht und interpretiert. Durch den Vergleich von Kurvenverläufen von Jahrringbreiten können Jahrringe datiert werden (Kreuzdatierung) und somit auch Ereignisse, die den Jahrring geprägt haben, wie zum Beispiel ein sehr trockenes Jahr oder ein Feuer, das eine Narbe am Baum hinterlassen hat. So können zum Beispiel Extremereignisse datiert werden. Einen etwas anderen Ansatz befolgt die Dendrochemie: Analysiert werden hier die Elemente, aus denen die Jahrringe gebildet wurden. Dadurch können einerseits Rückschlüsse gezogen werden, wie es dem Baum zur Zeit der Bildung des Jahrringes gegangen ist, beispielsweise wie viel Zucker eingelagert wurde. Andererseits können auch Aussagen zum Zustand der Atmosphäre zu dieser Zeit gemacht werden. Dazu muss aber verstanden werden, wie Stoffe aus der Atmosphäre in das Holz eingelagert werden. Es existieren natürlich auch viele andere Arten von Archiven, die Informationen über den Zustand der Atmosphäre von vergangenen Jahren gespeichert haben, wie Sedimente oder Eis. Der unbestreitbare Vorteil der Jahrringe als Informationsquelle ist die Möglichkeit, Jahrringe genau zu datieren (Speer, 2010; Schweingruber, 1988). So können Daten in jährlicher Auflösung erhalten werden und Daten der selben Jahre von unterschiedlichen Bäumen miteinander verglichen werden (McCarroll und Loader, 2004).

In dieser Arbeit wird versucht, tote Bäume aus dem Schweizerischen Nationalpark mit Hilfe der Analyse der Kohlenstoffisotope ^{13}C und ^{12}C zu untersuchen und Rückschlüsse auf mögliche Mortalitätsursachen wie Trockenheit und Zuckermangel zu ziehen. In der Schweiz wird aufgrund von Klimamodellen ein Anstieg der Mitteltemperaturen und eine Abnahme der Sommerniederschläge prognostiziert (CH2011). Die Rolle der Trockenheit könnte somit in Zukunft als wichtiger Einflussfaktor auf das Baumwachstum relevanter werden. Darum wird in dieser Arbeit der Einfluss der Trockenheit auf die Bergföhre im Schweizerischen Nationalpark untersucht. Die Fragestellung lautet, ob die Isotopenanalyse als Methode anwendbar ist auf die untersuchten Bäume in Bezug auf die Mortalität und ob sich Trockenheit als Einflussfaktor auf die Isotopenzusammensetzung erkennen lässt. Eine Hypothese ist, dass der Mangel an Zucker für die Mortalität eine wichtige Rolle spielt. Insbesondere sollen auch die Kohlenstoffisotope der organischen Säuren untersucht werden. Wenige Untersuchungen wurden bisher auf diesem Gebiet durchgeführt (Hettmann et al., 2008), was diesen Aspekt besonders interessant macht.

3 Theorie

3.1 Stabile Isotope

Bäume bestehen überwiegend aus Kohlenstoff, Wasserstoff und Sauerstoff. Von diesen Elementen existieren verschiedene Isotope. Beim Kohlenstoff wird der gesamte C-Pool mit 98.89% vom stabilen Isotop ^{12}C dominiert, welches sechs Protonen und sechs Neutronen besitzt. Daneben gibt es noch das instabile ^{14}C mit sechs Protonen und acht Neutronen sowie das stabile ^{13}C mit sechs Protonen und sieben Neutronen, welches 1.11% des C-Pools ausmacht (Matyssek et al., 2010) und für diese Arbeit von besonderem Interesse ist. Die gängige Notation für das Verhältnis von ^{13}C zu ^{12}C ist in Form von delta (δ) gemäss der folgenden Formel:

$$\delta^{13}\text{C}[\text{‰}] = (R_{\text{Probe}}/R_{\text{Standard}} - 1) * 1000 \quad (1)$$

Wobei R_{Probe} und R_{Standard} die Verhältnisse von ^{13}C zu ^{12}C von der Probe und dem Standard sind (McCarroll und Loader, 2004). Als Standard wird das Vienna PeeDee Belemite verwendet (Coplen, 1995). Die Atmosphäre weist nach dieser Definition einen $\delta^{13}\text{C}$ Wert von -8 ‰ auf (McCarroll und Loader, 2004).

3.2 Fraktionierung

Das in der Atmosphäre vorkommende Verhältnis von ^{13}C zu ^{12}C wird von Pflanzen nicht im gleichen Verhältnis in die Biomasse übersetzt. Pflanzliche Biomasse von C_3 Pflanzen hat ein um ca. 20 ‰ verringertes $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Verhältnis gegenüber der Atmosphäre (Bender, 1968). Verschiedene Faktoren bei der Aufnahme und Fixierung von Kohlenstoff führen zu dieser Verminderung (Diskriminierung) von ^{13}C in pflanzlicher Biomasse gegenüber der Atmosphäre. Eine wichtige Beobachtung ist, dass die gesteigerte Verbrennung von fossilen Brennstoffen durch den Menschen auch das $\delta^{13}\text{C}$ in der Atmosphäre reduziert. Der Grund dafür ist, dass der in der Biomasse gebundene Kohlenstoff, der bei der Verbrennung in der Atmosphäre freigesetzt wird, einen verminderten ^{13}C Anteil hat (McCarroll und Loader, 2004). Der Ursprung der Diskriminierung von ^{13}C in der Biomasse liegt einerseits in der verminderten Aufnahme gegenüber dem ^{12}C aufgrund des schwereren Gewichtes. CO_2 , welches ^{12}C gebunden hat, ist leichter und wird somit eher durch Diffusion in die Stomata aufgenommen. Bei der Fixierung des Kohlenstoffes durch das Molekül Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase (Rubisco) findet andererseits eine erneute Verminderung statt, da dieses ^{12}C bevorzugt. Diese Diskriminierung wird in der Gleichung 2 verdeutlicht. Dabei bezeichnet a ($\approx 4.4\text{‰}$) die Diskriminierung während der Diffusion in die Stomata und b ($\approx 27\text{‰}$) jene bei der Fixierung durch Rubisco. c_i und c_a bezeichnen die CO_2 -Konzentration innerhalb und ausserhalb der Zellen (Farquhar et al., 1982).

$$\Delta\text{‰} = a + (b - a)(c_i/c_a) \quad (2)$$

Faktoren, welche einen Einfluss auf die CO_2 Konzentration in den Zellen haben, nehmen also auch einen Einfluss auf die fixierte Menge an ^{13}C , welche später in der Pflanze als Zucker vorliegt. Abbildung 1 zeigt die wichtigsten Einflussfaktoren auf. So können zum Beispiel Niederschlag, Temperatur, der Abstand der Krone zum Boden

oder die Respiration der Borke einen Einfluss auf das $\delta^{13}C$ haben. Der Faktor, auf den in dieser Arbeit fokussiert wird, ist die Trockenheit. Bei Trockenheit werden die Stomata verengt, um Wasserverlust zu vermeiden. Die Folge ist ein höherer Druck von $^{13}CO_2$ im Pflanzeninneren, da dieses von Rubisco nicht bevorzugt eingebaut wird. Dies jedoch bewirkt wiederum einen vermehrten Einbau von $^{13}CO_2$, weil kein anderes CO_2 nachströmen kann. So kann bei Pflanzen, die Wasserstress ausgesetzt sind, ein erhöhtes $\delta^{13}C$ gemessen werden (Matyssek et al., 2010).

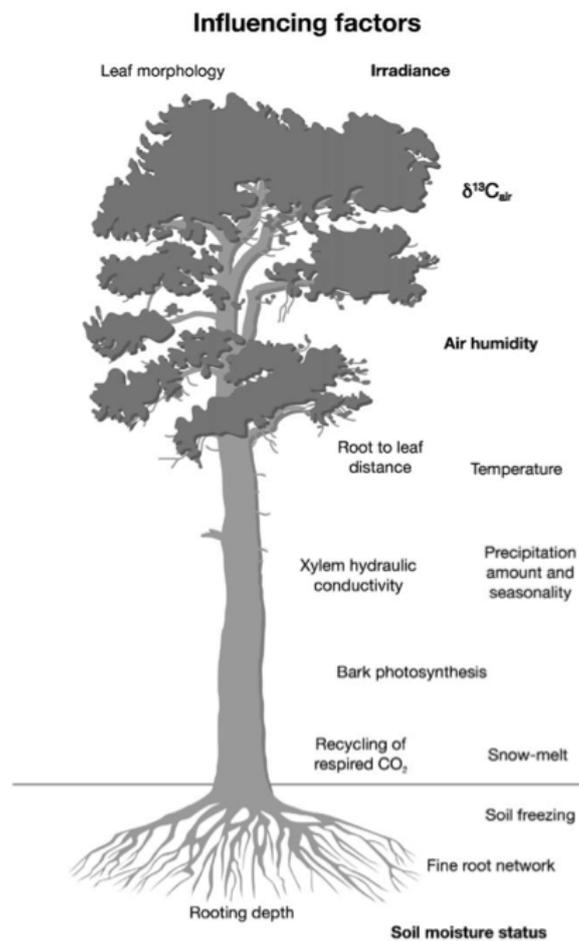


Abbildung 1: Umweltfaktoren, die die Fraktionierung von Kohlenstoffisotopen beeinflussen. Bild aus McCarroll und Loader (2004)

3.3 Nicht-Strukturkohlenhydrate und organische Säuren

Unter Nicht-Strukturkohlenhydraten (auf Englisch non-structural carbohydrates, NSC) werden lösliche Zucker und Stärke verstanden. Diese können von Pflanzen gespeichert und bei Bedarf mobilisiert werden (Simard et al., 2013). Jedoch ist noch vieles unbekannt über die Dynamik, wie NSC von Bäumen verwendet werden. Es gibt Modelle, die einen saisonalen Zyklus propagieren. Die Menge an NSC nimmt während Knospenaustrieb, Wachstum und Fruchtbildung ab. NSC werden wieder ersetzt, wenn das Wachstum abnimmt bis schliesslich während der Ruhephase eine erneute Abnahme stattfindet, da NSC für die Respiration verwendet werden (Dietze et al., 2014). Es wurden Beobachtungen gemacht, dass nicht alle dem Anschein nach verfügbaren NSC von Pflanzen bei einer Nährstoffknappheit auch verwendet wurden. Neben der offensichtlichen Funktion als Nährstoffspeicher fungieren die NSC als wichtige Faktoren in osmotischen Funktionen. Trockenheit führt bei angepassten Pflanzen zu einem Anstieg an NSC, während das bei nicht-trockenheitsresistenten Pflanzen nicht beobachtet wurde (Piper, 2011). Unter anderem stellten sich Dietze et al. (2014) die Frage, ob der Prozess, wenn die Pflanze NSC aus dem Speicher mobilisiert und verwendet, (quasi)aktiv oder passiv ist. Es wurden auch Hinweise auf aktive Speicherung gefunden, da die Umwandlung von Zucker in Stärke und umgekehrt nicht spontan, sondern durch von der Pflanze kontrollierte Prozesse stattfindet (Dietze et al., 2014). Für diese Bachelorarbeit ist das Thema in dieser Hinsicht von Bedeutung, dass sich die Frage stellt, wie sich ein Mangel an NSC auf die Mortalität von Bäumen auswirkt. Dabei wurde der Fokus auf Zucker gelegt und Stärke nicht untersucht.

Organische Säuren sind Kohlenstoffverbindungen mit mindestens einer Carboxylgruppe. Sie spielen in verschiedenen Teilen des pflanzlichen Stoffwechsels eine wichtige Rolle. Beispiele für organische Säuren sind Citrate und Malate. Sie sind Zwischenstufen im Tricarbonsäurezyklus (Abbildung 2) (Ryan et al., 2001; Voronin et al., 2012). Der Tricarbonsäurezyklus wird sowohl von verschiedenen Umweltbedingungen als auch von der Art der Pflanze und deren Alter beeinflusst (Hettmann et al., 2008). In Untersuchungen von verschiedenen Pflanzen wurde eine saisonale Variabilität im $\delta^{13}C$ der organischen Säuren festgestellt. Es zeigte sich, dass das $\delta^{13}C$ von Äpfel- und Zitronensäure im Frühling negativere Werte aufwies als im Herbst (Hettmann et al., 2008).

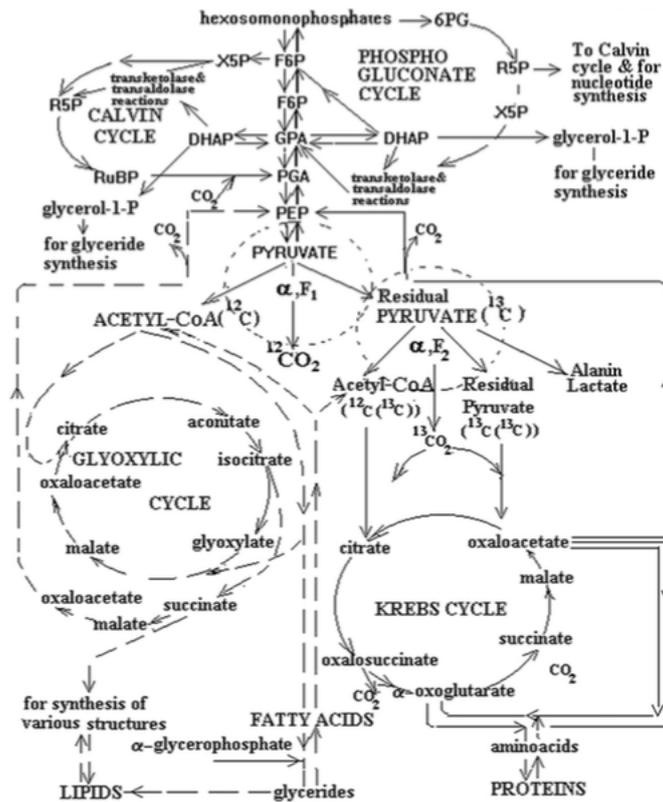


Figure 1 Simplified diagram of the glycolytic metabolism. According to the OMC, the glycolytic chain functions in two regimes – the phase of glycolysis and the phase of gluconeogenesis. During glycolysis, the carbon substrate flux goes “down”. This corresponds to the transformation of carbohydrates into lipids and proteins. During gluconeogenesis, the carbon substrate flux goes “up”. This corresponds to the reverse transformation of lipids and proteins into carbohydrates. “Up” and “down” indicate only general direction of transformations, since glycolytic and gluconeogenic pathways do not coincide. There are two stages of the pyruvate decarboxylase complex in glycolysis: one corresponds to less than twofold pyruvate pool depletion and mainly comprises lipid component synthesis via C₂-fragments depleted in ¹³C relative to carbohydrates, which feed the glycolytic chain. The other corresponds to more than twofold pool depletion and comprises the Krebs cycle operation and the derivation of the protein components. The products of pyruvate decarboxylation used as structural units in the Krebs cycle operation (C₂ and C₃ fragments and evolved CO₂) are enriched in ¹³C. According to the known Rayleigh equation [15], isotope ratios of initial substrate, reaction product and residual substrate in chemical reactions are linked in the following way: when the extent of the initial substrate pool is depleted less than twofold, the product is enriched in ¹²C with respect to the initial substrate; when the extent of depletion is more than twofold, the product gets enriched in ¹³C. Dotted lines denote the enzymatic pyruvate decarboxylase complex where carbon isotope fractionation occurs. Abbreviations: X5P, xylose-5-phosphate; R5P, ribose-5-phosphate; RuBP, ribulose-1,5-bisphosphate; 6PG, 6-phosphogluconate; F6P, fructose 6-phosphate; FBP, fructose 1,5-bisphosphate; PGA, phosphoglyceric acid; DHAP, dihydroxyacetone phosphate; PEP, phosphoenolpyruvate.

Abbildung 2: Darstellung der Glykolyse (aus Voronin et al. (2012))

3.4 Massenspektrometrie

Für die Bestimmung des Verhältnisses von ^{13}C zu ^{12}C wird die Masse von $^{45}\text{CO}_2$ ($^{13}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$) zu $^{44}\text{CO}_2$ ($^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$) der Probe in einem Massenspektrometer gemessen. ^{14}C kann dabei vernachlässigt werden (McCarroll und Loader, 2004). Die Massenspektrometrie baut darauf auf, dass unterschiedliche Verbindungen je nach Masse in einem ionisierten Zustand von einem elektrischen Feld unterschiedlich abgelenkt werden und detektiert werden können. Dazu wird die Probe zuerst verdampft (wenn sie nicht schon in gasförmiger Form vorliegt) und einem Strahl beschleunigter Elektronen ausgesetzt. Treffen diese auf die zu untersuchende Verbindung, wird sie ionisiert, verliert also Elektronen. Die nun geladenen Teilchen der Probe werden in einem elektrischen Feld beschleunigt und fliegen aus der Ionisierungskammer hinaus. In der nächsten Kammer findet die Trennung nach Masse statt. Die unterschiedlich schweren Teilchen werden in einem elektrischen Feld unterschiedlich stark abgelenkt und treffen somit unterschiedlich auf die Detektoren auf. Die elektrische Ladung wird dabei an das Auffanggefäß abgegeben (Abbildung 13). Die abgegebenen Ladungen werden registriert, wobei die Ausschläge als Massen-Peaks bezeichnet werden. Das Resultat ist ein Massenspektrum, also ein Diagramm auf welchem das Detektorsignal gegen die magnetische Feldstärke aufgetragen wird. Die Lage der Peaks gibt dabei die Art der Verbindung an und die Höhe deren relative Menge (Brunnée und Voshage, 1964).

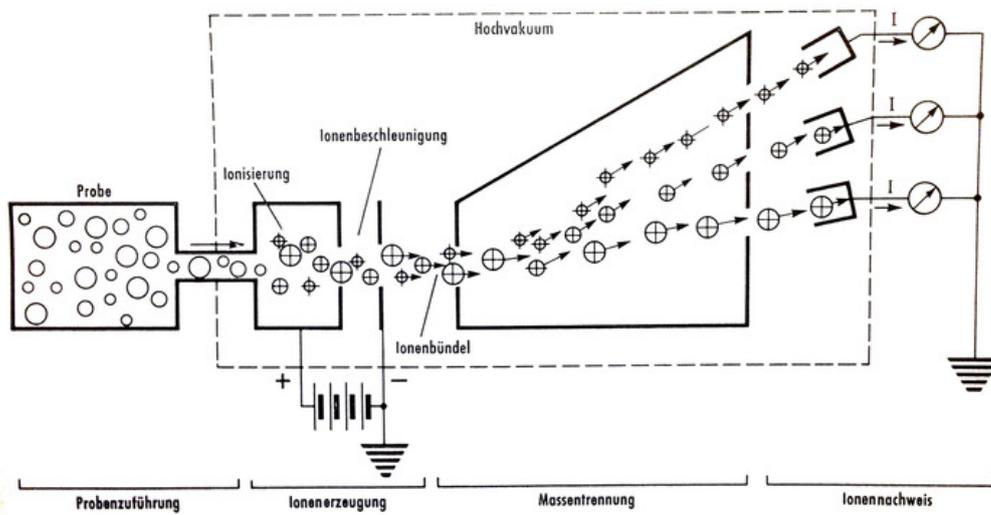


Abbildung 3: Grundprinzip eines massenspektrometrischen Apparates. Bild aus Brunnée und Voshage (1964)

4 Methoden

4.1 Die Bergföhre

Die untersuchte Baumart ist *Pinus mugo* var. *uncinata* (Abbildung 4), auch bekannt als aufrechte Bergföhre. Es ist eine Sippe aus der Artengruppe *Pinus mugo* agg., die daneben noch *Pinus mugo* und *Pinus rotundata* erfasst. In dieser Arbeit wird sie künftig Bergföhre genannt. Das Verbreitungsgebiet liegt vor allem in den Pyrenäen und Westalpen auf 1000 bis 2300 m ü.M. Die nicht ganz einfache und uneinheitliche Artenabgrenzung in der *Pinus mugo* Artengruppe macht eine klare Abgrenzung des Verbreitungsgebietes schwierig. Als bestes Unterscheidungsmerkmal dient die Zapfenform, die bei *Pinus mugo* var. *uncinata* grösser und assymetischer ist als bei den übrigen *Pinus mugo* Arten. Die Bergföhre kommt sowohl an Süd- als auch an Nordhängen und auch in sehr schneereichen Gebieten vor, der aufrechte Wuchs macht sie jedoch anfällig auf Frosttrocknis. Ein Alter von 200 bis 300 Jahren ist keine Seltenheit bei den ca. 10-20 m gross werdenden Bäumen. Das Wild zieht die Arve (*Pinus cembra*) der Bergföhre vor. Im Schweizerischen Nationalpark ist der Wurzelschwamm (*Heterobasidion annosum*) eine wichtige Todesursache, der Hallimasch (*Armillaria* spp.) ist jedoch auch ein bedeutender Schädling der Bergföhre (Schütt et al., 2006).

4.2 Das Untersuchungsgebiet

Das Untersuchungsgebiet liegt im Schweizerischen Nationalpark. Der Park liegt im Südosten der Schweiz im Kanton Graubünden und umfasst eine 170.3 km² grosse Fläche mitten in den Alpen. Die abgeschirmte Lage ist für den sehr geringen Niederschlag von ca. 800 mm im Jahr verantwortlich (zum Vergleich: in der Südschweiz sind 2000 mm üblich). Die jährliche Durchschnittstemperatur liegt bei 0.3 °C (siehe Abbildung 5).

So abgelegen der Nationalpark auch zu sein scheint, kann man trotzdem nicht von durch Menschen unbeeinflusster Wildnis sprechen. Vor der Gründung des Nationalparks ist das Gebiet zum Teil intensiv genutzt worden. Die Wälder waren zum Teil grossflächig geschlagen worden, um den Bedarf an Brennholz für die Erzgewinnung zu decken. Namen von Gebieten wie "Il Fuorn" (der Schmelzofen) sind Zeugen dieser Nutzung (Parolini, 2012). Im Gebiet von Champlönch (was langes Feld bedeutet) wurde von 1650 bis 1800 extensiv Holz für die Saline Hall in Österreich genutzt. Daneben wurde im Nationalpark Holz von der Bevölkerung genutzt, durch Tiere geweidet und Nischholzprodukte wie Nüsse und Harz gesammelt. Die Auswirkungen davon sind auch heute noch sichtbar. Der Nationalpark wurde 1914 durch Schweizer Naturschützer gegründet mit dem Ziel, einen Ort zu schaffen, in dem sich unberührte Wildnis entwickeln konnte. Trotz Schwierigkeiten mit der Bevölkerung der umliegenden Gemeinden kamen Verträge zustande.

Etwa ein Drittel des Nationalparks sind mit einer überwiegenden Mehrheit von 99.4% Nadelholz bewaldet. Die hauptsächlich vorkommenden Baumarten sind (Reihenfolge gemäss Häufigkeit) *Pinus mugo* (beinhaltet Berg- und Legföhre), *Larix decidua*, *Pinus cembra*, *Picea abies* und *Pinus sylvestris*. Die Bergföhre hat einen



Abbildung 4: Bergföhrenbestand im Schweizerischen Nationalpark

Anteil von 40% an der Waldfläche und kommt mit der Legföhre zusammen auf einen Anteil von 91%. Sie hat keine Probleme mit dem kargen Boden auf Dolomitgestein und wurde durch die Kahlschlagnutzung gefördert, weil sie eine Pionierbaumart ist (Haller et al., 2013).

Das Untersuchungsgebiet (Abbildungen 6 und 7) liegt am Südhang nahe der Ofenpassstrasse in Champlönch. Es befindet auf einer Höhe von 1940 bis 1952 m ü.M. Der Teil des Nationalparkes, in dem sich das Untersuchungsgebiet befindet, liegt auf Hauptdolomit (Haller et al., 2013).

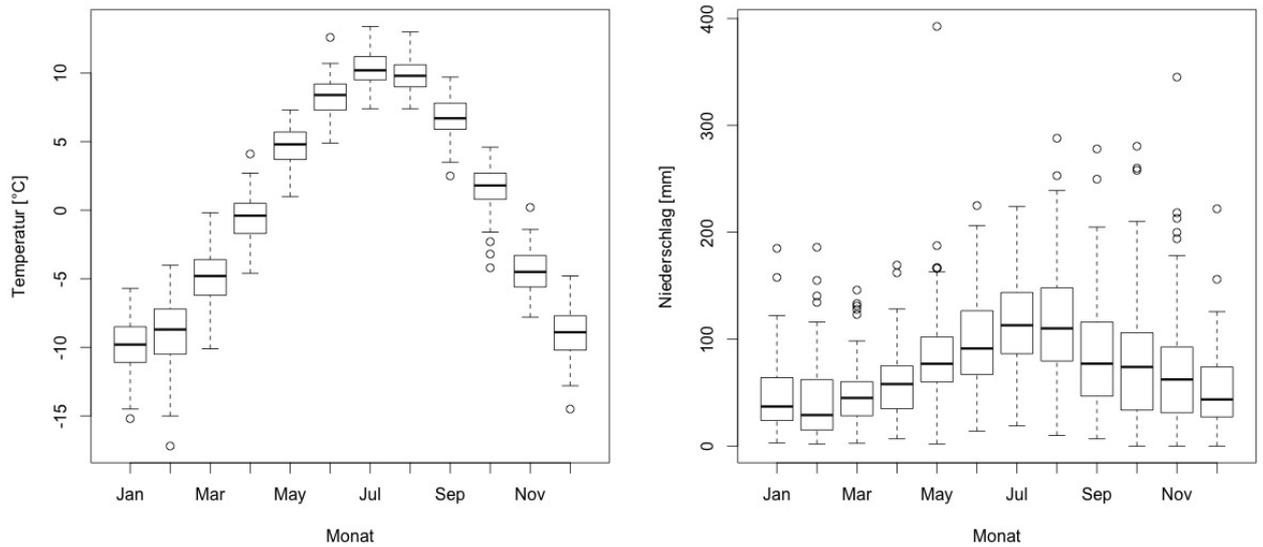


Abbildung 5: Klimadaten der Jahre 1917-2013 der Klimastation Buffalora (auf 1968 m ü.M., CH Koordiaten: 2°816'494 / 1°170'225)

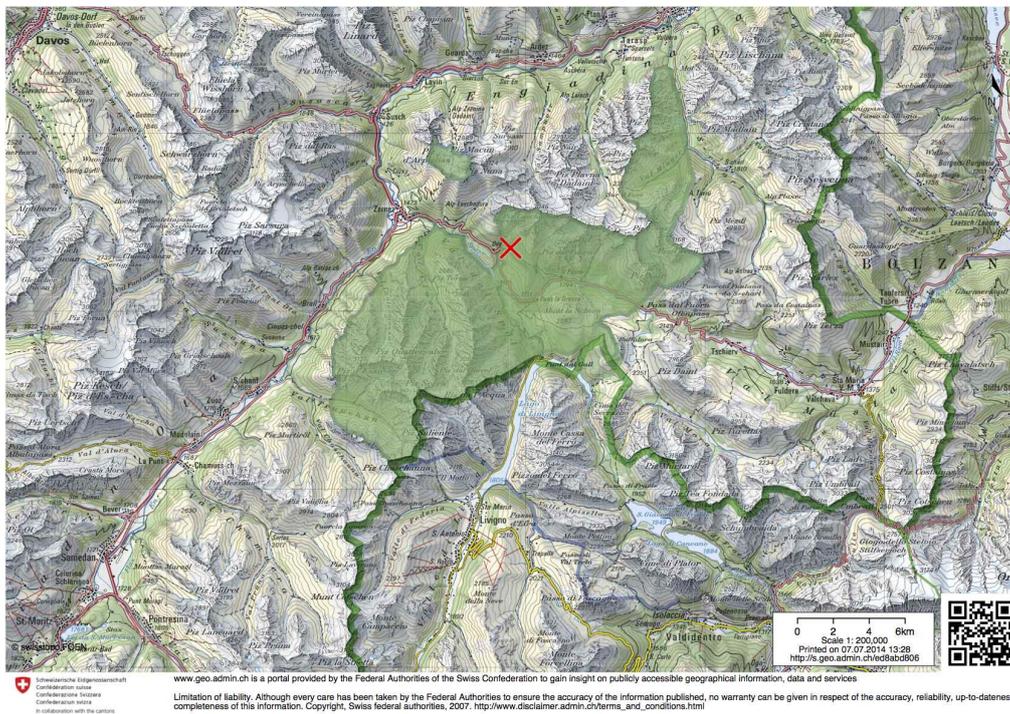


Abbildung 6: Schweizerischer Nationalpark (grünes Polygon) mit gekennzeichnetem Untersuchungsgebiet (rotes Kreuz). Quelle: map.geo.admin.ch, aufgerufen am 7.7.14

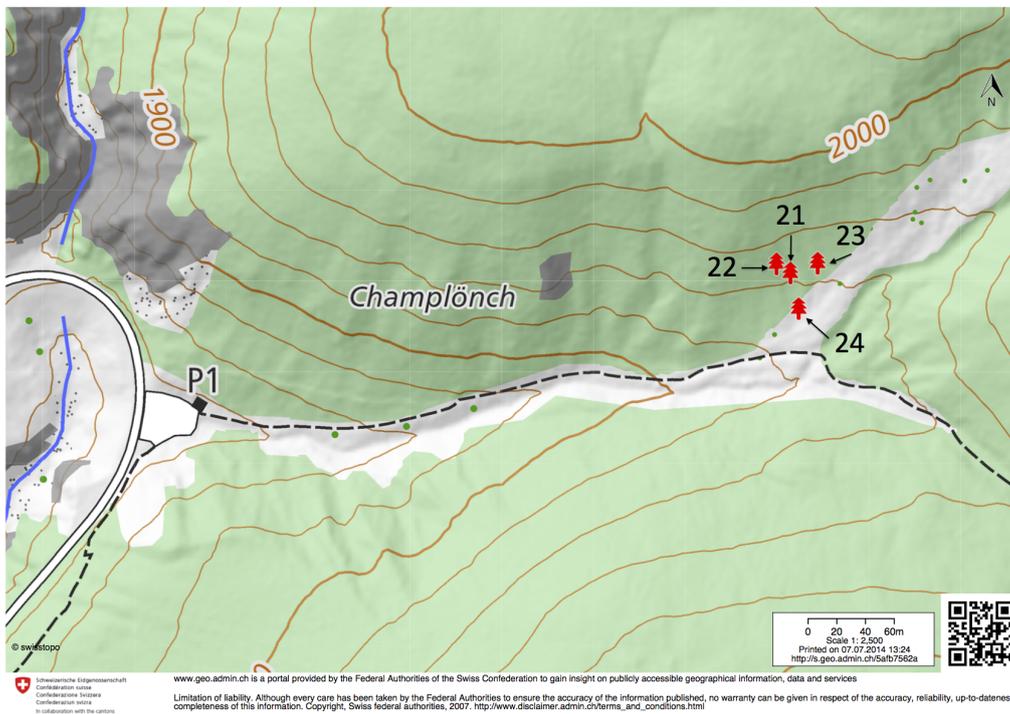


Abbildung 7: Untersuchungsgebiet mit den 4 untersuchten Bäumen in rot. Quelle: map.geo.admin.ch, aufgerufen am 7.7.14

4.3 Probenentnahme

Es wurden 4 tote, adulte Bergföhren im Gebiet von Champlönch ausgewählt. Tabelle 1 beschreibt die untersuchten Bäume. Die Bäume wurden zuerst gefällt und gleich darauf wurden je 3 Stammscheiben aus 3 verschiedenen Höhen genommen (Abbildungen 8(a) und 8(b)). Für diese Arbeit wurden jedoch nur die Stammscheiben auf Brusthöhe (1.30 m) verwendet. Die Stammscheiben wurden am selben Tag nach Zürich transportiert und im Jahrringlabor der ETH Zürich trocken gelagert. Weil die Scheiben zu dick waren, um sofort mit der Holzentnahme von den einzelnen Jahrringen fortzufahren, wurden sie von einer Dicke von ca. 5 cm auf ca. 2 cm gebracht und pro Scheibe drei Keile ausgesägt. Die Keile wurden mit einer Körnung von 60, 180, 320, 400 und 600 geschliffen (Abbildung 9(a)). Die Scheiben wurden nach der Nummer des Baumes und der Höhe bezeichnet, aus der sie entnommen wurden (z.B. 22/130 für eine Scheibe von Baum 22 aus der Höhe 1.3 m). Im Labor im Paul Scherrer Institut (PSI) wurde mit Hilfe eines Binokulars (Wild Heerbrugg) und eines Skalpells das Holz einzelner Jahrringe abgeschabt. Es wurde dazu jeweils nur ein Keil jeder Scheibe verwendet, weil nicht alle Keile derselben Scheibe die gleiche Anzahl Jahrringe aufwiesen und das Interesse vor allem bei den letzten Jahrringen lag. Bei drei Keilen war zuletzt Spätholz gebildet worden und bei einem (22/130) wurde als letztes Frühholz gebildet. So wurden bei drei Scheiben jeweils das äusserste Spätholz, Frühholz und das nächste Spätholz und bei 22/130 das Früh-, Spät- und wieder Frühholz entnommen (Abbildung 9(b)). Das Spätholz ist besser geeignet, um das in der Atmosphäre vorkommende Isotopenverhältnis zur Zeit der Bildung des Jahrringes aufzuzeigen, da für die Bildung des Frühholzes Vorräte des vorherigen Jahres verwendet werden können (McCarroll und Loader, 2004).

Tabelle 1: Die vier untersuchten Bäume

Baum #	Höhenlage [m.ü.M]	Koordinaten (CH1903+/LV95)
21	1948	2'809'128.9 / 1'173'557.4
22	1957	2'809'119.2 / 1'173'563.9
23	1952	2'809'147.9 / 1'173'564.5
24	1940	2'809'134.7 / 1'173'532.6

4.4 Datierung

Um mehr Informationen über die untersuchten Bäume zu erhalten wurde eine Analyse der Jahrringbreiten durchgeführt. Im Jahrringlabor der ETH Zürich wurden für die drei Radien der Holzscheiben aus 1.3 m der vier Bäume die Jahrringbreiten gemessen. Dafür wurde ein Lintab-5 Messtisch der Firma RINNTECH mit einem Leica MZ6 Stereomikroskop mit maximal 40-facher Vergrößerung verwendet (Abbildung 10). Die Jahrringgrenzen der Holzstücke wurden mit dem Fadenkreuz des Stereomikroskopes anvisiert und der Messtisch durch eine Kurbel bewegt, bis durch das Fadenkreuz die nächste Jahrringgrenze anvisiert werden konnte. Durch Klicken mit der Maus wurden dem an den Messtisch angeschlossenen Computer die Jahrringgrenzen angegeben. Aus der Bewegung der Kurbel konnte dann die Entfernung von einer Jahrringgrenze zur nächsten berechnet werden. Durch eine manuelle Ausrichtung des zu untersuchenden Holzstückes konnte sichergestellt werden, dass die



(a) Die vier Bäume wurden gefällt..



(b) ... und Scheiben aus 1.3m entnommen

Abbildung 8: Probenentnahme, Fotos (a) und (b) von Christof Bigler



(a) Die Holzstücke wurden geschliffen...



(b) ...und anschliessend die Holzproben mit dem Skalpell entnommen

Abbildung 9: Verarbeitung der Proben

senkrechte Distanz zwischen den Jahringgrenzen gemessen wurde. Die verwendete Software heisst TSAP-Win und ist ebenfalls von der Firma RINNTECH. Vor den Messungen wurden die Jahringe jedes Holzstückes von Hand gezählt und alle 10, 50 und 100 Jahre mit einem Bleistift Markierungen angebracht. Gezählt und gemessen wurde vom Kern aus in Richtung Borke. Die Datierung erfolgte wiederum

mit der TSAP-Win Software, deren Kreuzdatierungsergebnisse mit denen der Software COFECHA verglichen wurden. COFECHA ist eine textbasierende Software, die 1982 von Richard L. Holmes entwickelt wurde und immer noch grosse Verwendung in der Dendrochronologie findet (Grissino-Mayer, 2001). Das Ergebnis wurde auch optisch überprüft, bevor es als zuverlässig erachtet wurde. Als Masterchronologie wurden Messungen aus dem Nationalpark von Bigler und Rigling (2013) verwendet. Das Prinzip hinter der Datierung heisst Kreuzdatierung. Die Kurvenverläufe der Jahrringbreiten von undatierten Proben werden mit datierten Kurven verglichen. Da Bäume in ähnlichen Gebieten gleich auf gewisse Umwelteinwirkungen reagieren (z.B. schmale Jahrringe in trockenen Jahren), lassen sich ähnliche Kurvenverläufe in gleichen Jahren beobachten. Die Kurven können übereinander gelegt und optisch verglichen werden. Mit den oben erwähnten Software können Kurven miteinander verglichen werden und Ähnlichkeiten quantifiziert werden (Speer, 2010; Schweingruber, 1988).

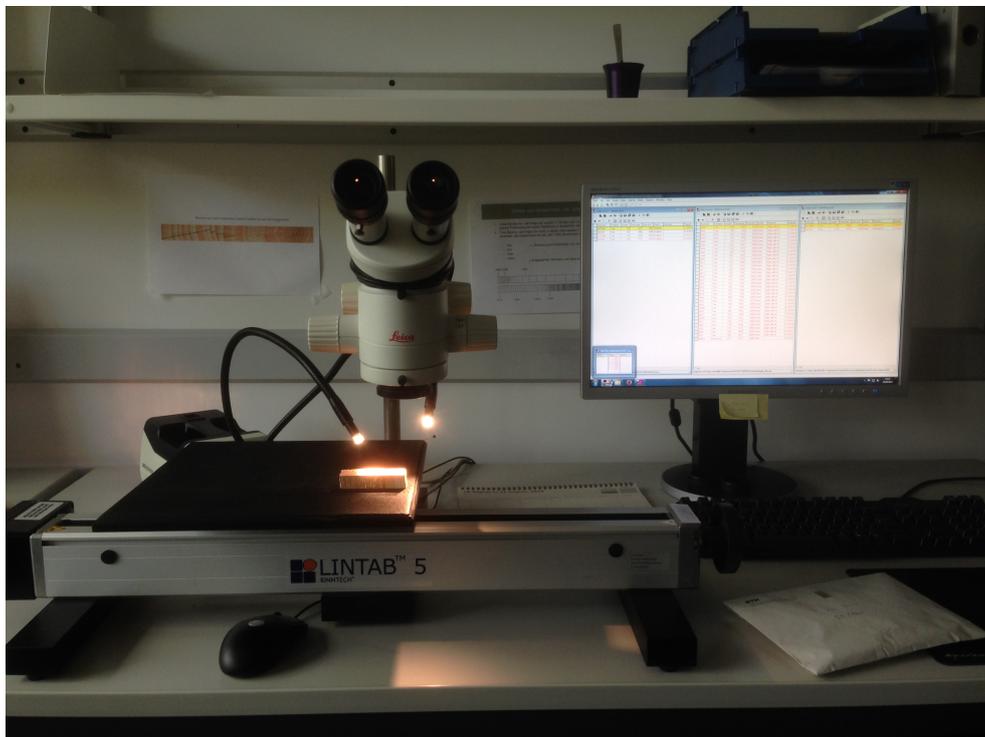


Abbildung 10: Lintab 5 Messtisch mit Stereomikroskop Leica MZ6

4.5 Vorbereitung der Proben

Für die Isotopenanalyse mit dem Massenspektrometer (IRMS, Isotope-ratio mass spectrometer) waren mehrere Vorbereitungsschritte nötig. In dieser Arbeit lag das Interesse in der Analyse des Zuckers und der organischen Säuren.

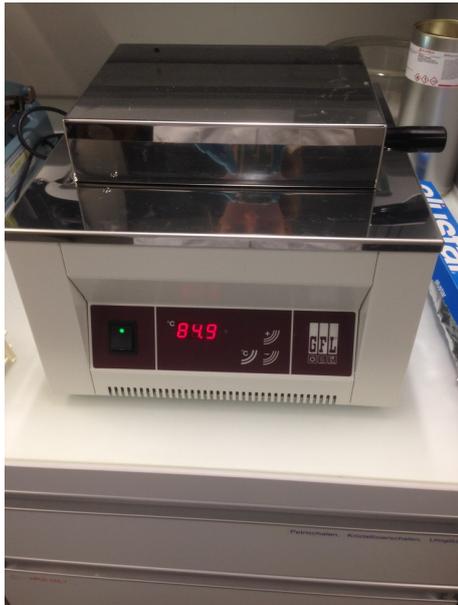
4.5.1 Zuckereextraktion

Die Zuckereextraktion und -reinigung wurde leicht abgeändert nach Rinne et al. (2012) durchgeführt und die Extraktion der organischen Säuren nach Wanek et al. (2001), abgeändert durch Olga Churakova (Churakova et al., 2015). Das Holzmaterial wurde zuerst gemahlen und das so erhaltene Pulver in beschriftete Eppendorf Phiolen gegeben. Bei Probe 21/130LW war so wenig Material vorhanden, dass es mit einem Skalpell zerkleinert werden musste, um nicht zu viel Material durch die Mühle zu verlieren. Das exakte Gewicht wurde notiert. Dann wurden zu jeder Probe mit Holzpulver 1.5 ml Milli-Q Wasser beigegeben und ca. eine Minute mit dem Vortex gemischt. Die Proben wurden daraufhin 30 Minuten in einem Wasserbad bei 85 °C erwärmt (Abbildung 11(a)) und 30 Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt. Nach 2 Minuten zentrifugieren (Heraeus Multifuge X3R, Abbildung 11(b)) bei einer Geschwindigkeit von 12100 g bei 22 °C wurden die Proben eingefroren. Der Überstand konnte am nächsten Tag nach dem Auftauen abpipettiert werden.

4.5.2 Reinigung der Zucker und Extraktion der organischen Säuren

Der aus der Zuckereextraktion gewonnene Überstand musste als Nächstes von ungewollten Stoffen gereinigt werden. Dazu wurde ein Aufbau aus verschiedenen filternden Kartuschen (OnGuard II, Dionex) eingesetzt, wie es in Abbildung 11(c) ersichtlich ist. Zuerst wurde eine Spritze mit einer Kapazität von 5 ml aufgesteckt. Als Nächstes kam eine Kartusche, um die Aminosäuren zu entfernen (in der Abbildung 11(c) schwarz) und danach eine Kartusche, um organische Säuren zu entfernen (gelb). Mit der Dritten Kartusche wurden schliesslich Phenolverbindungen herausgefiltert (weisse Kartusche). Zunächst mussten die Kartuschen aktiviert werden. Dazu wurden 5 ml Milli-Q Wasser in die Spritze zuoberst gegeben und gewartet, bis es die Kartuschen durchlaufen hat. Dann wurden 6 mal 5 ml Milli-Q Wasser durchgelassen (insgesamt 30 ml). Dafür wurde eine Eppendorf Pipette verwendet und der Pipettieraufsatz vor jedem Pipettieren zweimal in Milli-Q Wasser gespült. Für jede Probe wurde ein neuer Aufsatz verwendet. Als das gesamte Wasser in der ersten Kartusche war, wurde 1 ml der vorher vorbereiteten Probe zugegeben. Wiederum wurde gewartet, bis diese ganz in der Kartusche war und dann das vorher gewogene Auffanggefäss unten bereitgestellt. Mit zweimal 1 ml und dann zweimal 2 ml Milli-Q Wasser wurde nachgespült und das Auffanggefäss verschlossen. Vor und nach der Befüllung wurden die Auffanggefässe gewogen. Die organischen Säuren wurden danach aus der mittleren Kartusche, welche die Säuren herausgefiltert hat, ausgespült. Dafür wurden 20 ml 1M HCl durchgelassen und in einem anderen Gefäss aufgefangen. Alle Gefässe wurden schliesslich bei -22 °C gelagert. Je 1.5 ml der Proben wurden am nächsten Tag für eine einfachere Handhabung in kleinere Eppendorf-Phiolen gegeben, welche im Tiefkühler aufbewahrt wurden, wenn sie gerade nicht benötigt wurden.

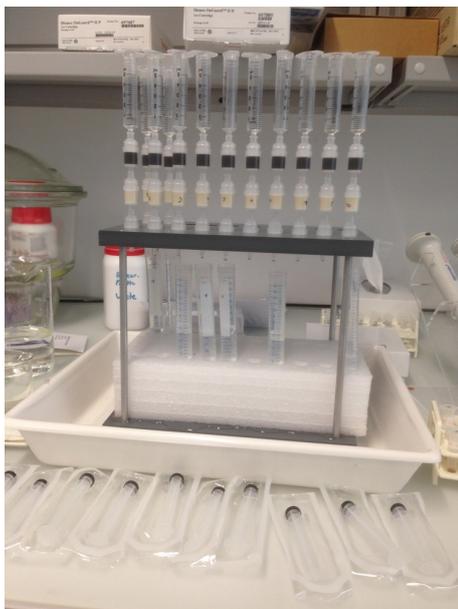
Jeweils 70 μ l der Proben wurden in vorher gewogene Zinnkapseln gegeben. Eine Paraffin-Folie wurde über den Behälter mit den Zinnkapseln gespannt und mit einer Nadel kleine Löcher hineingebohrt, damit das Wasser entweichen konnte, als die Kapseln tiefgefroren und unter Vakuum über Nacht bei ca. -53 °C gelagert wurden (Abbildung 11(d)). Nachdem so das Wasser entzogen wurde, wurden die Proben



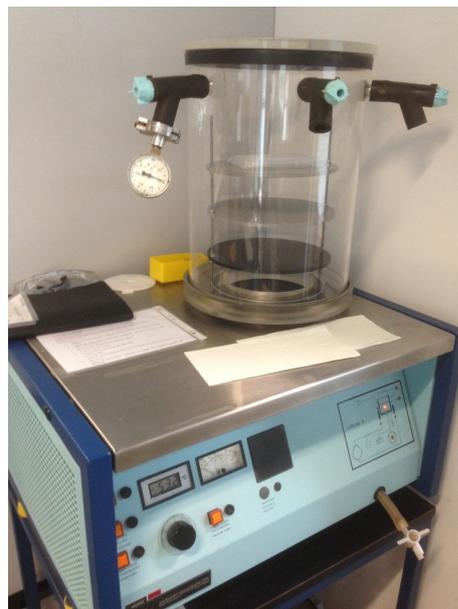
(a) Wasserbad zur Loslösung des Zuckers aus dem Holz



(b) Zentrifuge



(c) Zuckerreinigung mit filternden Kartuschen



(d) Vakuumierungsgerät

Abbildung 11: Verarbeitung der Proben

noch einmal gewogen. Dabei wurde festgestellt, dass die Menge der organischen Säuren mit ca. 1.5 mg zu hoch und die des Zuckers mit zum Teil Werten von ca. 0.002 mg zu tief für die Analyse im IRMS war. Bei einer Zuckerprobe war das Gewicht der Zinnkapsel nach Einfüllen und Vakuumieren sogar geringer als vorher. Darum wurden neue Kapseln gefüllt, dieses Mal mit 30 μl für die organischen Säuren und 140 μl für den Zucker. Mehr als 140 μl passen nicht in die verwendeten Zinnkapseln. Nach erneutem Gefrieren, Vakuumieren und Wägen war die Menge immer noch nicht optimal, es wurde jedoch trotzdem ein Versuch gestartet, sie im IRMS zu analysieren.

Für den Zucker wurde nach Erhalt der Resultate noch ein Versuch gestartet, dieses Mal mit 280 μl . Dazu wurden einmal 140 μl in die Kapsel gegeben, gefroren und über Nacht vakuumiert und am folgenden Tag noch einmal 140 μl der Probe in die gleiche Kapsel gegeben und noch einmal gefroren und vakuumiert. Die Werte haben sich dadurch ein wenig verbessert, es war auch keine negative Einwaage mehr vorhanden.

Die Zinnkapseln wurden nach dem Verschliessen in ein Gefäss mit nummerierten Vertiefungen gegeben, damit die äusserlich nicht unterscheidbaren Kapseln richtig identifiziert werden konnten. Es wurden nach einem im PSI verwendeten Protokoll Standards in ähnlicher Menge wie die Proben eingewogen (Waage mit Zinnkapseln und Standard auf Abbildung 12). Es wurde dazu ein hauseigener organischer Standard verwendet, der gegen IAEA (International Atomic Energy Agency) Standards aus Wien, Österreich kalibriert wurde. Die Standards, deren genaue Zusammensetzung bekannt ist, sind nötig, um die Werte später zu korrigieren. Es könnte immer etwas Asche von der vorhergehenden Probe vorhanden sein und systematische Fehler durch Massendiskriminierung des Massenspektrometers sind nicht zu vermeiden (Brunnée und Voshage, 1964).

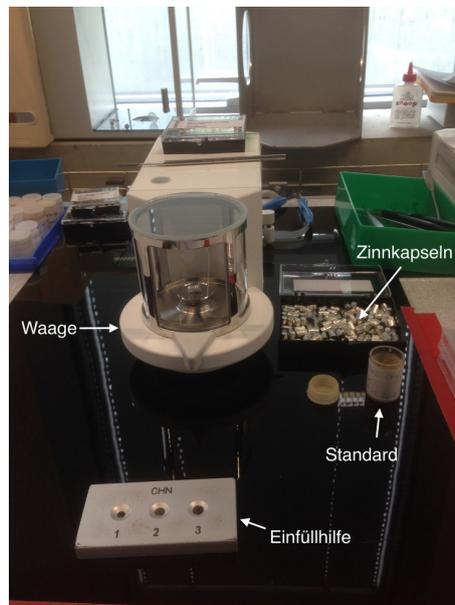


Abbildung 12: Waage (Mettler MT5) mit Zinnkapseln, Einfüllhilfe und Standard

4.6 Isotopenanalyse

Das verwendete IRMS Gerät war von Finnigan MAT aus Bremen, Deutschland mit einem EA-1110 Elementanalyser von Carlo Erba aus Mailand, Italien (Abbildungen 15 a und b). Die Zinnkapseln werden zusammen mit den Standards in den Autosampler des Massenspektrometers gegeben. Dieser rotiert und lässt die Kapseln einzeln in die Verbrennungsröhre fallen. Darin werden sie bei 1020 °C verbrannt. Pro Probe werden ca. 8 Minuten benötigt. Bei der Verbrennung entsteht CO_2 und H_2O , welches durch zwei Wasserfallen geleitet wird, da vor der Analyse jegliches Wasser entfernt werden sollte und nur CO_2 analysiert werden soll. Im Analysegerät wird

Helium zur Verdünnung zugeführt, da es sich inert zu den Proben verhält. Für die Zuckeranalyse wurde eine Verdünnung von 0.6 und für die Analyse der organischen Säuren eine Verdünnung von 1.2 gewählt. Nach der zweiten Probe wurde sie jedoch auf 0.7 festgelegt, da festgestellt wurde, dass die Einwaage von ca. 1 mg nicht richtig gewesen sein konnte. Die Verdünnung musste verringert werden, damit überhaupt ein Peak erkennbar wurde. An den IRMS angeschlossen ist ein Computer, der den IRMS steuert und die Messung live in der Software "Isodat 2" anzeigt. Abbildung 13 zeigt das Fenster der Software mit dem Peak des Referenzgases und dem kleineren Peak des Standards. Das Referenzgas ist CO_2 mit einer Reinheit von 99.998% und wird von Messer Austria GmbH hergestellt. Die Messergebnisse können aus Isodat direkt in ein Excel-File exportiert werden.

Die erhaltenen $\delta^{13}C$ Werte wurden mit dem Sollwert der Standards minus dem Durchschnitt der gemessenen Standards korrigiert. Der Korrekturwert für die Zuckerproben betrug 0.025 ‰. Die Standardabweichung der Standards bei der Zuckeranalyse betrug 0.0837 ‰ und die der organischen Säuren 0.23 ‰ und 0.153 ‰. Es gibt hier zwei Werte, weil die Heliumverdünnung zwischendurch gewechselt hatte. Es wurden auch zwei Korrekturwerte berechnet (-0.11 ‰ und 1.46 ‰). Die erste Probe wurde mit dem ersten Wert korrigiert, welcher aus den ersten drei Standards berechnet wurde und die restlichen Proben mit dem Korrekturwert der restlichen drei Standards.

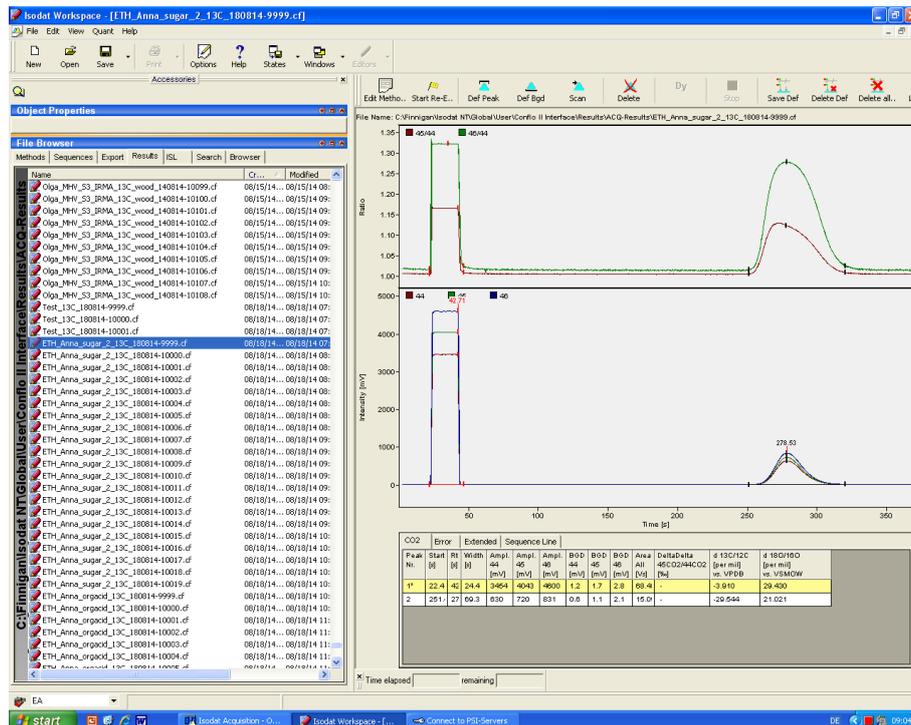


Abbildung 13: Fenster der "Isodat 2" Software mit Massenspektrum des Referenzgases und eines Standards

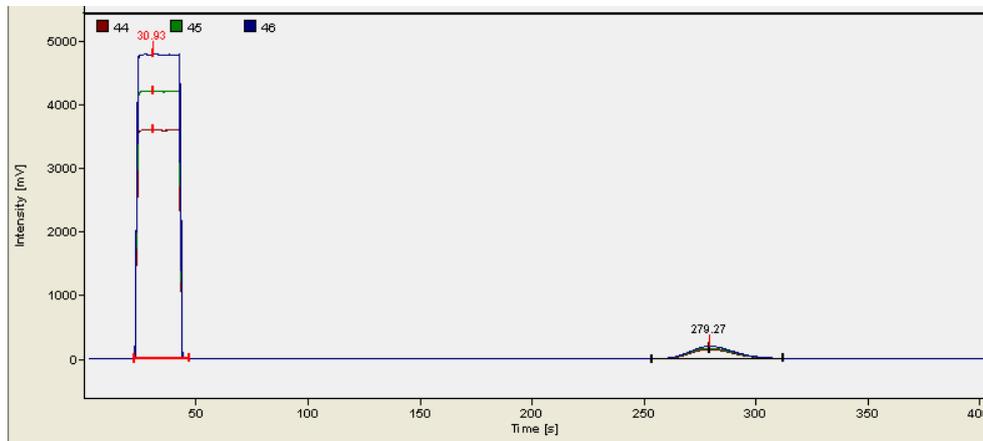


Abbildung 14: Massenspektrum des Referenzgases und einer Zuckerprobe (Isodat 2 Software)



(a) Verbrennung und Wasserentzug



(b) Analyse

Abbildung 15: Finnigan MAT IRMS mit EA-1110 Elementanalyser

5 Resultate

5.1 Datierung

Man kann bei allen Bäumen erkennen, dass die äussersten Jahrringe in unterschiedlichen Jahren gebildet wurden (Abbildungen 16 bis 19). Bäume 21, 22 und 23 zeigen seit ca. 1930 eine Abnahme der Jahrringbreiten, bei Baum 24 erfolgte eine Abnahme ab ca. 1970. Bäume 22 und 23 haben über eine längere Zeitperiode von ca. 40 Jahren sehr schmale Jahrringe gebildet. Der älteste gemessene Jahrring ist aus dem Jahr 1847 vom Baum 22 (Abbildung 17). Die meisten gebildeten Jahrringe weist eine Probe des Baumes 21 auf: 130 Jahrringe wurden hier gezählt (auf Abbildung 16 in Rot dargestellt). Die mittlere Jahrringbreite von Baum 21 ist ab ca. 1900 tiefer als die mittlere Jahrringbreite aller Bäume (Abbildung 20).

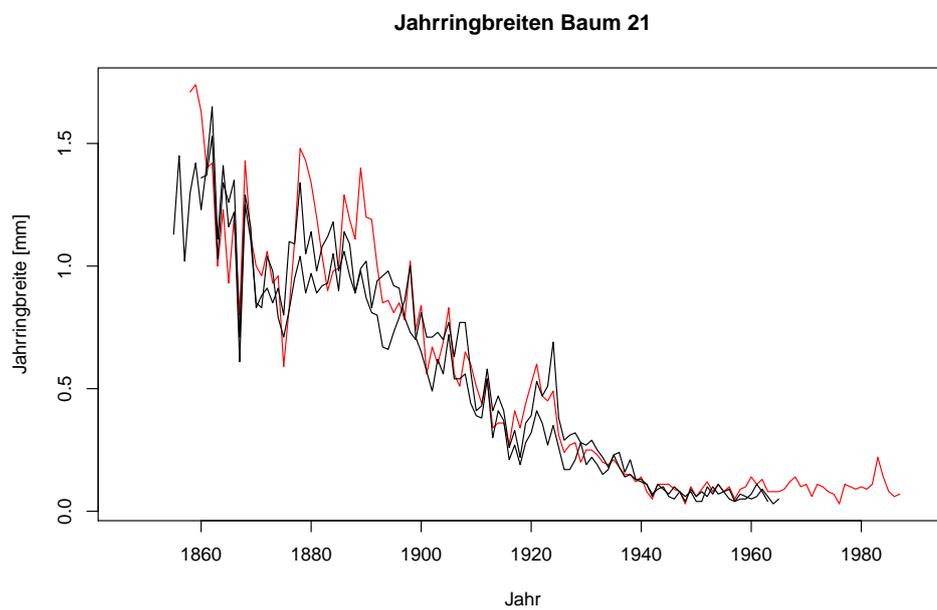


Abbildung 16: Jahrringbreiten der drei Proben aus Brusthöhe von Baum 21, in Rot der Radius, der für die Isotopenanalyse verwendet wurde

Jahrringbreiten Baum 22

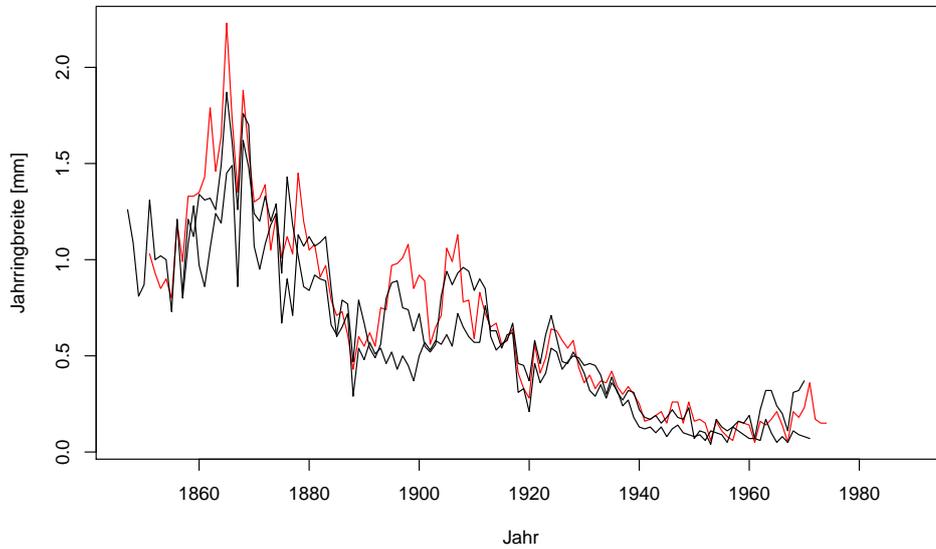


Abbildung 17: Jahrringbreiten der drei Proben aus Brusthöhe von Baum 22, in Rot der Radius, der für die Isotopenanalyse verwendet wurde

Jahrringbreiten Baum 23

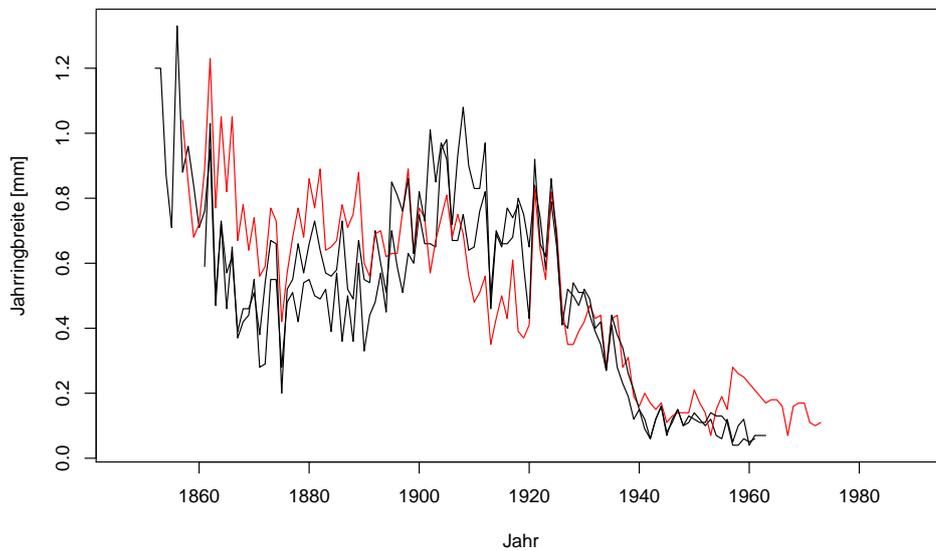


Abbildung 18: Jahrringbreiten der drei Proben aus Brusthöhe von Baum 23, in Rot der Radius, der für die Isotopenanalyse verwendet wurde

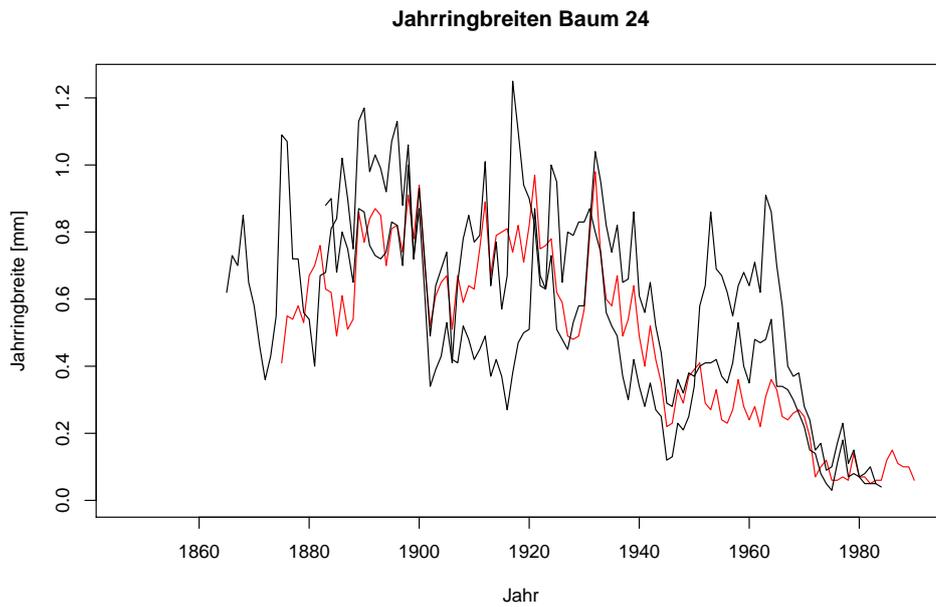


Abbildung 19: Jahrringbreiten der drei Proben aus Brusthöhe von Baum 24, in Rot der Radius, der für die Isotopenanalyse verwendet wurde

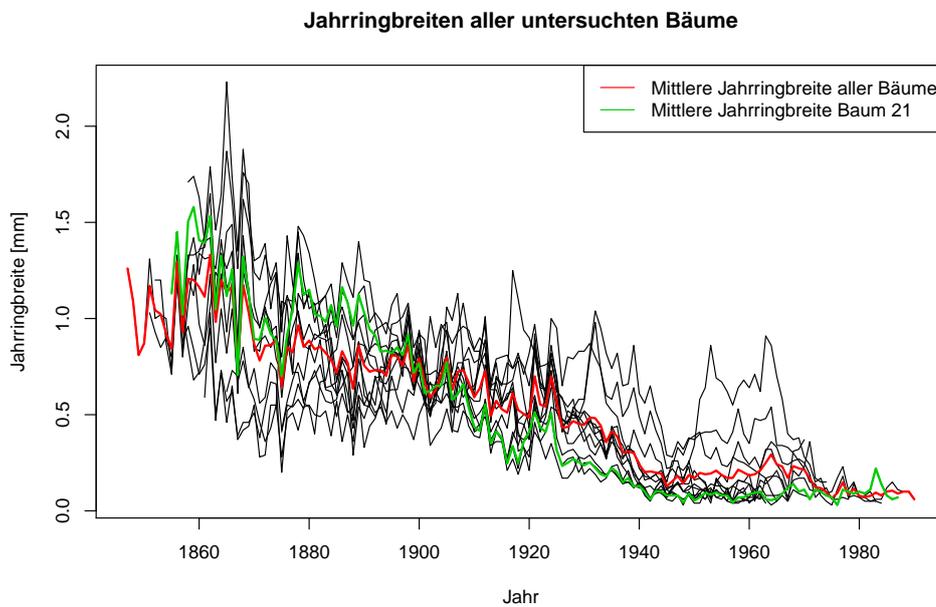


Abbildung 20: Jahrringbreiten aller Bäume mit der mittleren Jahrringbreite aller Bäume in Rot und der mittleren Jahrringbreite von Baum 21 in Grün

5.2 $\delta^{13}C$ von Zucker und organischen Säuren

Die $\delta^{13}C$ Werte der organischen Säuren liegen zwischen -29.47 und -30.46 ‰ (Abbildung 21). Bei Baum 21 und 24 ist das $\delta^{13}C$ vom Frühholz negativer als das vom Spätholz. Die am wenigsten negativen Werte sind bei Baum 21 zu finden. Bei Baum 21 und 24 sind jene des Frühholzes weniger negativ als die des Spätholzes. Baum 22 und 23 dagegen zeigen eine Zunahme des $\delta^{13}C$ gegen den äussersten Jahrring.

Die $\delta^{13}C$ Werte der Zuckerproben zeigen ein anderes Bild als die der organischen Säuren (Abbildungen 22 und 23). Wie man auf Abbildung 22 sieht, liegen die Werte zwischen -25.33 ‰ und -27.11 ‰. Alle $\delta^{13}C$ Werte von Zucker sind weniger negativ als jene von organischen Säuren. Dies wird auch aus Abbildung 23 ersichtlich. Die Zuckerproben von Baum 23 und 24 zeigen einen Anstieg des $\delta^{13}C$ gegen den äussersten Jahrring, wogegen Baum 22 eine Abnahme zeigt. Baum 21 ist der einzige, bei dem das Frühholz weniger negativ ist als das Spätholz. Auf Abbildung 23 sieht man, dass bei den organischen Säuren und dem Zucker das Spätholz im Schnitt negativer ist. Beim Vergleich von Früh- und Spätholz ist kein Muster erkennbar.

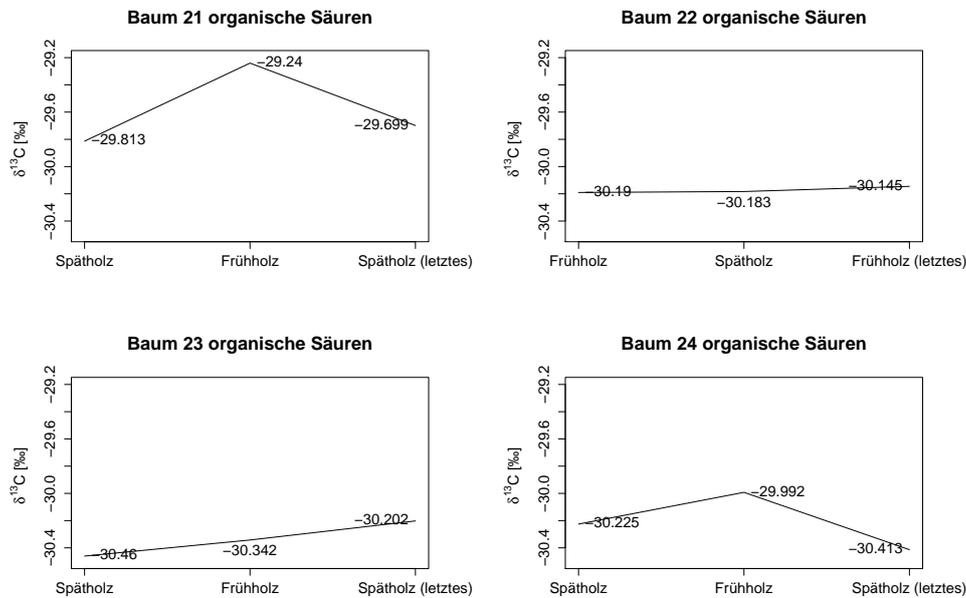


Abbildung 21: $\delta^{13}C$ Werte der organischen Säuren für die vier Bäume. Dabei gibt es bei Baum 22 zwei Frühholzproben, weil hier als letztes Frühholz gebildet wurde.

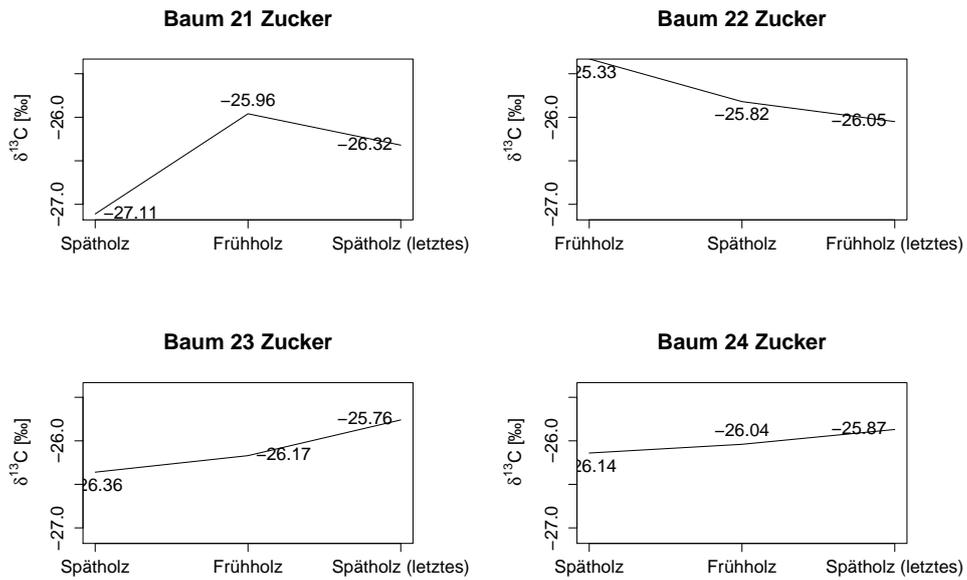


Abbildung 22: $\delta^{13}C$ Werte der Zuckerproben. Dabei gibt es bei Baum 22 zwei Frühholzproben, weil hier als letztes Frühholz gebildet wurde.

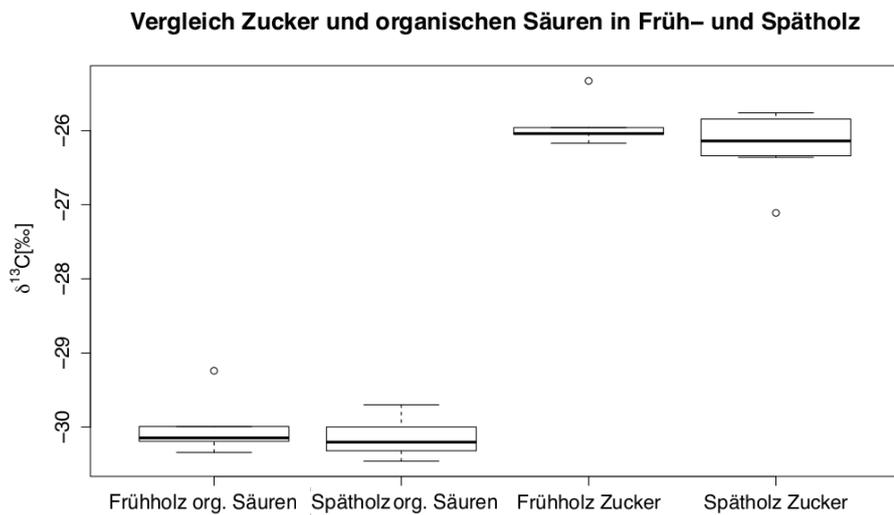


Abbildung 23: Vergleich der $\delta^{13}C$ Werte in Früh- und Spätholz zwischen Zucker und organischen Säuren

6 Diskussion

Eine Hürde bei der Arbeit mit toten Bäumen ist die Schwierigkeit, den Moment des Todes eines Baumes zu definieren. Ein Baum kann über Jahrzehnte hinweg am Sterben sein und unregelmässige Jahrringe bilden (Bigler und Rigling, 2013). Auf den Abbildungen 16 bis 19 kann man gut erkennen, dass bei allen Bäumen die drei gemessenen Radien zu unterschiedlichen Jahren den letzten Jahrring zeigen. Zwar wurde für die Isotopenanalyse das Holz von dem Holzkeil entnommen, der die spätesten Jahrringe gezeigt hat, jedoch ist nicht überprüft worden, ob ein anderer Teil der Holzscheibe noch spätere Jahrringe aufzeigte. Eine genaue Datierung der letzten Jahrringe, deren Holz untersucht wurde, war nicht möglich, da die Jahrringe zu schmal waren. Somit lassen sich die Werte aus der Isotopenanalyse weder einem bestimmten Jahr zuordnen, noch kann gesagt werden, dass die Werte den Zeitpunkt des Todes des Baumes reflektieren. Die Tatsache, dass die untersuchten Proben dieser Bachelorarbeit von jeweils unterschiedlichen Jahren stammen, verhindert auch, dass man gemeinsame Signale, wie zum Beispiel eine ähnliche Reaktion auf eine bestimmte Umweltbedingung, erkennen kann. McCarroll und Pawellek (1998) zeigen, dass die Variabilität unter verschiedenen Bäumen der selben Art, die unter den selben Bedingungen wachsen, so gross sein kann wie die Variabilität bei einem einzigen Baum. Dies macht einen direkten Vergleich schwierig, jedoch zeigen McCarroll und Pawellek (1998) in ihren Untersuchungen auf, dass auch wenn einzelne Bäume sehr unterschiedliche Werte haben, ein allgemeines Signal als Reaktion auf Umweltbedingungen sichtbar sein kann.

Die sehr engen Jahrringe von ca. 0.1 mm führten dazu, dass nur sehr wenig Material untersucht werden konnte. Die Mindestmenge an Material beträgt ca. 0.05 - 0.1 mg für den IRMS, der für diese Arbeit verwendet wurde (Lola Schmid, persönliche Kommunikation). In den für diese Bachelorarbeit durchgeführten Untersuchungen wurden jedoch auch Einwaagen von 0.003 mg verwendet. Das zeigt sich in den sehr kleinen Peaks in der Analyse (siehe Abbildung 14). Die geringen Einwaagen verhinderten, dass die CO_2 Menge im Holz berechnet werden konnte. Somit konnte der Einfluss von Zuckermangel als mögliche Mortalitätsursache nicht weiter untersucht werden.

Die in dieser Bachelorarbeit erhaltenen $\delta^{13}C$ Werte für Früh- und Spätholz unterscheiden sich nicht wesentlich (Abbildung 23). In der Literatur findet sich hierzu aber auch kein einheitliches Bild. Beispielsweise untersuchten Warren et al. (2001) und Wilson und Grinsted (1977) das $\delta^{13}C$ in Abhängigkeit von der Jahreszeit bei *Pinus radiata*. Auf Abbildung 24(a) kann man erkennen, dass Wilson und Grinsted (1977) für Spätholz deutlich tiefere $\delta^{13}C$ Werte erhalten haben als für Frühholz. Sie haben dabei *Pinus radiata* in Hamilton, New Zealand untersucht und zwischen Zellulose und Lignin unterschieden. Zu einem gegenteiligen Ergebnis sind Warren et al. (2001) bei der Untersuchung von *Pinus radiata* und *Pinus pinaster* im Südwesten Australiens gekommen. Auf Abbildung 24(b) sind ihre Resultate zu sehen. Es zeigt sich hier ein einheitlicher Trend bei verschiedenen Baumarten und verschiedenen Behandlungsmethoden (mit und ohne Dünger): Im Frühling gebildetes Holz hat ein deutlich tieferes $\delta^{13}C$ als Spätholz. De Micco et al. (2007) untersuchten ebenfalls

Pinus pinaster in der Toskana in Italien und kamen zu einem ähnlichen Ergebnis wie Wilson und Grinstead (1977) mit tieferen $\delta^{13}C$ Werten im Spätholz. Sie führen diese widersprüchlich erscheinenden Ergebnisse von verschiedenen Studien zu $\delta^{13}C$ in Früh- und Spätholz darauf zurück, dass die saisonale Variabilität abhängig ist von lokalen Umweltbedingungen. In dieser Bachelorarbeit liess sich kein allgemeiner Trend feststellen. Dies könnte allerdings einerseits auf die kleine Probenanzahl zurückzuführen sein, andererseits aber ist auch die Auftrennung des Früh- und Spätholzes bei solch dünnen Jahrringen mit dem Skalpell sehr schwierig. Das $\delta^{13}C$ der organischen Säuren ist bei Baum 21 und 24 im Frühholz höher als im Spätholz, bei den Zuckerproben zeigt Baum 21 diesen Trend. Dies könnte auf einen Wechsel der Kohlenstoffquelle deuten. Im Frühling werden Reserven aus dem letzten Jahr verwendet, im Herbst dagegen im selben Jahr gebildete Kohlenhydrate (Voronin et al., 2012).

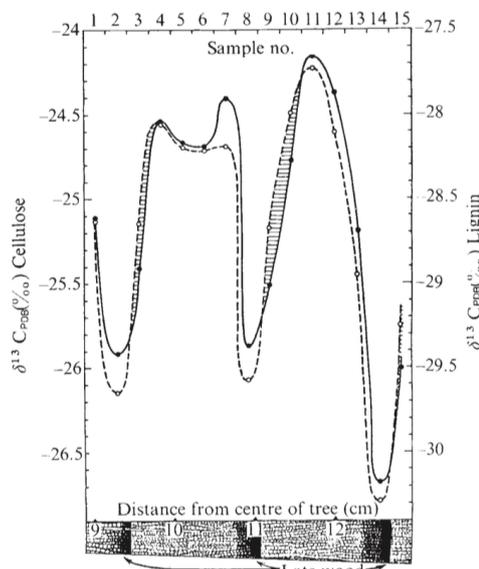


Fig. 2 Variations in the isotopic ratio of carbon across tree rings from *Pinus radiata*—a comparison between cellulose (—) and lignin (---).

(a) Untersuchung des $\delta^{13}C$ von *Pinus radiata* über mehrere Jahre (Wilson und Grinstead, 1977)

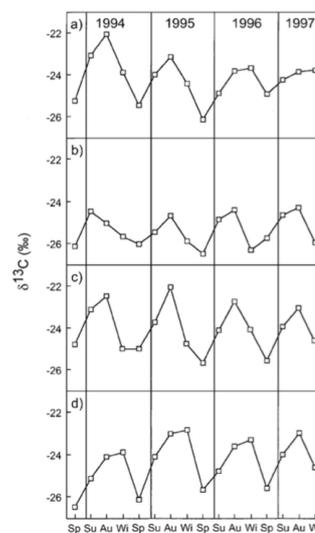


Fig. 5 The seasonal course of stemwood $\delta^{13}C$ (‰) in a *P. radiata* 750 stems ha^{-1} plus fertilizer, b *P. pinaster* 750 stems ha^{-1} plus fertilizer, c *P. pinaster* 250 stems ha^{-1} plus fertilizer, and d *P. pinaster* 250 stems ha^{-1} minus fertilizer. Results are means; $n=5$; 1 SE was $<0.7\%$ in all cases. Sp Spring, Su summer, Au autumn, Wi winter

(b) Untersuchung von $\delta^{13}C$ bei *Pinus radiata* und *Pinus pinaster* über mehrere Jahre (Warren et al., 2001)

Abbildung 24: Vergleich von $\delta^{13}C$ Werten für Früh- und Spätholz in zwei verschiedenen Studien

Ein Vergleich der erhaltenen $\delta^{13}C$ Werte für Zucker mit Messungen von lebenden Bergföhren (Abbildung 25) zeigt, dass die der lebenden Bäume stärker variieren. Es finden sich Werte zwischen -22.86% und -38.96% , während bei den toten Bäumen Werte zwischen -25.33 und -27.11% erhalten wurden.

Untersuchungen an Mais, Kartoffeln und Zuckerrüben haben gezeigt, dass Speicherorgane verglichen mit Blättern ein erhöhtes $\delta^{13}C$ aufweisen (Gleixner et al., 1993). Ein verringertes $\delta^{13}C$ im Speicherorgan Holz könnte darauf zurückzuführen sein, dass gespeicherte Stärke für Wachstum mobilisiert wird. Unter schlechten Bedingungen, wenn wenig Photosynthese betrieben werden kann, muss ein Baum von

den gespeicherten Kohlenstoffen zehren und könnte schlussendlich verhungern. Da sowohl Trockenheit und Hungern ein verringertes $\delta^{13}C$ in Holz verursachen können, ist eine Unterscheidung der Mortalitätsursache schwierig. Da nicht bekannt ist, aus welchem Jahr die in dieser Bachelorarbeit untersuchten $\delta^{13}C$ Werte sind, können die Werte nicht als Folge von Klima interpretiert werden.

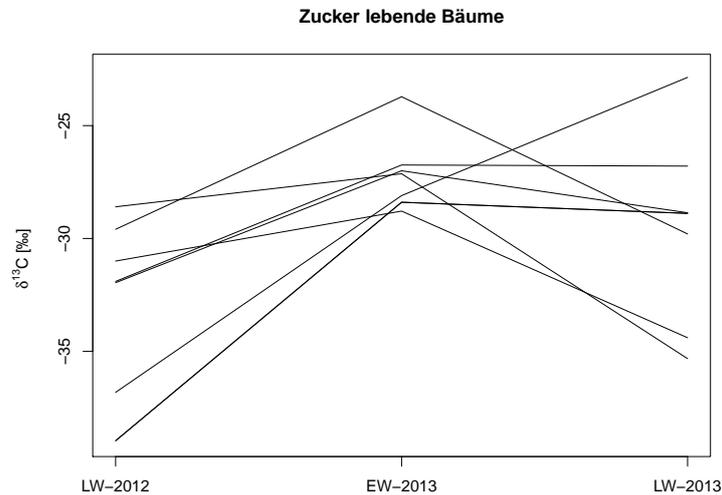


Abbildung 25: $\delta^{13}C$ Werte von Zucker von lebenden Bäumen, aus Churakova et al. (2015). Dabei steht LW für Spätholz und EW für Frühholz

Ein Vergleich der erhaltenen $\delta^{13}C$ Werte für Zucker mit Standards von verschiedenen Zuckerarten aus Rinne et al. (2012) (Abbildung 26) zeigt, dass die Werte sich in einem Bereich befinden, der darauf hindeutet, dass der Zucker vor allem aus Saccharose und Mannose besteht. Eine Analyse mit Hochleistungsflüssigkeitschromatographie könnte diese Vermutung bestätigen. Saccharose ist die hauptsächliche Quelle von Kohlenstoff für die Synthese von Biomasse (Voronin et al., 2012).

Es gibt bisher wenige Studien die sich mit den Kohlenstoffisotopen von organischen Säuren befasst haben und noch weniger Untersuchungen von organischen Säuren in Bäumen. Mangels anderen Daten wurden Krautpflanzen zum Vergleich betrachtet, die Vergleichbarkeit ist jedoch kritisch zu bewerten. Die gefundenen $\delta^{13}C$ Werte der organischen Säuren liegen im selben Rahmen wie Werte von Untersuchungen von Kartoffelblättern (Marco Lehmann, persönliche Kommunikation). In seiner Arbeit hat er Werte von ca. -18 bis -26 ‰ als Indikatoren für feuchte Bedingungen und Werte von ca. -26 bis -34 ‰ für trockene Bedingungen identifiziert. Die in dieser Arbeit gefundenen Werte von ca. -29 bis -30.5 ‰ würden sich demnach mit der Tatsache decken, dass die untersuchten Bäume in einem eher trockenen Gebiet gewachsen sind (Niederschlag ca. 800mm im Jahr).

Deutlich weniger negative $\delta^{13}C$ Werte wurden bei Untersuchungen von organischen Säuren von Wiesenpflanzen in Deutschland gefunden (Hettmann et al., 2008). Für Äpfelsäure wurden im Herbst Werte zwischen - 21.2 ‰ und - 28.7 ‰ gefunden.

Table 1. The laboratory carbohydrate standards used for the identification of compounds in the needle extracts and the $\delta^{13}\text{C}$ values measured for standards and needle extracts using EA/IRMS and HPLC/IRMS. The manufacturers of the standards are indicated

Compound (in the order of retention time)	Standard			Needle extract
	EA/IRMS $\delta^{13}\text{C}$ (‰)	HPLC/IRMS $\delta^{13}\text{C}$ (‰)	Offset (‰)	HPLC/IRMS $\delta^{13}\text{C}$ (‰)
1. Pinitol ^a	-32.39 ± 0.03 (n=5)	-34.07 ± 0.13 (n=27)	1.68 ± 0.13	-31.51 ± 0.15 (n=27)
1. <i>myo</i> -Inositol ^b				
3. Sorbitol ^b				
4. Fucose ^b	-22.84 ± 0.03 (n=5)			
5. Sucrose ^c	-25.34 ± 0.06 (n=5)	-26.70 ± 0.16 (n=44)	1.36 ± 0.17	-28.44 ± 0.16 (n=28)
6. Galactose ^d	-24.04 ± 0.04 (n=5)			
7. Glucose ^b	-11.27 ± 0.05 (n=5)	-11.64 ± 0.22 (n=44)	0.37 ± 0.23	-28.50 ± 0.17 (n=28)
8. Xylose ^c				
9. Mannose ^d	-26.70 ± 0.06 (n=5)			
10. Fructose ^d	-10.58 ± 0.09 (n=5)	-11.73 ± 0.33 (n=13)	1.15 ± 0.34	-27.72 ± 0.33 (n=13)
11. Raffinose ^d	-21.60 ± 0.04 (n=5)	-23.07 ± 0.06 (n=6)	1.47 ± 0.07	-27.409 (n=1)
12. Sorbose ^d				
13. Ribose ^c	-12.15 ± 0.07 (n=5)			

^aAldrich (St. Louis, MO, USA); ^bSigma (St. Louis, MO, USA); ^cMerck (Darmstadt, Germany); ^dFluka (Buchs, Switzerland).

Abbildung 26: $\delta^{13}\text{C}$ Werten von Zucker für Standards von verschiedenen Zuckerarten, aus Rinne et al. (2012)

Im Frühling lagen die Werte zwischen - 23.9 ‰ und - 27.2 ‰. Bei den Citronensäuren fanden sich Werte zwischen - 27.7 ‰ und - 24.3 ‰ im Herbst und - 26.0 ‰ und - 29.5 ‰ im Frühling. Allgemein wurden also im Herbst weniger negative $\delta^{13}\text{C}$ Werte festgestellt als im Frühling (Hettmann et al., 2008).

Die auffällig weniger negativen Werte der organischen Säuren von Baum 21 verglichen mit den drei anderen Bäumen könnten auf den Pilz zurückzuführen sein, mit dem der Baum befallen war (Abbildung 27). Beim Zucker lässt sich jedoch keine Abweichung im $\delta^{13}\text{C}$ beobachten. Der Pilz wurde von Ottmar Holdenrieder als Kiefern-Feuerschwamm *Phellinus pini* identifiziert. Im Verbreitungsatlas der Pilze der Schweiz taucht der Pilz insgesamt nur zwei mal auf, einmal im Kanton Basel und einmal im Kanton Waadt (Senn-Irlet, 2011). Es wäre sicher interessant herauszufinden ob dies ein Einzelfund war oder der Pilz im Schweizerischen Nationalpark weiter verbreitet ist und was die Folgen davon sind. Der Kiefer-Feuerschwamm verursacht eine sogenannte "Weisslochfäule", wobei das Holz nur fleckenweise abgebaut wird und ein spezielles Muster mit weissen Löchern aufzeigt, wie es auf der Abbildung 27 zu sehen ist. Dabei wird sowohl Zellulose als auch Lignin abgebaut, die Stabilität des Baumes bleibt aber lange erhalten. Die Pilzsporen dringen über Astwundstellen ein. Eine Fruchtkörperbildung erfolgt 10 bis 20 Jahre nach dem Befall vor allem an Aststellen. Der Kiefer-Feuerschwamm ist nicht auf Pinus Arten beschränkt, er kann auch Fichte, Lärche und Douglasie befallen (Hartig, 1900). Gleixner et al. (1993) haben $\delta^{13}\text{C}$ in von verschiedenen Basidiomyceten befallenen Holz untersucht und sind zu dem Ergebnis gekommen, dass von Weissfäule befallenes Holz einen erhöhten $\delta^{13}\text{C}$ Wert gegenüber unbefallenem Holz hat. Dazu haben sie Holzproben gesammelt, die von unterschiedlichen Fäulen befallen waren. Bei Braunfäule wird nur Zellulose abgebaut, bei Weissfäule hingegen auch Lignin. Das Holz wurde in infizierte und nicht-infizierte Proben getrennt, getrocknet und gemahlen und das $\delta^{13}\text{C}$ mit Massenspektrometrie ermittelt. Dabei wurde festgestellt, dass unabhängig von der Art der Fäule das Chitin der Pilze 1.5 bis 2 ‰ mehr ^{13}C aufwies wie die Zellulose im

Substrat. Für die Weissfäule zeigte befallenes Holz einen um 1.1 ‰ erhöhtes $\delta^{13}C$ auf gegenüber unbefallenen Holz (Gleixner et al., 1993). Die Beobachtung, dass zumindest das $\delta^{13}C$ der organischen Säuren von dem befallenen Baum 21 höher ist als die Werte der anderen Bäume, deckt sich mit den Erkenntnissen von Gleixner et al. (1993). Einen weiteren Hinweis auf Einflüsse durch den Pilz lässt Abbildung 20 erkennen. Man sieht, dass die mittlere Jahrringbreite von dem befallenen Baum ab ca. 1900 konstant unter dem Durchschnitt aller Bäume bleibt. Zwar ist hier die Anzahl der untersuchten Bäume nicht gross genug, um von einem signifikanten Effekt zu sprechen, aber der Pilz könnte diese Wachstumsreduktion erklären. Cherubini et al. (2002) haben den Effekt von Pilzen auf die Bildung von Jahrringen von Bergföhren im Schweizerischen Nationalpark untersucht. Es wurden Bohrkern für die Jahrringanalyse entnommen und Proben von Wurzeln, die danach inkubiert wurden, um festzustellen, von welchen Pilzen der Baum befallen war. Der Fokus lag auf *Heterobasidion annosum* und *Armillaria* spp. Es konnte festgestellt werden, dass die von *Armillaria* befallenen Bäume eine langsame Wachstumsreduktion aufwiesen, während 60% der von *Heterobasidion annosum* befallenen Bäume eine abrupte Wachstumsreduktion zeigten. Die Ergebnisse dieser Studie würden sich mit der Hypothese decken, dass der Baum 21 eine Wachstumsreduktion aufgrund des Pilzes aufwies, mit dem er befallen war. Es stellt sich hier die Frage, wann der Pilz in den Baum eingedrungen ist und ab wann er sich schädlich auf den Baum ausgewirkt hat.



Abbildung 27: Holzstück von Baum 21 mit Pilzbefall

7 Schlussfolgerung

Die stabilen Isotope ^{13}C und ^{12}C sind bei den toten Bergföhren von dem gewählten Standort schwierig zu analysieren, wenn man eine jährliche Auflösung anstrebt. Die Auftrennung der einzelnen Jahrringe ist schwierig von Hand durchzuführen und das erhaltene Holzmaterial kann unter der benötigten Mindestmenge für den IRMS liegen. Ausserdem lassen die schmalen Jahrringe, die nicht mehr gleichmässig um den ganzen Stamm gebildet werden, keine genaue Datierung der analysierten Jahre zu. Für Untersuchungen von Mortalitätsursachen könnte man eventuell mehrere Jahre gleichzeitig anschauen, um genügend Holzmaterial zu erhalten oder andere Methoden verwenden, um das Holz zu entnehmen. Mit genügend Holzmaterial könnte man auch Untersuchungen über den Zuckergehalt machen und somit Einflüsse von der

Zuckerkonzentration auf die Mortalität untersuchen. Die $\delta^{13}C$ Werte der organischen Säuren geben Hinweise darauf, dass die Bäume durch trockene Bedingungen beeinflusst worden sind. Zum Zusammenhang zwischen der Jahreszeit und dem $\delta^{13}C$ gibt es viele widersprüchliche Studien. Zwei der in dieser Arbeit untersuchte Bäume zeigen bei den organischen Säuren eine Verringerung des $\delta^{13}C$ im Spätholz, beim Zucker zeigte ein Baum diesen Trend. Dieser Trend könnte durch den Wechsel von Reserven zu diesjährigen Kohlenstoffen in der zweiten Hälfte der Vegetationsperiode zustande gekommen sein (Voronin et al., 2012).

Ein interessanter Fund dieser Bachelorarbeit ist mit Sicherheit das von *Phellinus pini* befallene Holzstück von Baum 21. Es wäre sicherlich spannend herauszufinden, wie weit der Pilz im Schweizerischen Nationalpark verbreitet ist und was er bewirkt. Für Untersuchungen des $\delta^{13}C$ wäre es zu empfehlen, von Pilzen befallene Bäume zu meiden, da sie das $\delta^{13}C$ beeinflussen können.

Der nächste Schritt könnte sein, die Isotopenverhältnisse der einzelnen Bestandteile des Zuckers und der organischen Säuren zu untersuchen. Dazu würde man mit HPLC (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) den Zucker und die organischen Säuren des Holzes in einzelne Bestandteile aufteilen und sie dann analysieren. Mit einem Verständnis für den Metabolismus der Pflanze könnte man aus der Menge, der Art von verschiedenen Zuckern und dem $\delta^{13}C$ versuchen, weitere Erkenntnisse über Mortalitätsprozesse zu gewinnen.

8 Dank

Diese Bachelorarbeit wurde durch viele Personen unterstützt. Besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Betreuerin Olga Churakova, die mich durch die Laborarbeit im PSI geführt und mir spannende Einblicke in die aktuelle Forschung ermöglicht hat. Christof Bigler möchte ich danken für die Hilfe beim Datieren im Jahrringlabor der ETH. Für die Möglichkeit der Benutzung des Labors im PSI möchte ich mich bei Rolf Siegwolf bedanken. Lola Schmid danke ich für die Hilfe bei der Probenverarbeitung und -messung und den vielen Erklärungen und Einblicken in die Laborarbeit und der Funktionsweise verschiedener Geräte. Ich danke auch Magdalena Nötzli für die Einführung in das Jahrringlabor der ETH, für alle Erklärungen und die Hilfe beim Datieren. Viel Dank gebührt auch Ruedi Haller vom Schweizerischen Nationalpark für die Ermöglichung der Probenentnahmen. Bei Jonas und Daniel Krucher, Tadeusz Szczesiak und Rebekka Wittwer bedanke ich mich für das Korrekturlesen. Zum Schluss möchte ich mich auch bei Ottmar Holdenrieder für die Identifizierung des Pilzes von Baum 21 und für die Informationen über die Auswirkungen des Pilzes bedanken.

Literatur

- Bender, M.M., 1968. Mass spectrometric studies of carbon 13 variations in corn and other grasses. *Radiocarbon* 10, 468–72.
- Bigler, C., Rigling, A., 2013. Precision and accuracy of tree-ring-based death dates of mountain pines in the swiss national park. *Trees* 27, 1703–1712.
- Brunnée, C., Voshage, H., 1964. Massenspektrometrie. Karl Thiemig KG, München.
- CH2011, 2011. Zusammenfassung Szenarien zur Klimaänderung in der Schweiz CH2011. C2SM, MeteoSwiss, ETH, NCCR Climate and OcCC.
- Cherubini, P., Fontana, G., Rigling, D., Dobbertin, M., Brang, P., Innes, J., 2002. Tree-life history prior to death: Two fungal root pathogens affect tree-ring growth differently. *Journal of Ecology* 90, 839–850.
- Churakova, O., Siegwolf, R., Saurer, M., Bryukhanova, M., Bigler, C., 2015. Why do mountain pine trees die off in the Swiss National Park. In preparation.
- Coplen, T., 1995. Discontinuance of SMOW and PDB. *Nature* 375, 285.
- De Micco, V., Saurer, M., Aronne, G., Tognetti, R., Cherubini, P., 2007. Variations of wood anatomy and $\delta^{13}C$ within-tree rings of coastal *Pinus pinaster* showing intra-annual density fluctuations. *IAWA Journal* 28, 61–74.
- Dietze, M.C., Sala, A., Carbone, M.S., Czimczik, C.I., Mantoosh, J.A., Richardson, A.D., Vargas, R., 2014. Nonstructural carbon in woody plants. *Annual Review of Plant Biology* 65, 667–687.
- Farquhar, G., O’Leary, M., Berry, J., 1982. On the relationship between carbon isotope discrimination and the intercellular carbon dioxide concentration in leaves. *Australian Journal of Plant Physiology* 9, 121–137.
- Gleixner, G., Danier, H.J., Werner, R., Schmidt, H.L., 1993. Correlations between the ^{13}C content of primary and secondary plant products in different cell compartments and that in decomposing basidiomycetes. *Plant Physiology* 102, 1287–1290.
- Grissino-Mayer, H.D., 2001. Evaluating crossdating accuracy: A manual and tutorial for the computer program COFECHA. *Tree-Ring Research* 57.
- Haller, H., Eisenhut, A., Haller, R. (Hrsg.), 2013. Atlas des Schweizerischen Nationalparks. Die ersten 100 Jahre. *Nat.park-Forsch. Schweiz* 99/1. Haupt Verlag, Bern.
- Hartig, R., 1900. Lehrbuch der Pflanzenkrankheiten: für Botaniker, Forstleute, Landwirthe und Gärtner. Julius Springer, Berlin.
- Hettmann, E., Gleixner, G., Juchelka, D., 2008. *irm-LC/MS: $\delta^{13}C$ Analysis of Organic Acids in Plants*. Thermo Fisher Scientific.
- Matyssek, R., Fromm, J., Rennenberg, H., Roloff, A., 2010. *Biologie der Bäume : von der Zelle zur globalen Ebene*. UTB ; 8450, Ulmer, Stuttgart.

- McCarroll, D., Loader, N., 2004. Stable isotopes in tree rings. *Quaternary Science Reviews* 23, 771–801.
- McCarroll, D., Pawellek, F., 1998. Stable carbon isotope ratios of latewood cellulose in *Pinus sylvestris* from northern Finland: Variability and signal-strength. *Holocene* 8, 675–684.
- Parolini, J., 2012. Vom Kahlschlag zum Naturreservat: Geschichte der Waldnutzung im Gebiet des Schweizerischen Nationalparks. Bern : Haupt.
- Piper, F., 2011. Drought induces opposite changes in the concentration of non-structural carbohydrates of two evergreen *Nothofagus* species of differential drought resistance. *Annals of Forest Science* 68, 415–424.
- R Core Team, 2014. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. URL: <http://www.R-project.org/>.
- Rinne, K.T., Saurer, M., Streit, K., Siegwolf, R.T.W., 2012. Evaluation of a liquid chromatography method for compound-specific $\delta^{13}\text{C}$ analysis of plant carbohydrates in alkaline media. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 26, 2173–2185.
- Ryan, P., Delhaize, E., Jones, D., 2001. Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. *Annual Review of Plant Biology* 52, 527–560.
- Schweingruber, F., 1988. *Tree Rings: Basics and Applications of Dendrochronology*. Reidel Publishing Company, Dordrecht.
- Schütt, P., Roloff, A., Weisgerber, H., Lang, U., Stimm, B., 2006. *Enzyklopädie der Holzgewächse : Handbuch und Atlas der Dendrologie*. Wiley-VCH, Weinheim.
- Senn-Irlet, B., 2011. *Verbreitungsatlas der Pilze der Schweiz*. WSL. URL: http://www.wsl.ch/dienstleistungen/inventare/pilze_flechten/swissfungi/verbreitungsatlas/index_DE.
- Simard, S., Giovannelli, A., Treydte, K., Traversi, M., King, G., Frank, D., Fonti, P., 2013. Intra-annual dynamics of non-structural carbohydrates in the cambium of mature conifer trees reflects radial growth demands. *Tree Physiology* 33, 913–923.
- Speer, J.H., 2010. *Fundamentals of Tree Ring Research*. The University of Arizona Press, Tucson.
- Voronin, V., Ivlev, A., Oskolkov, V., Boettger, T., 2012. Intra-seasonal dynamics in metabolic processes of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ and $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ in components of Scots pine twigs from southern Siberia interpreted with a conceptual framework based on the Carbon Metabolism Oscillatory Model. *BMC Plant Biology* 12.
- Wanek, W., Heintel, S., Richter, A., 2001. Preparation of starch and other carbon fractions from higher plant leaves for stable carbon isotope analysis. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 15, 1136–1140.

Warren, C., McGrath, J., Adams, M., 2001. Water availability and carbon isotope discrimination in conifers. *Oecologia* 127, 476–486.

Wilson, A., Grinsted, M., 1977. $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ in cellulose and lignin as palaeothermometers. *Nature* 265, 133–135.