

Technische Universität München
Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt
Department für Pflanzenwissenschaften
Lehrstuhl für Zierpflanzenbau

Biochemische Untersuchungen zur Flavonoidbiosynthese bei Rose und Kartoffel

Dipl. Biol. Univ. Jürgen M. Knott

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigten Dissertation.

Vorsitzender

Univ. Prof. Dr. Alfons Gierl

Prüfer der Dissertation

1. Univ. Prof. Dr. Gert Forkmann

2. Univ. Prof. Dr. Dieter Treutter

Die Dissertation wurde am 23.12.2003 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 10.3.2004 angenommen.

Biochemische Untersuchungen zur Flavonoidbiosynthese bei Rose und Kartoffel

Irinae dicatus

Litterarum radices amaras esse, fructus iucundiores
Cato

Jürgen M. Knott scripsit a.D. MMIII

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	1
I.1	Flavonoide	1
I.1.a	Vorkommen und Aufgaben der Flavonoide	1
I.1.b	Die Struktur der Flavonoide	3
I.1.c	Die Flavonoidbiosynthese	4
I.1.d	α -ketoglutaratabhängige Dioxygenasen	7
I.1.e	Dihydroflavonol 4-Reduktase und Flavanon 4-Reduktase	8
I.2	Prohexadion-Ca	9
I.2.a	Gesteigerte Resistenz bei Apfelbäumen durch Behandlung mit Prohexadion-Ca	9
I.2.b	Struktur und Anwendung von Prohexadion-Ca als Wachstumsregulator	9
I.2.c	Induktion eines neuen Flavonoidbiosyntheseweges durch Prohexadion-Ca	11
I.3	Die Rose	13
I.3.a	Rosenkrankheiten	15
I.3.b	Die Flavonoidbiosynthese bei der Rose	16
I.4	Die Kartoffel	16
I.4.a	Kartoffelkrankheiten	17
I.4.b	Die Flavonoidbiosynthese bei der Kartoffel	18
I.5	Zielsetzung der Arbeit	20
II.	Material und Methoden	20
II.1	Material	20
II.1.a	Technische Geräte	20
II.1.b	Verbrauchsmaterialien und molekularbiologische Kits	20
II.1.c	Chemikalien	21
II.1.d	Enzyme	23
II.1.e	Primer	23
II.1.f	Organismen	24
II.1.g	Plasmide	24
II.1.h	Puffer	25
II.1.i	Medien	26
II.2	Nachweis von Flavonoiden im Pflanzengewebe	27
II.2.a	Extraktion von Flavonoiden	27
II.2.b	Hydrolyse	27
II.3	Enzymologische Untersuchungen	28
II.3.a	Enzymaufarbeitung aus Pflanzengewebe	28
II.3.b	Herstellung radioaktiv markierter Substrate	28
II.3.c	Enzymtests	30
II.4	Dünnschichtchromatographie	34
II.4.a	Nachweis nichtradioaktiver Flavonoide	35
II.4.b	Nachweis radioaktiver Flavonoide	36
II.5	Photometrische Bestimmungen	36
II.5.a	Gesamtproteinbestimmung nach Bradford	36
II.5.b	Photometrische Mengenbestimmung von DNA	37
II.5.c	Photometrische Mengenbestimmung von RNA	37
II.6	Präparationen von DNA und RNA	37
II.6.a	Präparation von Plasmiden aus <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	37
II.6.b	Präparation genomischer DNA aus Kartoffeln	38
II.6.c	Präparation von Gesamt-RNA aus Kartoffelblättern	38

II.6.d	Reverse Transkription	38
II.7	Allgemeine molekularbiologische Techniken	39
II.7.a	Restriktionsverdau	39
II.7.b	DNA-Fällung	40
II.7.c	RNA-Fällung	40
II.7.d	PCR	40
II.7.e	Agarosegelelektrophorese	41
II.8	Pflanzenkultur	42
II.8.a	Gewächshaus- und Freilandkulturen	42
II.8.b	<i>in vitro</i> -Kultur von Kartoffeln	42
II.8.c	Behandlung mit Prohexadion-Ca	42
II.9	Transformationstechniken	43
II.9.a	Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	43
II.9.b	Transformation von Kartoffeln	44
II.9.c	Regeneration transgener Kartoffelpflanzen	45
II.10	Inokulationsversuche mit Sternrußtau	45
II.10.a	Kultur des Sternrußtaus	45
II.10.b	Herstellung der Inokulationslösung	46
II.10.c	Inokulation der Rosenblätter	46
II.10.d	Versuche mit Prohexadion-Ca	47
II.10.e	Auswertung	47
III.	Ergebnisse	48
III.1	Die Flavonoidbiosynthese in Laubblättern von Rosen	48
III.1.a	Nachweis der in den Laubblättern der Rose enthaltenen Flavonoide	48
III.1.b	Der Einfluß von Prohexadion-Ca auf das Flavonoidmuster und den Flavonoidgehalt bei Rosenlaubblättern	50
III.1.c	Nachweis der Enzyme der Flavonoidbiosynthese in Laubblättern von Rosen	53
III.1.d	Flavonoidbiosynthesewege in Laubblättern von Rosen	57
III.1.e	Enzymologische Ursachen für Abweichungen im Flavonoidmuster	57
III.2	Die Flavonoidbiosynthese in Blütenblättern verschiedener Rosensorten	61
III.2.a	Nachweis des Flavonoidmusters in den Blütenblättern	61
III.2.b	Der Einfluß von Prohexadion-Ca auf das Flavonoidmuster und den Flavonoidgehalt in Rosenblüten	65
III.2.c	Nachweis der Enzyme der Flavonoidbiosynthese in Blütenblättern von Rosen	66
III.3	Phytopathologische Untersuchungen bei Rosen mit Sternrußtau	69
III.4	Die Flavonoidbiosynthese bei der Kartoffel	71
III.4.a	Nachweis der in verschiedenen Kartoffelgeweben enthaltenen Flavonoide	71
III.4.b	Der Einfluß von Prohexadion-Ca auf Flavonoidmuster und Flavonoidgehalt bei Kartoffelpflanzen	74
III.4.c	Nachweis der Enzyme der Flavonoidbiosynthese in jungen Kartoffelblättern	76
III.4.d	Nachweis der Enzyme der Flavonoidbiosynthese in vollständig ausgebildeten Kartoffelblättern und im Sproß	81
III.4.e	Vergleich der Enzymaktivitäten von CHS und FHT bei Freiland- und Gewächshauspflanzen	84
III.4.f	Flavonoidbiosynthesewege in Kartoffelblättern	86
III.5	Transformation von Kartoffeln mit dem <i>Dfr-Gen</i> des Apfels	87
III.5.a	Herstellung und Transformation des Transformationskonstruktes	87
III.5.b	Nachweis der Expression des transformierten <i>Dfr</i> -Gens	88
III.5.c	Nachweis der Enzymaktivität der Apfel-DFR in transgenen Kartoffeln	88
III.6	Die Flavonoidbiosynthese in Laubblättern von Petunien	90
III.6.a	Nachweis des Flavonoidmusters in den Laubblättern der Petunie	91

III.6.b	Nachweis der Enzyme der Flavonoidbiosynthese in den Laubblättern von Petunien	92
III.6.c	Flavonoidbiosynthesewege in den Laubblättern von Petunien	96
IV.	Diskussion	98
IV.1	Das Flavonoidmuster in den Laubblättern	98
IV.2	Flavonoide als UV-B-Schutzpigmente	99
IV.2.a	Unterschiede im Flavonolgehalt bei Kartoffeln im Freiland und im Gewächshaus	99
IV.2.b	Flavonole als UV-B-Schutzpigmente	101
IV.2.c	Flavonoide als UV-B-Schutzpigmente in jungem Gewebe	102
IV.3	Die Flavonoidbiosynthese bei der Rose	102
IV.3.a	Die Enzymaktivitäten in den Laubblättern	102
IV.3.b	Abweichende Flavonoidmuster bei Rosenlaubblättern	104
IV.3.c	Die Enzymaktivitäten in den Blütenblättern	107
IV.3.d	Die Substratspezifität der DFR bei Rosen	109
IV.4	Die Flavonoidbiosynthese bei der Kartoffel	111
IV.5	Die Flavonoidbiosynthese in den Laubblättern von Petunien	113
IV.6	Die Bildung von 3-Deoxyflavonoiden bei der Behandlung mit Prohexadion-Ca	114
IV.6.a	DFR und FNR	115
IV.6.b	Der Einfluß von Prohexadion-Ca	117
IV.7	Phytopathologische Untersuchungen bei Rosen mit Sternrußtau	120
IV.8	Die Transformation von Kartoffeln mit dem <i>Dfr</i> -Gen des Apfels	123
IV.9	Ausblick	124
V.	Zusammenfassung	126
VI.	Summary	129
VII.	Literaturverzeichnis	132
VIII.	Abkürzungen	140

I. Einleitung

I.1 Flavonoide

I.1.a Vorkommen und Aufgaben der Flavonoide

Flavonoide sind pflanzliche Sekundärstoffe, die bei allen Gefäßpflanzen und auch bei einigen Moosen vorkommen, wobei in einer Pflanze Dutzende unterschiedliche Flavonoide vorhanden sein können (Forkmann und Heller, 1999). Als wasserlösliche Moleküle liegen die Flavonoide innerhalb der Pflanzenzelle in der Vakuole vor und sind in verschiedenen Pflanzengeweben wie Blättern, Blüten und auch Wurzeln nachgewiesen worden. Die Flavonoide erfüllen in den Pflanzen eine ganze Reihe unterschiedlicher Aufgaben.

Eine der für den Menschen auffälligsten Aufgaben der Flavonoide dürfte ihre Rolle als eines der wichtigsten und am weitesten verbreiteten Blütenpigmente sein. Vor allem die Anthocyane erzeugen dabei in den Blütenblättern einen Farbbereich von gelb über orange und rot bis hin zu blau. Aber auch für das menschliche Auge nicht sichtbare, jedoch für blütenbestäubende Insekten erkennbare, UV-Strahlung absorbierende Kopigmente wie Flavone und Flavonole, oder auch Chalkone und Aurone kommen in Blüten vor (Thompson et al., 1972; Harborne und Grayer, 1994).

In den Blättern, aber auch in anderen Pflanzengeweben, erfüllen die UV-B-Strahlung absorbierenden Flavonole und deren Derivate als Schutzpigmente vor schädlicher UV-B-Strahlung eine wichtige Aufgabe. Die Synthese dieser Schutzpigmente wird oftmals durch UV-B-Strahlung angeregt (Tevini et al., 1981). Da sich in der Epidermis Flavonole und deren Derivate anreichern (Hahlbrock und Scheel, 1989), kann die Epidermis bis zu 99 % der einfallenden UV-B-Strahlung absorbieren, wodurch das weiter innen liegende, photosynthetisch aktive Gewebe weitgehend geschützt werden kann (Robberecht und Caldwell, 1978). Vor allem beim Photosystem II, verschiedenen Enzymen und Membranen, sowie bei DNA und RNA sollen so Schäden durch die UV-B-Strahlung verhindert werden. Bei *in vitro*-Untersuchungen konnte die schützende Wirkung von Flavonoiden auf DNA gegen Schädigungen, die durch UV-B-Strahlung verursacht werden, nachgewiesen werden (Kootstra, 1994). Es wird angenommen, daß der Schutz von Pflanzengewebe vor UV-B-Strahlung eine der ersten Aufgaben der Flavonoide in der Evolution gewesen ist (Stafford, 1991).

Flavonoide wirken vielfach auch als Boten- und Signalstoffe. Bei der Symbiose von Leguminosen mit Knöllchenbakterien zur Fixierung von Stickstoff werden zum Beispiel durch Flavone, die die Pflanze bildet und ausscheidet, die Nodulationsgene der Bakterien aktiviert (Peters et al., 1986). Auch zwischen Pflanzen und Insekten können Flavonoide als Signalstoff dienen. So legen manche Schmetterlinge ihre Eier gezielt auf Pflanzen ab, die bestimmte Flavonolderivate ausscheiden (Harborne und Grayer, 1994). Flavonole sind zudem auch für das Pollenschlauchwachstum und die Samenbildung vieler Pflanzen erforderlich (Taylor und Jorgensen, 1992). Aber auch der Abwehr von Insekten als Fraßfeinde dienen Flavonoide, obwohl sie auf Insekten kaum eine toxische Wirkung haben. Vielmehr werden aus den Proanthocyanidinen durch Kondensation Gerbstoffe gebildet, die durch ihren Geschmack pflanzenfressende Insekten abhalten (Taiz und Zeiger, 2000). Einige Pflanzen bilden Flavonoide, mit deren allelopathischer Wirkung sie sich besser gegen Konkurrenzpflanzen durchsetzen können (Roshchina, 1993). Streßfaktoren wie Verwundung, Temperaturschwankungen und Wassermangel können ebenfalls zur Anregung der Flavonoidbiosynthese und damit zur Anreicherung verschiedener Flavonoide in bestimmten Pflanzengeweben führen (Hradzina, 1982).

Eine weitere Schutzfunktion der Flavonoide liegt in ihrer antioxidativen Wirkung. Auf Grund struktureller Eigenschaften des Flavonoidgrundgerüsts können Flavonoide freie Sauerstoffradikale einfangen und so das Gewebe vor oxidativer Schädigung schützen (Böhm et al., 1998). Diese Eigenschaft kommt nicht nur den Pflanzen zugute, die Flavonoide bilden, sondern auch Mensch und Tier, die Flavonoide mit der Nahrung aufnehmen. In weltweiten Untersuchungen wurde herausgefunden, daß ein Zusammenhang zwischen der Flavonoidaufnahme durch die Nahrung und dem Herzinfarkttrisiko besteht (Knekt et al., 1996). Inzwischen wurden noch weitere gesundheitsfördernde Eigenschaften der Flavonoide festgestellt, wie antibakterielle, antivirale, anti-allergene und sogar teilweise krebshemmende Wirkungen (Knekt et al., 1997). So wurde beispielsweise nachgewiesen, daß das Flavonol Quercetin das Wachstum von bestimmten Leukämie-Krebszelllinien hemmt (Liesveld et al., 2003)

Eine antimikrobielle Wirkung bestimmter Flavonoide wurde aber nicht nur im medizinischen, sondern auch im phytopathologischen Bereich nachgewiesen. Bei vielen Pflanzen reichern sich an infizierten Stellen verschiedene Flavonoide an, was als Hinweis auf eine Beteiligung von Flavonoiden an Abwehrreaktionen der Pflanze gesehen wird (Feucht et al., 1996). Apfelsorten, die gegen Apfelschorf resistent sind, weisen sowohl in den Blättern, als auch in den Fruchtschalen einen wesentlich höheren Gehalt an Flavan 3-olen auf als anfällige Sorten (Treutter und Feucht, 1990). Wird bei einer resistenten Sorte die gesamte Flavonoidbiosynthese jedoch durch einen

Hemmstoff unterbunden, was zu einem starken Rückgang des Gehalts an Flavan 3-olen führt, so zeigt diese Sorte ebenfalls eine hohe Anfälligkeit für Apfelschorf (Mayr et al., 1997). Eine antimikrobielle Wirkung konnte auch bei verschiedenen Pflanzenextrakten, die bestimmte Flavonoide in hoher Konzentration enthalten, nachgewiesen werden, so zum Beispiel bei *Bridelia crenulata* (Ramesh et al., 2001), *Epilobium angustifolium* und *Filipendula ulmaria* (Rauha et al., 2000). Bei einigen Flavanonen, Flavonen und Flavonolen als Reinstoff konnte ebenfalls eine antibakterielle, nicht jedoch antifungale Wirkung festgestellt werden (Rauha et al., 2000).

I.1.b Die Struktur der Flavonoide

Die Flavonoide zählen auf Grund ihrer Struktur zu den Polyphenolen. Der C₁₅-Körper des Flavangrundgerüsts stellt die Grundstruktur der Flavonoide dar (Abb. 1). Das Flavangrundgerüst besteht aus den beiden aromatischen Ringen A und B, sowie dem heterozyklischen Pyranring C, der ein Sauerstoffatom enthält. Die Einteilung der Flavonoide in 13 Unterklassen erfolgt nach den Oxidationsstufen der Kohlenstoffatome im C-Ring (Forkmann und Heller, 1999). Durch weitere Derivatisierungen wie beispielsweise Hydroxylierungen, Methylierungen, Acylierungen und Glykosylierungen entstehen schließlich die derzeit bekannten, gut 6500 verschiedenen Flavonoide (Harborne und Williams, 2000). Hydroxylierungen finden häufig am B-Ring in der Stellung 3', 4' und 5' statt, während Glykosylierungen oft an der 3, 5 oder 7-Stellung des A und C-Rings vorkommen. Bei der Glykosylierung können verschiedene Zuckermoleküle angehängt werden. Glykosylierungen erhöhen die Wasserlöslichkeit und in einigen Fällen auch die Stabilität der Flavonoide.

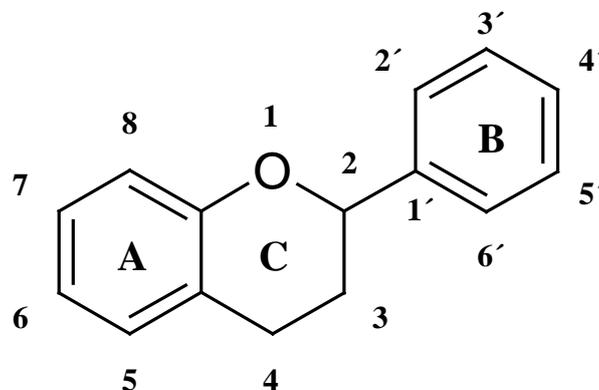


Abb. 1 : Das Flavangrundgerüst

I.1.c Die Flavonoidbiosynthese

Im Laufe der letzten 20 Jahre konnten die Aktivitäten der meisten, an der Flavonoidbiosynthese beteiligten Enzyme in verschiedenen Pflanzenarten nachgewiesen und charakterisiert werden. Auch sind inzwischen alle wesentlichen an der Flavonoidbiosynthese beteiligten Gene aus jeweils mindestens einer Pflanzenart kloniert und ihre Funktion durch heterologe Expression bestätigt worden (Forkmann und Heller, 1999; Winkel-Shirley, 2001).

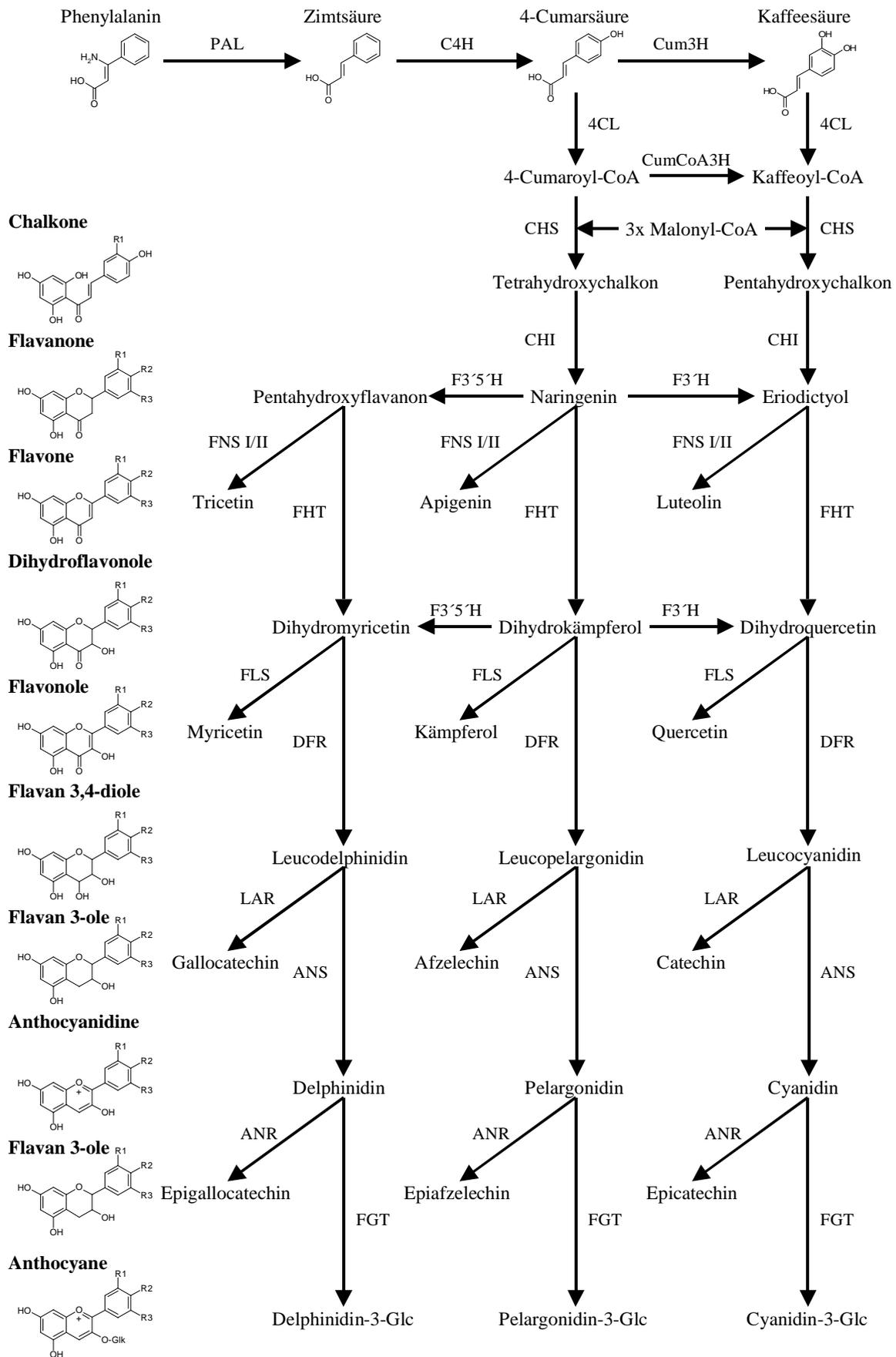
Die Flavonoidbiosynthese (Abb. 2) nimmt ihren Ausgang in der Aminosäure L-Phenylalanin. Dieses wird durch die Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL) zur *trans*-Zimtsäure umgesetzt, und diese wiederum durch die Zimtsäure 4-Hydroxylase (C4H) zur Hydroxyzimtsäure 4-Cumarsäure. 4-Cumarsäure kann nun durch die 4-Cumarsäure 3-Hydroxylase zur Kaffesäure umgesetzt werden. Sowohl aus 4-Cumarsäure, als auch aus Kaffesäure wird durch die 4-Cumarsäure : CoA-Ligase (4CL) 4-Cumaroyl-CoA, beziehungsweise Kaffeoyl-CoA gebildet. Ein Molekül 4-Cumaroyl-CoA oder ein Molekül Kaffeoyl-CoA kondensiert bei der von der Chalkonsynthase (CHS) katalysierten Reaktion mit je drei Molekülen Malonyl-CoA, welches aus Acetyl-CoA und Kohlendioxyd durch die Acetyl-CoA Carboxylase gebildet wird, zu Tetrahydroxychalkon oder Pentahydroxychalkon. Hier tritt nun zum ersten Mal im Syntheseweg der für die Flavonoide kennzeichnende C₁₅ Körper auf. Die CHS stellt somit das Schlüsselenzym für die Flavonoidbiosynthese dar. Das Flavangrundgerüst entsteht schließlich im nächsten Schritt, dem von der Chalkonisomerase (CHI) katalysierten Ringschluß am C-Ring, wodurch die Flavanone entstehen. Diese Umsetzung geschieht stereospezifisch an der 2-Stellung, so daß ausschließlich 2*S*-Flavanone gebildet werden. Die nachfolgenden Enzyme nehmen auch nur 2*S*-Flavanone als Substrat an. Die Isomerisierung kann allerdings auch ohne Enzym erfolgen, wobei dann aber ein Gemisch aus 2*S*- und 2*R*-Flavanonen entsteht. Bei den Flavanonen verzweigt sich die Flavonoidbiosynthese in mehrere Richtungen. Durch die Flavonoid 3'-Hydroxylase (F3'H) wird beim Naringenin an der 3'-Stellung im B-Ring eine Hydroxygruppe angehängt, und es entsteht Eriodictyol. Durch die Flavonoid 3'5'-Hydroxylase (F3'5'H) wird zusätzlich noch an der 5'-Stellung eine weitere Hydroxygruppe angehängt, so daß Pentahydroxyflavanon gebildet wird. Beide Produkte zählen ebenfalls zu den Flavanonen. F3'H und F3'5'H sind membrangebundene Cytochrom P450-Enzyme. Durch die Flavonsynthase I oder II (FNS I /II) können die Flavanone aber auch zu den Flavonen umgesetzt werden, wobei zwischen der 2- und 3-Stellung eine Doppelbindung eingeführt wird. Die FNS I stellt eine α -ketoglutaratabhängige Dioxygenase dar (Britsch et al., 1981) und die FNS II ein Cytochrom P450-Enzym (Stotz und Forkmann, 1981). Durch die Flavanon 3- β -Hydroxylase (FHT),

einer α -ketoglutaratabhängigen Dioxygenase, werden die Flavanone schließlich zu den Dihydroflavonolen umgesetzt. Bei dieser Reaktion wird an der 3-Stellung eine Hydroxygruppe in *trans*-Anordnung zum Substituenten an der 2-Stellung angefügt. Dihydrokämpferol kann dabei wiederum als Substrat für die F3'H und die F3'5'H dienen, wobei es zu Dihydroquercetin oder Dihydromyricetin umgesetzt wird. Die Dihydroflavonole sind aber auch die Vorstufe zu den Flavonolen, die durch die Flavonolsynthase (FLS), einer weiteren α -ketoglutaratabhängigen Dioxygenase, gebildet werden, wobei ähnlich zur Flavonbildung wiederum zwischen der 2- und der 3-Stellung eine Doppelbindung eingeführt wird. Die Umsetzung der Dihydroflavonole zu den Flavan 3,4-diolen, bei der die Carbonylgruppe an der 4-Stellung zur Hydroxygruppe reduziert wird, katalysiert die Dihydroflavonol 4-Reduktase (DFR), und der weitere Umsatz der Flavan 3,4-diole zu den Flavan 3-olen geschieht durch die von der Leukoanthocyanidin 4-Reduktase (LAR) katalysierten Reaktion, bei der die Hydroxygruppe an der 4-Stellung entfernt wird. Die Anthocyanidinsynthase (ANS), ebenfalls eine α -ketoglutaratabhängige Dioxygenase, setzt die Flavan 3,4-diole zu den Anthocyanidinen um, welche weiter durch die UDP-Glukose : Flavonoid 3-O-Glycosyltransferase (FGT) schließlich zu den Anthocyan 3-O-Glucosiden umgesetzt werden. Doch auch andere Endprodukte der Flavonoidbiosynthese wie Flavone und Flavonole können durch entsprechende Glycosyltransferasen glycosyliert werden. Die Anthocyanidinreduktase (ANR) katalysiert schließlich die Umsetzung der Anthocyanidine zu Flavan 3-olen in α -Form (Xie et al., 2003), bei denen an der 2- und 3-Stellung die Substituenten in *cis*-Anordnung ausgerichtet sind, im Gegensatz zur *trans*-Anordnung bei den durch die LAR aus den Flavan 3,4-diolen gebildeten Flavan 3-olen in β -Form.

Da der gesamte Flavonoidbiosyntheseweg sehr komplex ist, spielt eine Organisation der beteiligten Enzyme eine bedeutende Rolle. Es wird angenommen, daß die Enzyme zu einem Multienzymkomplex zusammengefaßt sind (Winkel-Shirley, 1999), welcher auf der zytoplasmatischen Seite des Endoplasmatischen Retikulums angeordnet ist und über die an der Flavonoidbiosynthese beteiligten Cytochrom P450-Enzyme C4H und F3'H / F3'5'H in der Membran verankert ist (Hradzina, 1992).

Die einzelnen Pflanzengewebe weisen unterschiedliche Flavonoidzusammensetzungen auf, und auch die Flavonoidzusammensetzung eines bestimmten Pflanzengewebes unterscheidet sich oft deutlich von einer Pflanzenart zur anderen. Die aufgeführten Enzyme der Flavonoidbiosynthese sind also nicht immer alle zusammen aktiv, sondern es werden jeweils nur einige der möglichen Wege eingeschlagen. Auch zeitliche Einflüsse bestimmen über die Aktivität einiger Synthesewege in bestimmten Geweben, ebenso wie äußere Einflüsse wie Strahlung oder Temperatur.

I. Einleitung

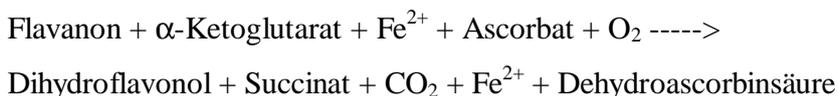


vorherige Seite : Abb. 2 : Die Flavonoidbiosynthese

I.1.d α -ketoglutaratabhängige Dioxygenasen

Dioxygenasen kommen sowohl bei Tieren, als auch bei Pflanzen vor und katalysieren Hydroxylierungen, Desaturierungen und Epoxidierungen. Dabei überführen sie beide Sauerstoffatome des Moleküls O_2 auf ein oder mehrere Substrate. Dioxygenasen können in Lipoxygenasen und α -ketosäureabhängige Dioxygenasen unterteilt werden. Von den meisten α -ketosäureabhängigen Dioxygenasen wird die α -Ketosäure α -Ketoglutarat als Kofaktor verwendet. Von den meisten dieser α -ketoglutaratabhängigen Dioxygenasen wird ein Sauerstoffatom aus dem O_2 -Molekül auf das Substrat übertragen und das zweite auf das α -Ketoglutarat, welches dann unter Abspaltung von Kohlendioxyd zu Succinat reagiert. Zur Aktivierung des Sauerstoffmoleküls ist an das aktive Zentrum des Enzyms ein Fe^{2+} -Ion gebunden. Dieses wird durch den Sauerstoff zu Fe^{3+} oxydiert, und der entstandene $Fe^{3+}-O^-$ Komplex inaktiviert das Enzym. Durch Ascorbat (Vitamin C) kann das Enzym regeneriert werden, indem Fe^{3+} wieder zu Fe^{2+} reduziert wird, wobei aus dem Ascorbat Dehydroascorbinsäure entsteht.

In Pflanzen sind α -ketoglutaratabhängige Dioxygenasen an vielen Reaktionswegen beteiligt, unter anderem an der Synthese von Gibberellin und Abiscinsäure, sowie an mehreren Stellen an der Flavonoidbiosynthese. Von besonderem Interesse für diese Arbeit ist die α -ketoglutaratabhängige Dioxygenase FHT, welche in der Flavonoidbiosynthese den Umsatz der Flavanone zu den Dihydroflavonolen katalysiert. Hierbei wird die 3-Stellung des C-Rings hydroxyliert, und die angefügte Hydroxygruppe steht in *trans*-Stellung zum Substituenten an der 2-Stellung. Die Hydroxylierung erfolgt also stereospezifisch, und es werden von der FHT ausschließlich 2*S*-Flavanone umgesetzt. Für den Umsatz der FHT läßt sich folgende Reaktionsgleichung aufstellen :



I.1.e Dihydroflavonol 4-Reduktase und Flavanon 4-Reduktase

Die DFR katalysiert den Umsatz von Dihydroflavonolen zu den Flavan 3,4-diole, die auch als Leukoanthocyanidine bezeichnet werden (Forkmann und Heller, 1999). Diese Umsetzung erfolgt stereospezifisch, wobei aus 2,3-*trans* Dihydroflavonolen 2,3-*trans* Flavan 3,4-*cis*-diole gebildet werden. Die Carbonylgruppe an der 4-Stellung der Dihydroflavonole wird zu einer Hydroxygruppe reduziert. Der dazu nötige Wasserstoff stammt vom Kofaktor NADPH und wird auf das Substrat übertragen. Die bei dieser Umsetzung entstandenen Flavan 3,4-diole stellen die Vorstufe für Anthocyanidine und Flavan 3-ole dar. Viele der bisher untersuchten DFR-Enzyme zeigen eine hohe Substratspezifität bezüglich des Hydroxylierungsmusters am B-Ring und setzen daher oft nur bestimmte Dihydroflavonole um. In einigen Fällen besteht ein Zusammenhang zwischen der Substratspezifität der DFR und dem im jeweiligen Gewebe vorliegenden Anthocyanmuster (Elsherif, 2000). Das Anthocyanmuster läßt sich also in diesen Fällen auf die Substratspezifität der jeweils exprimierten DFR zurückführen.

Auch in Bezug auf die Hydroxylierung an der 3-Stellung im C-Ring weisen verschiedene DFR-Enzyme eine unterschiedliche Substratspezifität auf. Manche DFR-Enzyme sind in der Lage, außer Dihydroflavonole auch Flavanone an der 4-Stellung zu reduzieren, wodurch Flavan 4-ole gebildet werden. In diesem Fall wird dann von der Flavanon 4-reduktase (FNR) gesprochen. Diese FNR-Reaktion, die in Ihrer Funktionsweise der DFR-Reaktion entspricht, wurde zum ersten Mal in Enzymextrakten aus Blütenblättern von *Sinningia cardinalis* nachgewiesen, in deren Blütenblättern 3-Deoxyanthocyane vorkommen (Stich und Forkmann, 1988a). Auch in Enzymextrakten aus den Blütenblättern von *Columnea hybrida* und aus verschiedenen Geweben von Mais (Stich und Forkmann, 1988b), und auch in Enzymextrakten aus den Blättern von Apfel und Birne konnte die FNR-Reaktion nachgewiesen werden. Bei Apfel und Birne konnte die FNR-Reaktion zusätzlich auch bei heterolog in Hefe exprimierter DFR beobachtet werden (Fischer et al., 2003). Dieser Befund bestätigte die Vermutung, daß es sich bei DFR und FNR um das gleiche Enzym handelt. Diese Vermutung trat bereits auf, als nachgewiesen wurde, daß gereinigtes DFR-Enzym aus der Dahlie in der Lage ist, sowohl die DFR- als auch die FNR-Reaktion zu katalysieren (Fischer et al., 1988). Bei den DFR-Enzymen aus *Dianthus caryophyllus* und *Matthiola incana* ist die Umsetzung von Flavanonen jedoch nicht möglich (Stich et al., 1992).

I.2 Prohexadion-Ca

I.2.a Gesteigerte Resistenz bei Apfelbäumen durch Behandlung mit Prohexadion-Ca

Der Feuerbrand stellt eine der gefährlichsten Krankheiten beim Apfel dar und verursacht teils erhebliche Ernteaufschläge. Normalerweise wird der bakterielle Erreger des Feuerbrandes, *Erwinia amylovora*, mit dem Antibiotikum Streptomycin bekämpft. Der Einsatz von Antibiotika ist jedoch grundsätzlich problematisch, weil dabei die Gefahr besteht, daß sich vielfachresistente Bakterienstämme durchsetzen können, deren Bekämpfung immer schwieriger wird. Gegen Streptomycin haben bereits einige Stämme von *Erwinia amylovora* Resistenzen entwickelt (Yoder et al., 1999). Durch horizontalen Gentransfer könnten solche Antibiotikaresistenzgene möglicherweise auch auf humanpathogene Bakterien übertragen werden.

Es hat sich gezeigt, daß Apfelbäume, die zur Verringerung des Längenwachstums ihrer Triebe mit dem Wachstumsregulator Prohexadion-Ca behandelt worden sind, neben vermindertem Längenwachstum (Rademacher, 1993, 2000) auch eine erhöhte Resistenz gegen Feuerbrand aufweisen (Yoder et al., 1999). Der Feuerbrandbefall ging bei Behandlung der Apfelbäume mit Prohexadion-Ca sogar stärker zurück, als bei der Behandlung mit Streptomycin (Momol et al., 1999). Zudem wiesen Apfelblätter, die mit Prohexadion-Ca behandelt wurden, einen deutlich niedrigeren Besatz mit *Erwinia amylovora* auf als unbehandelte Blätter (Fernando und Jones, 1999). Prohexadion-Ca zeigt allerdings keinerlei antimikrobielle Wirkung (Rademacher et al., 1992). Bei der Untersuchung der behandelten Blätter wurde festgestellt, daß sich deren Flavonoidgehalt und Flavonoidmuster deutlich von dem unbehandelten Blätter unterscheidet. Während einerseits der Gehalt an Anthocyanen (Rademacher 1993), Flavonolen, Proanthocyanidinen und Catechin deutlich abnimmt, reichert sich andererseits Eriodictyol an, und die 3-Deoxyflavonoide Luteoforol und Luteoliflavan, die normalerweise nicht im Apfelblatt vorkommen, werden gebildet (Römmelt et al., 1999). Bei Luteoforol konnte bereits eine antibakterielle Wirkung nachgewiesen werden (Ramesh et al., 2001), so daß anzunehmen ist, daß dieser Stoff für die erhöhte Resistenz gegen Feuerbrand verantwortlich ist.

I.2.b Struktur und Anwendung von Prohexadion-Ca als Wachstumsregulator

Prohexadion-Ca, Calcium 3-Oxido-4-propionyl-5-oxo-3-cyclohexen-carbonsäure, zählt zur Stoffklasse der Acylcyclohexandione, hat die Summenformel $C_{10}H_{10}O_5Ca$ und ein Molekulargewicht

von 250,2 d. Unter dem Handelsnamen "Regalis" (BAS 125 10 W) wird es von der Firma BASF, Limburgerhof, als Längenwachstumsregulator und Mittel zur Resistenzsteigerung gegen Feuerbrand bei Apfelbäumen angeboten. In diesem Produkt liegt Prohexadion-Ca in einem Gehalt von 10 % vor. Nicht nur beim Apfel, sondern auch bei Reis und Erdnuß wird Prohexadion-Ca als Längenwachstumsregulator eingesetzt.

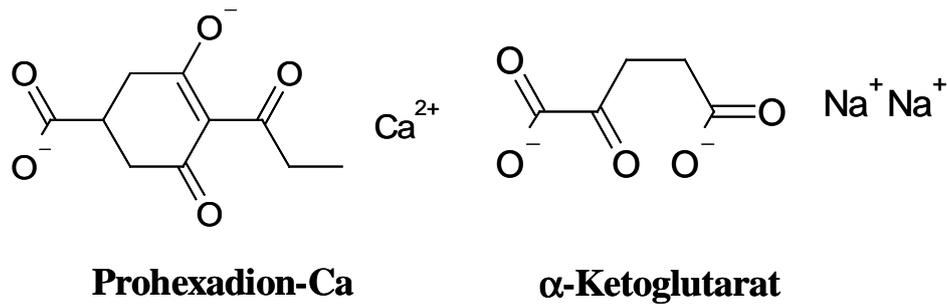


Abb. 3 : Prohexadion-Ca und α -Ketoglutarat

Auf Grund seiner Strukturanalogie zu α -Ketoglutarat (Abb. 3) kann Prohexadion-Ca, wie auch andere Acylcyclohexandione, α -ketoglutaratabhängige Dioxygenasen kompetitiv hemmen (Griggs et al., 1991; Rademacher, 2000). Diese Eigenschaft wird beim Einsatz von Prohexadion-Ca als Längenwachstumsregulator genutzt, da der letzte Schritt in der Gibberellinbiosynthese, bei dem die aktive Form des Gibberellins GA_1 aus der Vorstufe GA_{20} gebildet wird und der von einer α -ketoglutaratabhängigen Dioxygenase katalysiert wird (Gräbe, 1987), gehemmt werden kann. Aktives Gibberellin GA_1 ist ein für das Längenwachstum notwendiges Phytohormon. Weil auf Grund der durch Prohexadion-Ca verursachten Hemmung kein aktives Gibberellin GA_1 mehr gebildet werden kann, kommt es zu einer deutlichen Verminderung des Längenwachstums (Rademacher, 1993). Außer beim Apfel läßt sich mit Prohexadion-Ca auch bei vielen weiteren Pflanzen die Gibberellinbiosynthese hemmen und damit das Längenwachstum vermindern (Rademacher, 1992).

Der Einsatz als Längenwachstumsregulator für Apfeltriebe erfolgt im Frühjahr, wenn drei bis fünf voll entwickelte Blätter je jungem Trieb gebildet worden sind. Im Abstand von je drei bis fünf Wochen, was der Halbwertszeit von Prohexadion-Ca im Pflanzengewebe entspricht (Evans et al., 1999), erfolgen die nächsten Behandlungen, und spätestens 55 Tage vor der Ernte sollte die

letzte Behandlung durchgeführt werden. Inzwischen wird Prohexadion-Ca bei Apfelbäumen auch zur Vorbeugung gegen Feuerbrandbefall eingesetzt.

I.2.c Induktion eines neuen Flavonoidbiosyntheseweges durch Prohexadion-Ca

Bei der Behandlung von Apfelbäumen mit Prohexadion-Ca werden in den Blättern die 3-Deoxyflavonoide Luteoforol und Luteoliflavan gebildet. An der Flavonoidbiosynthese sind mit den Enzymen FHT, FNS I, FLS und ANS mehrere α -ketoglutaratabhängige Dioxygenasen beteiligt (Forkmann und Heller, 1999). Besonders die FHT nimmt für die Bildung von Anthocyanen, Flavonolen und Flavan 3-olen mit der von ihr katalysierten Hydroxylierung der Flavanone an der 3-Stellung zur Bildung von Dihydroflavonolen eine Schlüsselstellung ein. Als α -ketoglutaratabhängige Dioxygenase kann dieses Enzym ebenfalls durch Prohexadion-Ca gehemmt werden, was den Rückgang der Anthocyane und Flavonole in den betreffenden Geweben bei der Behandlung mit Prohexadion-Ca erklärt (Römmelt et al., 1999). Die Hemmung der FHT führt in den Apfelblättern zur Anreicherung von Eriodictyol. Eriodictyol besitzt an der 3-Stellung keine Hydroxygruppe und stellt damit einen Ausgangsstoff für die Bildung weiterer 3-Deoxyflavonoide dar. Für die Bildung des Flavan 4-ols Luteoforol ist es notwendig, daß die Carbonylgruppe an der 4-Stellung des Eriodictyols zur Hydroxygruppe reduziert wird, was der durch die DFR katalysierten Reaktion entspricht. Daß die DFR des Apfels in der Lage ist, auch Eriodictyol umzusetzen, wurde sowohl im Enzymextrakt aus Apfelblättern, als auch bei in Hefe heterolog exprimierter DFR gezeigt (Fischer et al., 2003). In Ermangelung ihres eigentlichen Substrats Dihydroquercetin, welches durch die Hemmung der FHT nicht mehr gebildet werden kann, setzt die DFR nun das angereicherte Eriodictyol zum Luteoforol, dem direkten Vorläufer von Luteoliflavan, um (Fischer et al., 2003). Luteoforol wird dann von der LAR, die normalerweise den Umsatz von Leukocyanidin zum Catechin katalysiert, zum Luteoliflavan umgesetzt, welches in den mit Prohexadion-Ca behandelten Apfelblättern nachweisbar ist (Abb. 4).

I. Einleitung

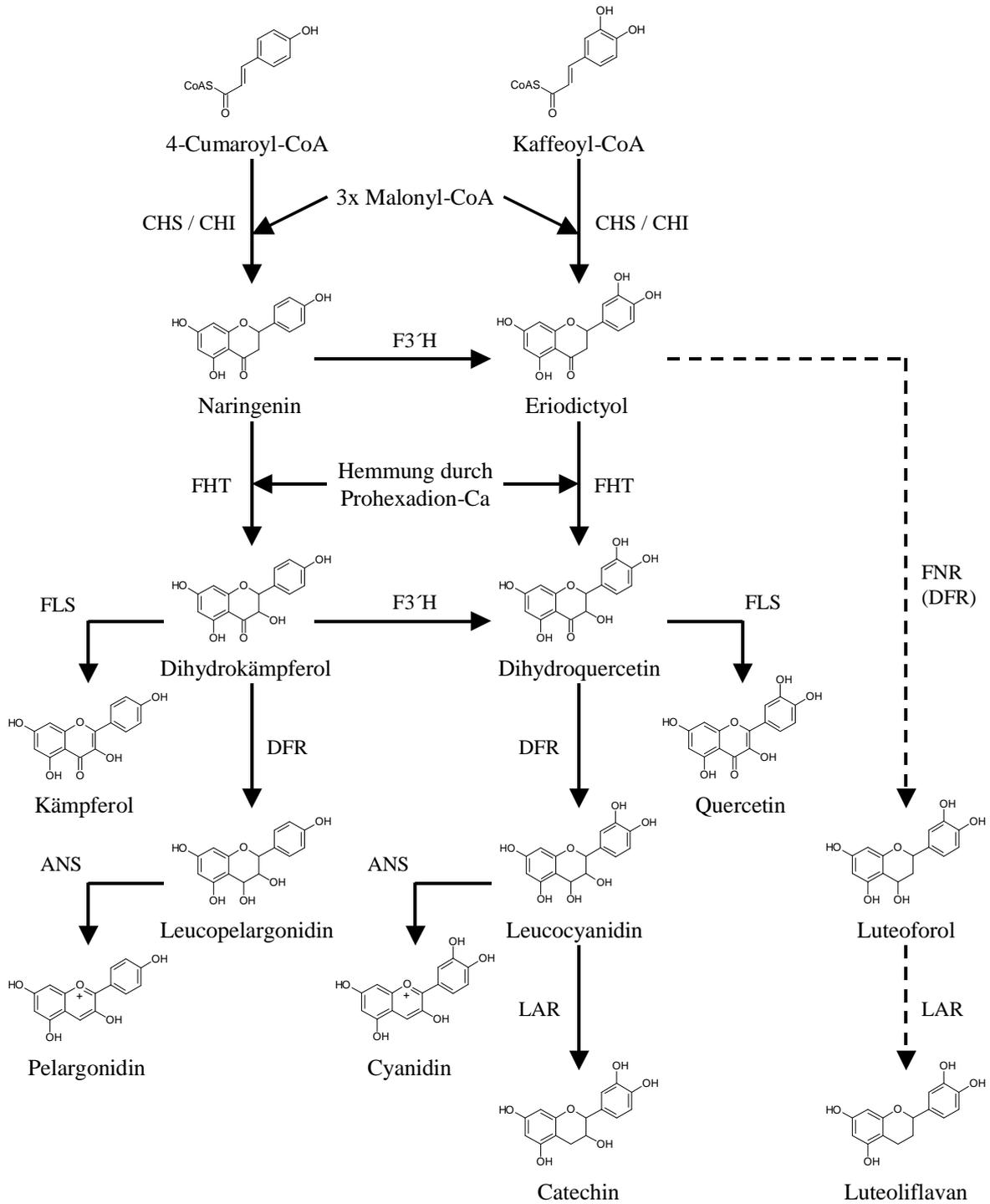


Abb. 4 : Die Bildung von Luteoliflavan bei Hemmung der FHT mit Prohexadion-Ca

I.3 Die Rose

Die Rose stellt heute die weltweit beliebteste und wirtschaftlich bedeutendste Zierpflanze dar. Jährlich werden weltweit 150 Millionen Pflanzen verkauft, von noch größerer Bedeutung ist allerdings der Schnittblumenmarkt, wo allein täglich mehrere Millionen Rosen verkauft werden. Mit den modernen Transportmethoden ist es möglich, die Schnittblumen auch von sehr weit her innerhalb von 24 Std zu liefern. Die wichtigsten Schnittblumenbetriebe befinden sich in den Niederlanden, in Dänemark, in Israel, Kenia, Simbabwe und den USA, einer der größten Absatzmärkte ist Deutschland.

Die Gartenrose, *Rosa hybrida*, zählt zur Gattung *Rosa* innerhalb der Familie der *Rosaceae*, zu der auch Apfel, Birne, Pflaume, Kirsche und die Erdbeere gehören. Der Gattung *Rosa* gehören 140 Arten an, von denen 27 in Europa vorkommen. Über die gesamte Nordhalbkugel von der Subarktis bis in tropische Gegenden ist die Gattung *Rosa* verbreitet, kommt jedoch auf der Südhalbkugel natürlicherweise nicht vor (Abb. 5). Die ältesten Fossilien, die der Gattung *Rosa* zugeordnet werden, stammen aus dem Tertiär und sind etwa 25 Millionen Jahre alt.

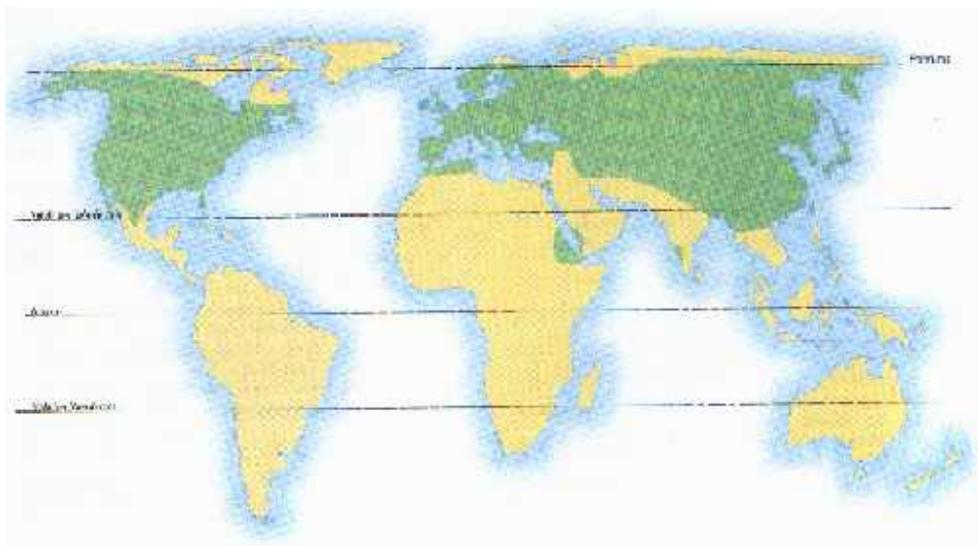


Abb 5 : Verbreitung der Gattung *Rosa*. Das natürliche Verbreitungsgebiet ist grün hinterlegt

Die Gattung *Rosa* wird in vier Untergattungen eingeteilt. Die Untergattung *Hulthemia* umfaßt westasiatische Arten, zu den *Hesperhodes* zählen zwei nordamerikanische Arten, die Untergattung *Plathyrhodon* beinhaltet mehrere in China vorkommende Arten, und zur Untergattung *Euro-*

sa gehören sämtliche europäische und einige asiatische Arten. Diese Untergattung wird nochmals in 10 Gruppen eingeteilt, von denen die *Chinenses* und die *Gallicanae* die beiden wichtigsten darstellen. Während alle Vorläufer der alten europäischen Rosensorten zu den *Gallicanae* gehören, finden sich bei den *Chinenses* die Vorläufer der modernen Rosensorten.

Die Kultivierung der Rose reicht bereits weit in die Antike zurück. Erste Hinweise finden sich aus der Zeit um 2600 v. Chr. in Mesopotamien, denn in den "Hängenden Gärten der Semiramis", einem der sieben Weltwunder der Antike, sollen bereits Rosen angepflanzt worden sein. Während der Rose in dieser Zeit lediglich eine kultische Bedeutung zugemessen wurde, kam zur Römerzeit erstmals die medizinische Nutzung, und auch die Nutzung als reine Zierpflanze hinzu. Aus dieser Zeit stammen auch die ältesten bekannten Sorten, so zum Beispiel die Sorte "Perpetual White Moss", die etwa um 50 v. Chr. entstanden sein soll. Im frühen Mittelalter sah die Kirche die Rose als Symbol für Zügellosigkeit und Lustbarkeit und erklärte die Anpflanzung, Verwendung und Darstellung der Rose für Sünde. Diese Haltung änderte sich jedoch ziemlich bald wieder, und die Rose gelangte mit der Zeit zum Symbol für das Christentum überhaupt, besonders in der Marienverehrung, so daß sich in vielen Kirchen Rosenornamente finden. Seither zieren Rosensymbole auch viele Wappen, so das Wappen der Stadt Rosenheim, die Tudorrose das britische Königswappen, und auch Parteien und Firmen haben sich Rosensymbole als Kennzeichen ausgewählt.

Im Mittelalter wurden die noch aus der Römerzeit stammenden Kulturrosen in Klostergärten weitergezüchtet und über ganz Europa verbreitet. Ab dem 16. Jahrhundert setzte vor allem in Holland und England eine verstärkte Zuchtstätigkeit ein, so daß Mitte des 18. Jahrhunderts bereits etwa 150 verschiedene Rosensorten bekannt waren. Gegen Ende des 18. Jahrhunderts erlebte die Rosenzüchtung durch die Einfuhr mehrmals im Jahr blühender ostasiatischer Arten einen starken Aufschwung. Entstanden vorher neue Sorten vor allem durch Zufallskreuzungen, so wurde nun zu gezielter Kreuzung übergegangen, wozu die zu dieser Zeit aufgekommene Erkenntnis über den sexuellen Vermehrungsweg der Pflanzen die Grundlage lieferte. Die modernen, mehrmals im Jahr blühenden Sorten sind daher meistens auf ostasiatische Arten aus der Gruppe der *Chinenses* zurückzuführen, während die alten Sorten, die nur einmal im Jahr blühen, auf europäische Arten aus der Gruppe der *Gallicanes* zurückgehen. Heute sind mehrere tausend Sorten *Rosa hybrida*, der Gartenrose, auf dem Markt, die in 39 Sortenklassen eingeteilt werden.

I.3.a Rosenkrankheiten

Neben verschiedenen Insekten und deren Larven, die Fraßschäden an Rosen verursachen, zählen vor allem mehrere Pilze zu den wichtigsten Rosenschädlingen. Zu dem am weitesten verbreiteten, von Pilzen verursachten Krankheiten zählen Echter Mehltau (*Sphaerotheca pannosa*) und Falscher Mehltau (*Peronospora sparsa*), Sternrußtau (*Diplocarpon rosae*) und Rosenrost (*Phragmidium mucronatum*), welche alle die Laubblätter befallen. Der Rindenbrand (*Coniothyrium wernsdorffiae*) befällt junge Triebe und die Rinde, während der Grauschimmel (*Botrytis cinera*) besonders Blüten und Knospen schädigt.

Vor allem der Sternrußtau und der Echte Mehltau verursachen große Schäden. Während der Echte Mehltau sich vor allem in Gewächshauskulturen verbreitet, befällt der Sternrußtau eher im Freiland wachsende Rosen. Sternrußtau wurde zum ersten Mal Anfang des 19. Jahrhunderts in den USA beobachtet und hat sich seither weltweit verbreitet (Carlsson-Nilsson und Davidson, 2000). Bei Befall bilden sich auf der Oberseite des Rosenlaubblattes runde, braunschwarze Flecken mit gezacktem Rand von 5-15 mm Durchmesser, während sich der Rest der Blattspreite gelb färbt. Auf den dunklen Flecken bilden sich warzenähnliche Acervuli, und subkutikuläres Mycel des Pilzes breitet sich zwischen Kutikula und Epidermis aus. Die Konidien können bei 15-25 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 85 % innerhalb von 9 std keimen, weshalb besonders nasse Blätter beste Keimungsbedingungen für die Konidien bieten (Walker et al., 1996). Das Laub der befallenen Pflanze fällt schließlich ab, weshalb die Rose zu Neuaustrieben gezwungen wird. Wenn diese Neuaustriebe vor dem Winter nicht mehr ausreifen können, wird die Pflanze zudem nun sehr frostanfällig, was weitere Schädigungen mit sich führen kann. Durch die abgeworfenen infizierten Blätter kann sich der Sternrußtau weiter verbreiten, und der Pilz kann auch im Gewebe der abgeworfenen Blätter überwintern. Im Frühjahr entstehen dort neue Acervuli, die neue Konidien freisetzen können. Zusätzlich können Konidien auch über Regenwasser oder Tau, sowie über Insekten verbreitet werden. Niederschlagsreiche Sommer, bei denen die Laubblätter häufig mit Wasser benetzt werden, fördern die Verbreitung und das Wachstum des Sternrußtaus.

Zur Bekämpfung von Sternrußtau werden verschiedene Fungizide eingesetzt, sowie 0,05 % Natrium- oder Kaliumbicarbonatlösung. Vorteilhaft hat sich ein Fungizideinsatz während des Winters erwiesen, weil damit die eingesetzte Fungizidmenge in der Wachstumszeit verringert werden kann (Bowen, 2001). Es sind allerdings auch einige Rosensorten bekannt, die eine erhöhte Resistenz gegen Sternrußtau aufweisen.

I.3.b Die Flavonoidbiosynthese bei der Rose

Biochemische und enzymologische Untersuchungen zur Flavonoidbiosynthese bei Rosen wurden bisher fast ausschließlich an der Blüte durchgeführt. Dort wurde vor allem das Anthocyanmuster und dessen enzymologische Grundlagen untersucht, um die Ursachen für die unterschiedliche Färbung der Blüten verschiedener Sorten zu erklären. Es wurde der jeweilige Gehalt an Pelargonidin und Cyanidin in den Blütenblättern ermittelt, und die Aktivität der Enzyme CHS, FHT und DFR in Enzymextrakten aus Rosenblütenblättern nachgewiesen. Bei diesen Untersuchungen zeigte sich, daß die Substratspezifität der DFR einen entscheidenden Einfluß auf das Anthocyanmuster in den Blütenblättern hat (Elsherif, 2000). Weiterhin wurden aus den Blütenblättern die Gene *Chs* (Tanaka und Yonekura, 2003) *Fht* (Dedio, 1993), *Dfr* (Tanaka et al., 1995), *Fls* (Suzuki et al., 2000) und *Ans* (Min, 1994) kloniert.

In den Laubblättern der Rose wurden bisher keine enzymologischen und biochemischen Untersuchungen angestellt. Kloniert werden konnte aus den Laubblättern ein *Dfr*-Gen, welches auch heterolog in Hefe exprimiert und charakterisiert wurde (Gosch, 2003). Die Blätter stellen die Hauptangriffspunkte für die meisten pilzlichen Pathogene dar, weshalb die Untersuchung des dort ablaufenden Flavonoidbiosyntheseweges und der Auswirkungen einer Behandlung mit Prohexadion-Ca auf das Flavonoidmuster und den Flavonoidgehalt der Laubblätter notwendig ist.

I.4 Die Kartoffel

Die Kartoffel stellt sowohl weltweit, als auch in Deutschland eine der bedeutendsten Nutzpflanzen dar. In Deutschland werden gut 130 Kartoffelsorten auf 300000 ha angebaut, und jährlich werden 13 Millionen t Kartoffeln geerntet, was etwa 1/4 der gesamten Ernte in der EU entspricht. Bedeutende Anbauggebiete liegen in Norddeutschland, vor dem Zweiten Weltkrieg vor allem in Pommern, in Bayern auch in der Ebene östlich von München. Neben Speisekartoffelsorten werden auch Futterkartoffelsorten und Kartoffelsorten für die Stärkeherstellung angebaut.

Die Kartoffel, *Solanum tuberosum*, zählt zur Gattung der *Solanaceae*, der noch weitere Nutzpflanzen angehören wie Tomate, Eierfrucht und Paprika, aber auch die Petunie. Schon seit über 2000 Jahren wird die aus Südamerika stammende Kartoffel von den Indios als Nahrungspflanze auf den Hochflächen der Anden angebaut. Durch die spanischen Eroberer wurde die Kartoffel um 1570 nach Europa eingeführt und zunächst in Spanien angebaut, von wo aus sich der Kartoffelan-

bau in kurzer Zeit über Mittel- und Südeuropa ausbreitete. In Deutschland erfolgte der erste Kartoffelanbau um 1590 in Schlesien, wo die Kartoffel auch schon als Nahrungspflanze verwendet wurde, nachdem sie vorher in Europa lediglich als Zierpflanze diente. Im 18. Jahrhundert setzte sich der Kartoffelanbau in ganz Europa durch, und so wurden nun auch in Skandinavien, in der Schweiz, auf den britischen Inseln und in Rußland Kartoffeln angebaut. Die Kartoffel wurde somit zu einem der wichtigsten Nahrungsmittel der europäischen Bevölkerung, was mit die Grundlage für die einsetzende Industrialisierung zu Beginn des 19. Jahrhunderts brachte. Denn mit dem großflächigen Anbau der Kartoffel erlebte die europäische Landwirtschaft eine erhebliche Leistungssteigerung, was für die wachsende Bevölkerung in den aufkeimenden Industriegebieten unerlässlich gewesen ist. Heute wird die Kartoffel in weltweit 130 Ländern angebaut und es wurden bisher weit über tausend Sorten gezüchtet.

I.4.a Kartoffelkrankheiten

Neben der Schädigung durch einige Insekten und deren Larven, wobei besonders der Kartoffelkäfer zu nennen wäre, ist die Kartoffel vor allem der Schädigung durch verschiedene Pilze und Bakterien ausgesetzt. Pilzliche Erreger sind *Streptomyces scabies*, welcher Kartoffelschorf verursacht, und *Phytophthora infestans*, der die Kraut- und Knollenfäule auslöst. Die Schwarzbeinigkeit wird durch das Bakterium *Erwinia carotovora* verursacht, das auch mit dem Erreger des Feuerbrandes bei Apfelbäumen, *Erwinia amylovora*, verwandt ist.

Phytophthora infestans wurde um 1840 aus Nordamerika zunächst nach Belgien eingeschleppt, von wo aus sich der Erreger über ganz Europa ausbreitete. Die Kraut- und Knollenfäule ist auch die Ursache für die Hungersnot 1846-1848 in Irland gewesen, als dort nahezu die gesamte Kartoffelernte vernichtet wurde, und dadurch über eine Million Menschen verhungerten. *Phytophthora infestans* befällt zunächst die Blätter der Kartoffelpflanze, wo sich dunkelbraune Flecken besonders an der Spitze und um die Mittelrippe bilden (Abb.6). Auf Grund des abgestorbenen Blattgewebes an den dunkelbraunen Flecken wird die Photosyntheseleistung der Pflanze erheblich herabgesetzt. Dies führt bei infizierten Pflanzen zur Verminderung des Knollenwachstums. Im Blattgewebe bildet der Pilz Hyphen aus, und bei Feuchtigkeit entstehen um die infizierten Stellen herum weiße Sporangioophoren. Werden die Zoosporen vom Regenwasser dann in den Boden gewaschen, kann auch die Knolle infiziert werden, was zu Lagerschäden der Kartoffelknollen führt. Zusätzlich können bei gelagerten Kartoffelknollen der Infektion mit *Phytophthora*

infestans leicht Sekundärinfektionen mit Weichfäulebakterien folgen. *Phytophthora infestans* überwintert als lebendes Mycel im Pflanzengewebe, dabei vor allem in der Knolle, und kann allein im Boden nicht überleben. Zur Bekämpfung von *Phytophthora infestans* ist eine regelmäßige Behandlung der Kartoffelpflanzen mit Fungiziden nötig. Auf Grund der Überwinterung von *Phytophthora infestans* in der Knolle werden zu Beginn der Vegetationsperiode bereits vorbeugend Fungizide eingesetzt, da sich der Pilz aus infizierten, überwinterten, und wieder zum Anbau verwendeten Knollen sehr schnell verbreiten kann. Meist werden systemisch wirkende Fungizide eingesetzt, um sowohl ober- als auch unterirdische Pflanzenteile zu schützen.



Abb 6 : Symptome der Krautfäule bei der Kartoffel

Der Erreger der Schwarzbeinigkeit, das Bakterium *Erwinia carotovora*, infiziert den unteren Sproßteil der Kartoffelpflanze. Nach der Infektion bilden sich am Sproß in einem Bereich von etwa 10 cm über dem Erdboden schwarze, faulige Stellen. Kühles, feuchtes Wetter begünstigt dabei den Befall der Kartoffel mit *Erwinia carotovora*. Der infizierte Sproß wird dann vor allem bei feuchter Witterung weich, und die Pflanze kippt um. Bei jungen Pflanzen, zu Beginn der Wachstumszeit, sind erste Anzeichen für einen Befall mit *Erwinia carotovora* hellgrüne bis gelbliche Blätter, die sich teilweise einrollen. Ähnlich wie *Phytophthora infestans* kann auch *Erwinia carotovora* die Knollen befallen, welche dann von innen her verfaulen.

I.4.b Die Flavonoidbiosynthese bei der Kartoffel

Bei der Kartoffel wurde der Flavonoidgehalt und das Flavonoidmuster erst in wenigen Pflanzenteilen untersucht. Anthocyane konnten in den Schalen der Knollen einiger Sorten nachgewiesen

werden (Stobiecki et al., 2003). In den Antheren und im Pistil von Kartoffelblüten wurden Kämpferol und geringe Mengen an Quercetin und Myricetin gefunden (van Eldik et al., 1997). Kloniert wurden bisher die Gene *Chs* (Jeon et al., 1996), *Fht* (Betz, 2002), *Fls* (van Eldik et al., 1997) und *Dfr* (Jeon et al., 2001). Biochemische und enzymologische Untersuchungen zur Flavonoidbiosynthese in den Laubblättern und im Sproß, den Angriffspunkten für *Phytophthora infestans* und *Erwinia carotovora* wurden bisher nicht durchgeführt.

I.5 Zielsetzung der Arbeit

Bakterielle und pilzliche Pflanzenpathogene richten in landwirtschaftlichen Kulturen, aber auch im Zierpflanzenbau, teils erhebliche Schäden an. Das Interesse an entsprechenden Abwehrmechanismen ist demzufolge hoch, vor allem, da der Einsatz von Pflanzenschutzmitteln nicht immer unproblematisch ist. Eine Steigerung der Resistenz gegen verschiedene Pathogene durch die Bildung von Luteoforol nach einer Behandlung mit Prohexadion-Ca bei landwirtschaftlich und gartenbaulich genutzten Pflanzen wäre also durchaus wünschenswert. Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht daher der Nachweis der Flavonoidbiosynthesewege in den Laubblättern von Kartoffel und Rose und die Untersuchung der Auswirkungen einer Behandlung mit Prohexadion-Ca auf den Flavonoidgehalt und die Flavonoidzusammensetzung der Laubblätter. Außerdem sollte untersucht werden, ob die Behandlung mit Prohexadion-Ca auch bei anderen Pflanzen außer dem Apfel zu Resistenzsteigerungen führen kann.

Darüber hinaus wurden das Flavonoidmuster und die Aktivitäten der an der Flavonoidbiosynthese beteiligten Enzyme in den Laubblättern einer Petunienlinie untersucht, welche in den Blütenblättern keine Aktivität der FHT aufweist. Zum Vergleich wurden zwei weitere Petunienlinien mit Aktivität der FHT in den Blütenblättern untersucht.

II. Material und Methoden

II.1 Material

II.1.a Technische Geräte

Autoklav CV-EL 18L	Certoclav, Traun (Österreich)
Bioscanner Fujix BAS 1000	Fuji Photo, Tokio (Japan)
Elektrophorese-System Mini-Sub Cell GT	Biorad, Hercules (USA)
Elektrophorese-Spannungsquelle EPS 3500	Pharmacia Biotech, Uppsala (Schweden)
Elektroporator ECM 395	BTX, San Diego (USA)
Heizblock Thermomixer comfort	Eppendorf, Engelsdorf
PCR-Block PCRExpress	Hybaid, Ashford (USA)
Photometer Biochrom 4060	Pharmacia, Cambridge (Großbritannien)
Rotationsverdampfer Rotavapor RE 111	Büchi, Flawil (Schweiz)
UV-Beleuchtung	Desaga, Heidelberg
Vakuumzentrifuge	Bachofer, Reutlingen
Video Copy Processor P68E	Mitsubishi Asia, Singapur (Singapur)
Zentrifuge Eppendorf 4515 C	Eppendorf, Engelsdorf
Zentrifuge Biofuge 28 RS	Heraeus Sepatech, Newtown (USA)
Zentrifuge Sorvall RC-5B Plus	Sorvall-Du Pont, Wilmington (USA)

II.1.b Verbrauchsmaterialien und molekularbiologische Kits

Bradford-Proteinassay	Sigma Chemical Co., St. Louis (USA)
DNA-Längenstandard	MBI Fermentas
Dünnschichtplatten Kieselgel 20 x 20 cm	Merck, Darmstadt
Dünnschichtplatten Zellulose	Merck, Darmstadt
Glaskapillaren	Hirschmann, Ebermannstadt
Plasmid Mini-Prep Kit I E.Z.N.A	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
RNeasy Plant Mini Kit	Qiagen, Hilden

II.1.c Chemikalien

Aceton	Merck, Darmstadt
Acetosyringon	Acros Organics, Geel (Belgien)
Adenin	Merck, Darmstadt
Agar-Agar	Nierle, Freising
Agarose Sea Kem	FMC, Rockland (USA)
Ameisensäure	Merck, Darmstadt
Ammoniumnitrat	Merck, Darmstadt
Ammoniumsulphat	Merck, Darmstadt
sämtliche Antibiotika	Duchefa, Haarlem (Niederlande)
L-Na-Ascorbat	Sigma Chemical Co., St. Louis (USA)
Bactopepton	Merck, Darmstadt
Biotin	Merck, Darmstadt
Borsäure	Merck, Darmstadt
n-Butanol	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid	Riedel-de Haene, Seelze
Caseinhydrat	Fluka Chemie AG, Buchs (Schweiz)
Catechin	Roth, Karlsruhe
N-Cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid	Merck, Darmstadt
Chloroform	Baker, Deventer (Niederlande)
4-Cumaroyl-CoA	Werner Heller, GSF, Neuherberg
Cyanidin-Chlorid	Roth, Karlsruhe
Delphinidin-Chlorid	Roth, Karlsruhe
Dihydrokämpferol	Roth, Karlsruhe
Dihydroquercetin	Roth, Karlsruhe
4-Dimethylaminozimtaldehyd	Merck, Darmstadt
Dowex 1x2	Fluka Chemie AG, Buchs (Schweiz)
Eisensulphat	Merck, Darmstadt
Eriodictyol	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Pharmacia Biotech, Uppsala (Schweden)

II. Material und Methoden

Ethylacetat	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure	Merck, Darmstadt
Folsäure	Merck, Darmstadt
Ga ₃	Acros Organics, Geel (Belgien)
Glukose	Baker, Deventer (Niederlande)
Glycerin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Glycin	Merck, Darmstadt
Hefe-Extrakt	Fluka Chemie AG, Buchs (Schweiz)
HEPES	Merck, Darmstadt
myo-Inosit	Merck, Darmstadt
Isoamylalkohol	Baker, Deventer (Niederlande)
Isopropanol	Merck, Darmstadt
4-Kaffeoyl-CoA	Werner Heller, GSF, Neuherberg
Kaliumdihydrogensulphat	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogensulphat	Merck, Darmstadt
Kaliumiodid	Merck, Darmstadt
Kaliumnitrat	Merck, Darmstadt
α -Ketoglutarat	Fluka Chemie AG, Buchs (Schweiz)
Kobalt(II)chlorid	Merck, Darmstadt
Kupfersulphat	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulphat	Merck, Darmstadt
2-Malonyl-CoA ¹⁴ C markiert	Moravek Biochemicals, Brea (USA)
Mangansulphat	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
NAA	Acros Organics, Geel (Belgien)
NADPH	Merck, Darmstadt
Naringenin	Roth, Karlsruhe
Natriumborhydrid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Baker, Deventer (Niederlande)
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriummolybdat	Merck, Darmstadt
Nicotinsäure	Merck, Darmstadt
Päonidin-Chlorid	Roth, Karlsruhe

II. Material und Methoden

Pelargonidin-Chlorid	Roth, Karlsruhe
Phenosafranin	Acros Organics, Geel (Belgien)
Polyethylenglycol 1500	Fluka Chemie AG, Buchs (Schweiz)
Polyvinylpolypyrrolidon	Fluka Chemie AG, Buchs (Schweiz)
Prohexadion-Ca BAS 125 10 W "Regalis"	BASF, Limburgerhof
Pyridoxin	Fluka Chemie AG, Buchs (Schweiz)
D(+)-Saccharose	Fluka Chemie AG, Buchs (Schweiz)
Salzsäure 37 %	Baker, Deventer (Niederlande)
Stickstoff (flüssig)	Linde, Höllriegelskreuth
Stickstoff (Gas)	Andlfinger, Freising
Thiamin HCl	Merck, Darmstadt
Toluol	Merck, Darmstadt
Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan	Baker, Deventer (Niederlande)
Zeatinribosid	Merck, Darmstadt
Zinksulphat	Merck, Darmstadt

II.1.d Enzyme

CHI aus Petersilienkultur	Werner Heller, GSF, Neuherberg
sämtliche Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas
reverse Transkriptase	Gibco BRL, Eggenstein
Taq-Polymerase	Promega, Mannheim

II.1.e Primer

Folgende Primer wurden verwendet :

- DFRAphi

5' TTA ACC AAC TTT GAC ATC AAC GAG 3'

-DFRApvo

5' ATG GGA TCC GAA TCC GTT 3'

Diese beiden Primer wurden bei MWG Biotech in Ebersberg hergestellt.

-Oligo-dT Anker-Primer

5' GAC CAC GCG TAT CGA TGT CGA C (T)₁₆ 3

II.1.f Organismen

Art	Sorte/Stamm/Linie	Herkunft
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	LBA 4404	Gibco BRL, Eggenstein
Kartoffel	Feska	LfL, Freising
	Producent	LfL, Freising
	Walli	LfL, Freising
Petunie	RL 01	am Institut
	V 33	am Institut
	W 39	am Institut
Rose	Crimson Glory	Kordes, Klein-Offenseth
	Frisco	Kordes, Klein-Offenseth
	Heckenzauber	BZZ, Ahrensburg
	Kardinal	Kordes, Klein-Offenseth
	Mariandl	Kordes, Klein-Offenseth
	Pariser Charme	BZZ, Ahrensburg
	Samba	Kordes, Klein-Offenseth
	Versicolor	Kordes, Klein-Offenseth
“Drewlo”	*)	

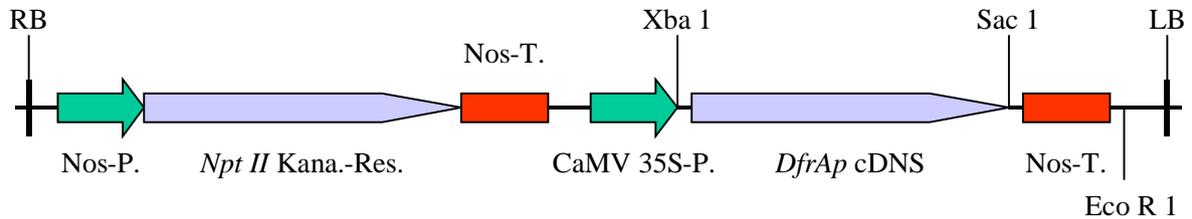
*) Die Sortenbezeichnung ist unbekannt. Es handelt sich um einen alten Rosenstrauch im Garten der Familie Drewlo in Kolbermoor.

II.1.g Plasmide

Das für die Transformation der Kartoffeln verwendete Plasmid pBi 121 *DfrAp* wurde freundlicherweise von Thilo Fischer, Lehrstuhl für Zierpflanzenbau der Technischen Universität München, zur Verfügung gestellt. Die tDNA enthält einen Selektionsmarker auf Kanamycin. Das inklonierte *Dfr*-Gen des Apfels ist mit einem CaMV 35 S Promotor (Cauliflower Mosaik Virus)

II. Material und Methoden

und einem Nos-Terminator (Nopalinsynthase) ausgestattet. Das eigentlich im Plasmid pBi 121 enthaltene β -Glucuronidase-Gen wurde entfernt und das Apfel-*Dfr*-Gen über Xba I und Sac I einkloniert. Das gesamte Konstrukt hat eine Länge von etwa 14000 bp.



tDNA des Transformationskonstrukts pBi 121 *DfrAp*; RB : right border; LB : left border; Nos-P. : Nopalinsynthase-Promotor; Nos-T. : Nopalinsynthase-Terminator; *Npt II* : Kanamycin-Resistenzgen; CaMV 35S : Cauliflower Mosaik Virus-Promotor

II.1.h Puffer

CTAB-Puffer	100 mM Tris 1,4 M NaCl 20 mM EDTA 2 % CTAB
10 x TAE	0,4 M Tris 0,05 M Natriumacetat 0,01 M EDTA pH 7,8 mit 100 % Essigsäure einstellen
TE	0,5 mM EDTA 10 mM Tris

II. Material und Methoden

II.1.i Medien

MS	1,25 mM KH_2PO_4 18,8 mM KNO_3 20,6 mM NH_4NO_3 1,5 mM MgSO_4 2,99 mM CaCl_2 100 μM H_3BO_3 112 μM MnSO_4 30 μM ZnSO_4 5 μM KI 1,03 nM Na_2MoO_2 105 pM CoCl_2 100 pM CuSO_4 100 μM Na_2EDTA 100 μM FeSO_4 26,6 μM Glycin 4,06 nM Nicotinsäure 2,95 nM Pyridoxin (Vitamin B6) 296 pM Thiamin (Vitamin B1) 555 μM Inosit 58,4 mM Saccharose pH 6,0 für Platten 6 g/l Agar-Agar
ER	wie MS 80,5 mM Glukose statt Saccharose zusätzlich : 5,69 μM Zeatinribosid 107 nM NAA 64 nM Ga_3 1,13 μM Folsäure 205 nM Biotin 296 μM Adenin 525 μM Cefotaxim pH 5,8 für Platten 6 g/l Agar-Agar
Kokultur-Medium	wie MS zusätzlich : 1 mM Acetosyringon 1 g/l Caseinhydrat pH 5,8 für Platten : 6 g/l Agar-Agar

II. Material und Methoden

Minimal A (für 1 l)	1 g (NH ₄) ₂ SO ₄ 4,5 g KH ₂ PO ₄ 10,5 g K ₂ HPO ₄ 0,5 g Natriumcitrat 2 g Glukose 1 ml 1 M MgSO ₄ 2 ml 0,5 M Acetosyringon
YEP (für 1 l)	10 g Bactopepton 10 g Hefe-Extrakt 5 g NaCl

II.2 Nachweis von Flavonoiden im Pflanzengewebe

II.2.a Extraktion von Flavonoiden

Zur Extraktion von Flavonoiden aus verschiedenen Pflanzengeweben wird das jeweilige Pflanzenmaterial im Verhältnis von 1:40 (g/ml) in das jeweilige Extraktionsmittel gelegt und für mindestens 24 std bei 4°C im Dunkeln extrahiert. Für den Nachweis von Anthocyanen wird Methanol-1 % HCl als Extraktionsmittel verwendet, für alle übrigen Flavonoide Methanol. Die Extrakte werden mit dem Rotationsverdampfer bis nahezu zur Trockene eingengt und danach wieder in 1 ml Methanol aufgenommen. Die so hergestellten Extrakte können bei 4 °C im Dunkeln längere Zeit gelagert werden.

Für quantitative Nachweise wurden jeweils 0,3 g Pflanzenmaterial in 10 ml Extraktionsmittel 24 std bei 4°C extrahiert. Anschließend wurde der Extrakt bis zur Trockene eingengt und in 600 µl Methanol wieder aufgenommen.

II.2.b Hydrolyse

Die meisten Flavonoide liegen in der Pflanzenzelle in Form von Glykosiden vor. Zum Nachweis der Aglyka ist eine Abspaltung der Zucker notwendig, was durch eine saure Hydrolyse erfolgt. Hierfür werden zu 100 µl eingengtem Pflanzenextrakt 100 µl 4 N HCl gegeben und anschließend 15 min bei 95 °C hydrolysiert. Nach dem Abkühlen erfolgt die Extraktion der Aglyka, wobei Anthocyanidine mit 100 µl Isoamylalkohol und alle anderen Flavonoide mit 100 µl Ethylacetat extrahiert werden. Das jeweilige Extraktionsmittel wird zugegeben, zusätzlich noch 100 µl Wasser um eine bessere Phasentrennung zu erreichen. Nach kräftigem Schütteln wird für 2 min

bei 14000 U/min zentrifugiert. Die Flavonoidaglyka befinden sich danach in der oberen Phase. Beim Nachweis von Flavan 3-olen und 3-Desoxyflavonoiden wird keine Hydrolyse durchgeführt.

II.3 Enzymologische Untersuchungen

II.3.a Enzymaufarbeitung aus Pflanzengewebe

Die Enzymextrakte für die Enzymtests wurden mit der Aufarbeitungsmethode nach Dellus (Dellus et al., 1997) hergestellt. Diese Aufarbeitungsmethode wurde für die Standardenzymtests wie im Folgenden aufgeführt abgewandelt.

Zunächst wird für den Extraktionspuffer 0,1 M HEPES pH 7,5 bis zum Sieden erhitzt und danach unter Stickstoffatmosphäre abgekühlt. Dabei werden unter ständigem Rühren 1,5 % PEG 1500, 10 % Saccharose, 100mM Na-Ascorbat und 25 mM CaCl₂ zugegeben. Der Extraktionspuffer sollte für jede Aufarbeitung frisch hergestellt werden. 400 mg Pflanzenmaterial werden mit 400 mg PVPP in flüssigem Stickstoff mehlfein gemörsert und 10x Extraktionspuffer (4 ml bei 400 mg Pflanzenmaterial) zugegeben. Nach vollständigem Auftauen wird das Homogenat für 20 min bei 20000 U/min und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird mit 400 mg Dowex 1x2 pH 7,5 auf Eis 15 min lang gerührt. Anschließend wird für 5 min bei 15000 U/min und 4 °C zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Dieser Enzymextrakt dient als Enzymquelle und kann in Aliquots aufgeteilt bei -70 °C gelagert werden.

II.3.b Herstellung radioaktiv markierter Substrate

Für Enzymtests wurden mit ¹⁴C radioaktiv markierte Substrate eingesetzt, welche mit heterolog exprimierten Enzymen hergestellt wurden. Die CHS und die FHT wurden dabei in *Escherichia coli* exprimiert, und die CHI stammt aus Zellsuspensionskulturen von Petersilie. Die Enzympräparationen von CHS und FHT wurden freundlicherweise von Dr. Stefan Martens, Britta Rohde und Regina Stefanek zur Verfügung gestellt, die CHI von Dr. Werner Heller, GSF-Forschungszentrum Neuherberg.

II. Material und Methoden

Herstellung von ^{14}C Naringenin und von ^{14}C Eriodictyol

Die Herstellung von ^{14}C Naringenin und ^{14}C Eriodictyol erfolgte mit einer abgewandelten Methode nach Britsch und Grisebach (Britsch und Grisebach, 1985). Ein Ansatz hat ein Volumen von 250 μl :

205 μl 0,1 M Tris pH 7,5

20 μl rekombinante CHS-Aufarbeitung

10 μl CHI-Aufarbeitung

3,1 μl 0,24 mM Malonyl-CoA (entspricht 0,75 nmol)

1,8 μl ^{14}C Malonyl-CoA (entspricht 0,75 nmol) mit 110000 dpm = 1830 Bq

für ^{14}C Naringenin : 10 μl 0,1 mM (0,1 nmol/ μl) 4-Cumaroyl-CoA (entspricht 1 nmol)

für ^{14}C Eriodictyol : 10 μl 0,1 mM (0,1 nmol/ μl) Kaffeoyle-CoA (entspricht 1 nmol)

50 bis 100 Ansätze werden für 60 min bei 37 °C in geschlossenen Reaktionsgefäßen inkubiert.

Herstellung von ^{14}C Dihydrokämpferol und ^{14}C Dihydroquercetin

^{14}C Dihydrokämpferol und ^{14}C Dihydroquercetin wurden mit einer abgewandelten Methode nach Britsch et al. (Britsch et al., 1992) aus ^{14}C Naringenin und ^{14}C Eriodictyol hergestellt. Ein Ansatz hat ein Volumen von 200 μl .

120 μl 0,1 M Tris pH 7,5

20 μl 0,65 mM FeSO_4 (entspricht 13 nmol)

20 μl 0,1 M Na-Ascorbat (entspricht 2 μmol)

20 μl 5,1 mM α -Ketoglutarat (entspricht 102 nmol)

20 μl rekombinante FHT-Aufarbeitung

für ^{14}C Dihydrokämpferol : 30000 dpm ^{14}C Naringenin

für ^{14}C Dihydroquercetin : 30000 dpm ^{14}C Eriodictyol

II. Material und Methoden

Zuerst wird das in Ethylacetat gelöste ^{14}C Naringenin oder ^{14}C Eriodictyol im Reaktionsgefäß mit einer Vakuumzentrifuge bis zur vollständigen Trockene eingedampft. Dann werden die einzelnen Bestandteile des Reaktionsansatzes zugegeben und 50 bis 100 Ansätze werden für 60 min bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ in offenen Reaktionsgefäßen inkubiert.

Nach der Inkubationszeit werden in die Ansätze jeweils $150\text{ }\mu\text{l}$ Ethylacetat gegeben. Die Reaktionsgefäße werden gut geschüttelt und anschließend für 2 min bei 14000 U/min zentrifugiert. Nun wird die Oberphase abgenommen und gesammelt. Diese Extraktion wird nochmals wiederholt und alle Extrakte vereinigt. Zur Mengenbestimmung werden $10\text{ }\mu\text{l}$, $20\text{ }\mu\text{l}$, $30\mu\text{l}$ und $50\text{ }\mu\text{l}$ des Extraktes auf eine Dünnschichtchromatographieplatte mit Zellosoeschicht aufgetragen, im Laufmittel CAW chromatographiert und anschließend auf dem Image-Screen exponiert. Die Mengenbestimmung erfolgte mit dem Bioscanner und dem Programm Tina 2.0.

II.3.c Enzymtests

Als Substrate für die Enzymtests dienen mit ^{14}C radioaktiv markierte Substanzen. Bei Standardtests für qualitative Nachweise der Enzymaktivität werden je $50\text{ }\mu\text{g}$ Gesamtprotein eingesetzt und für 30 min bei $25\text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Nach dieser Reaktionszeit werden $100\text{ }\mu\text{l}$ Ethylacetat zugegeben, einerseits um die Reaktion zu beenden, andererseits zur Extraktion der Flavonoide aus dem Enzymtestansatz. Der Ansatz mit Ethylacetat wird kräftig geschüttelt und für 2 min bei 14000 U/min zentrifugiert. Die Oberphase wird abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wird nochmals mit $50\text{ }\mu\text{l}$ extrahiert und der Extrakt mit der ersten Extraktion vereinigt. Der so erhaltene Extrakt kann zur Untersuchung auf eine Dünnschichtchromatographieplatte aufgetragen werden.

CHS-Test

$50\text{ }\mu\text{g}$ Gesamtprotein aus Enzymextrakt

$3,1\text{ }\mu\text{l}$ $0,24\text{ mM}$ Malonyl-CoA (entspricht $0,75\text{ nmol}$)

$1,8\text{ }\mu\text{l}$ ^{14}C Malonyl-CoA (entspricht $0,75\text{ nmol}$) mit $110000\text{ dpm} = 1830\text{ Bq}$

Substrate : $5\text{ }\mu\text{l}$ $0,1\text{ mM}$ ($0,1\text{ nmol}/\mu\text{l}$) 4-Cumaroyl-CoA (entspricht $0,5\text{ nmol}$)

oder $5\text{ }\mu\text{l}$ $0,1\text{ mM}$ ($0,1\text{ nmol}/\mu\text{l}$) Kaffeoylel-CoA (entspricht $0,5\text{ nmol}$)

Gesamtvolumen $100\text{ }\mu\text{l}$ mit $0,1\text{ M}$ Tris pH $7,5$ auffüllen

II. Material und Methoden

Die Inkubation erfolgt im geschlossenen Reaktionsgefäß. Für den Umsatz zu Naringenin wird 4-Cumaroyl-CoA eingesetzt und für den Umsatz zu Eriodictyol Kaffeoyl-CoA.

FHT-Test

50 µg Gesamtprotein aus Enzymextrakt
10 µl 0,65 mM FeSO₄ (entspricht 6,5 nmol)
10 µl 0,1 M Na-Ascorbat (entspricht 1 µmol)
10 µl 5,1 mM α-Ketoglutarat (entspricht 51 nmol)
Gesamtvolumen 200 µl mit 0,1 M Tris pH 7,5 auffüllen
Substrate : 3000 dpm ¹⁴C Naringenin
 oder 3000 dpm ¹⁴C Eriodictyol

Durch Zugabe von 30 µl von 14 mg/ml Prohexadion-Ca (BAS 125 10 W „Regalis“) kann der Umsatz vollständig gehemmt werden.

Zuerst wird das in Ethylacetat gelöste ¹⁴C Naringenin oder ¹⁴C Eriodictyol im Reaktionsgefäß in der Vakuumzentrifuge bis zur vollständigen Trockene eingedampft. Dann werden die einzelnen Bestandteile des Reaktionsansatzes zugegeben. Die Inkubation erfolgt im offenen Reaktionsgefäß.

DFR-Test

50 µg Gesamtprotein aus Enzymextrakt
10 µl 20 µM NADPH (entspricht 0,2 nmol)
Gesamtvolumen 200 µl mit 0,1 M Tris pH 7,5 auffüllen
Substrate : 3000 dpm ¹⁴C Dihydrokämpferol
 oder 3000 dpm ¹⁴C Dihydroquercetin

Zuerst wird das in Ethylacetat gelöste ¹⁴C Dihydrokämpferol oder ¹⁴C Dihydroquercetin im Reaktionsgefäß in der Vakuumzentrifuge bis zur vollständigen Trockene eingedampft. Dann werden die einzelnen Bestandteile des Reaktionsansatzes zugegeben. Die Inkubation erfolgt im offenen Reaktionsgefäß.

F3^H-Test

50 µg Gesamtprotein aus Enzymextrakt
10 µl 20 µM NADPH (entspricht 0,2 nmol)
Gesamtvolumen 200 µl mit 0,1 M Tris pH 7,5 auffüllen
Substrate : 3000 dpm ¹⁴C Naringenin
oder 3000 dpm ¹⁴C Dihydrokämpferol

Zuerst wird das in Ethylacetat gelöste ¹⁴C Naringenin oder ¹⁴C Dihydrokämpferol im Reaktionsgefäß in der Vakuumzentrifuge bis zur vollständigen Trockene eingedampft. Dann werden die einzelnen Bestandteile des Reaktionsansatzes zugegeben. Die Inkubation erfolgt im offenen Reaktionsgefäß.

FLS-Test

50 µg Gesamtprotein aus Enzymextrakt
10 µl 0,65 mM FeSO₄ (entspricht 6,5 nmol)
10 µl 0,1 M Na-Ascorbat (entspricht 1 µmol)
10 µl 5,1 mM α-Ketoglutarat (entspricht 51 nmol)
Gesamtvolumen 200 µl mit 0,1 M Tris pH 7,5 auffüllen
Substrate : 3000 dpm ¹⁴C Dihydrokämpferol
oder 3000 dpm ¹⁴C Dihydroquercetin

Zuerst wird das in Ethylacetat gelöste ¹⁴C Dihydrokämpferol oder ¹⁴C Dihydroquercetin im Reaktionsgefäß in der Vakuumzentrifuge bis zur vollständigen Trockene eingedampft. Dann werden die einzelnen Bestandteile des Reaktionsansatzes zugegeben. Die Inkubation erfolgt im offenen Reaktionsgefäß.

FNR-Test

50 µg Gesamtprotein aus Enzymextrakt
10 µl 20 µM NADPH (entspricht 0,2 nmol)
30 µl 14 mg/ml Prohexadion-Ca (BAS 125 10 W „Regalis“)
Gesamtvolumen 200 µl mit 0,1 M Tris pH 6,0 auffüllen
Substrate : 3000 dpm ¹⁴C Eriodictyol
 3000 dpm ¹⁴C Naringenin

Zuerst wird das in Ethylacetat gelöste ¹⁴C Eriodictyol oder ¹⁴C Naringenin im Reaktionsgefäß in der Vakuumentrifuge bis zur vollständigen Trockene eingedampft. Dann werden die einzelnen Bestandteile des Reaktionsansatzes zugegeben. Die Inkubation erfolgt im offenen Reaktionsgefäß. Die Zugabe von Prohexadion-Ca soll die starke, im Enzymextrakt vorhandene Aktivität der FHT hemmen, welche sonst die als Substrat eingesetzten Flavanone zu Dihydroflavonolen umsetzen würde.

ANS-Test

50 µg Gesamtprotein aus Enzymextrakt
10 µl 20 µM NADPH (entspricht 0,2 nmol)
Gesamtvolumen 200 µl mit 0,1 M Tris pH 7,5 auffüllen
Substrate : 3000 dpm ¹⁴C Dihydroquercetin

Zuerst wird das in Ethylacetat gelöste ¹⁴C Dihydroquercetin im Reaktionsgefäß in der Vakuumentrifuge bis zur vollständigen Trockene eingedampft. Dann werden die einzelnen Bestandteile des Reaktionsansatzes zugegeben. Die Inkubation erfolgt im offenen Reaktionsgefäß. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 25 °C werden zugegeben :

50 µg Gesamtprotein aus Enzymextrakt
10 µl 0,65 mM FeSO₄ (entspricht 6,5 nmol)
10 µl 0,1 M Na-Ascorbat (entspricht 1 µmol)
10 µl 5,1 mM α-Ketoglutarat (entspricht 51 nmol)

Nochmals wird für 30 min bei 25 °C inkubiert. Die Extraktion erfolgt wie bei allen anderen Testansätzen, jedoch mit Isoamylalkohol statt mit Ethylacetat

II.4 Dünnschichtchromatographie

Sowohl die in den verschiedenen untersuchten Pflanzengewebe enthaltenen Flavonoide, als auch die radioaktiv markierten Produkte aus den Enzymtests wurden mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und nachgewiesen. Für die Dünnschichtchromatographie wurden je nach Laufmittel Dünnschichtplatten mit Zellulose- oder Kieselgelbeschichtung verwendet. Die nachzuweisenden Substanzen werden mit einer Glaskapillare auf die Platten aufgetragen. Die Wahl des Laufmittels hängt von den aufzutrennenden Stoffen ab. Folgende Laufmittel wurden verwendet :

Tabelle 1 : Laufmittel für die Dünnschichtchromatographie

	Zusammensetzung	Verhältnis	Beschichtung
BAW	n-Butanol, Eisessig, Wasser	6 / 1 / 2	Zellulose
CAW	Chloroform, Eisessig, Wasser	10 / 9 / 1	Zellulose
Forestal	Eisessig, 37 % HCl, Wasser	30 / 3 / 10	Zellulose
TAA	Toluol, Aceton, Ameisensäure	3 / 6 / 1	Kieselgel

Die bei der Chromatographie aufgetrennten Stoffe werden durch den Vergleich mit zusätzlich auf die Dünnschichtplatte aufgetragenen Vergleichssubstanzen nachgewiesen. Beim Nachweis von radioaktiven Stoffen aus Enzymtests laufen die Vergleichssubstanzen in derselben Spur mit wie die Produkte aus dem Enzymtest, so daß ein direkter Vergleich der radioaktiv markierten Produkte und der Vergleichssubstanzen möglich ist. Eine weitere Möglichkeit des Nachweises von bestimmten Stoffen besteht in der Bestimmung des Rf-Wertes. Der Rf-Wert ist der Quotient aus der Laufstrecke der Substanz und der Laufstrecke des Laufmittels. Dies ist jedoch ziemlich ungenau, und wird nur herangezogen, wenn für einen Stoff keine Vergleichssubstanz zur Verfügung steht, jedoch der Rf-Wert bekannt ist. Allerdings gibt der Rf-Wert Auskunft darüber, in welcher Reihenfolge die verschiedenen Stoffe auf der Dünnschichtplatte laufen und wie gut die Auftrennung zweier Stoffe in einem bestimmten Laufmittel ist.

Tabelle 2 : Rf-Werte einiger Flavonoide in den verwendeten Laufmitteln

	BAW	CAW	Forestal	TAA
Catechin	61	12	73	81
Cyanidin	67	14	46	
Delphinidin			32	
Dihydrokämpferol	90	68	86	
Dihydromyricetin		11	71	
Dihydroquercetin	84	35	79	88
Epicatechin	47	10		81
Eriodictyol	88	61	82	89
Kämpferol	84	68	55	
Leucocyanidin	50	8	55	
Leucopelargonidin		18		
Luteoforol	81	18		
Luteoliflavan	78	25		88
Naringenin	94	88	91	
Päonidin	71		63	
Pelargonidin	80		68	
Pentahydroxyflavanon		29	74	
Quercetin	69	20	41	

II.4.a Nachweis nichtradioaktiver Flavonoide

Während die Anthocyanidine auf der Dünnschichtplatte direkt erkennbar sind, sind die übrigen Flavonoide nur unter UV-Licht oder nach Färbereaktionen sichtbar. Für den Nachweis von Flavononen und Flavonolen wird die vollständig trockene Dünnschichtplatte mit einer Lösung aus 100 mg Natriumborhydrid, 1 ml Wasser und 9 ml Isopropanol besprüht, anschließend mit rauchender 37 % Salzsäure bedampft und dabei die Rückseite der Platte warm angeblasen. Die Flavonone färben sich ähnlich wie die entsprechend am B-Ring hydroxylierten Anthocyanidine, die Flavonole erscheinen deutlich gelb. Um Catechin, Epicatechin und Luteoliflavan nachzuweisen wird die Dünnschichtplatte mit einer Lösung aus 6 N HCl in Ethanol mit 0,1 % 4-(Dimethylami-

no)-zimtaldehyd besprüht und mit einem Fön getrocknet. Die Substanzen färben sich dabei gelbgrün.

II.4.b Nachweis radioaktiver Flavonoide

Für den Nachweis von mit ^{14}C radioaktiv markierten Flavonoiden wurde die vollständig trockene Dünnschichtplatte für mindestens 3 std auf einem Image-Screen exponiert und dieser dann mit dem Fujix BAS 1000 Bioscanner eingelesen. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Tina 2.0.

II.5 Photometrische Bestimmungen

II.5.a Gesamtproteinbestimmung nach Bradford

Wasser	800 μl
Bradford-Proteinassay	200 μl
Enzymlösung	1 μl

Für den Blindprobenansatz wird die Enzymlösung weggelassen. Beim Bradford-Proteinassay handelt es sich um den Farbstoff Coomassie Brilliant Blau G-250 in saurer Lösung. Dieser bindet an Proteine, wobei eine Verschiebung seines Absorptionsmaximums von 465 nach 595 nm eintritt (Bradford, 1976).

Um innerhalb des Meßbereiches des Photometers zu bleiben kann es nötig sein die Enzymlösung vor der Messung 1:1 mit Wasser zu verdünnen, und wegen der Ungenauigkeit dieser Methode wird jeweils eine dreifache Messung durchgeführt. Die Absorption der Probe wird bei 595 nm gegen die des Blindprobenansatzes gemessen, und anschließend der Proteingehalt mit einer Standard-Eichkurve für BSA ermittelt.

II.5.b Photometrische Mengenbestimmung von DNA

Die optische Dichte wäßriger DNA-Lösungen wird bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen, wobei bei doppelsträngiger DNA 1 OD(260nm) einer Konzentration von 50 µg/ml entspricht. Zur Messung ihrer optischen Dichte müssen DNA-Lösungen meistens verdünnt werden, wofür oft ein Verdünnungsfaktor von 200 vorteilhaft ist, was 5 µl DNA-Lösung in 1 ml Wasser entspricht. Dieser Verdünnungsfaktor Y muß bei der Berechnung der DNA-Konzentration berücksichtigt werden. Es ergibt sich daher folgende Rechnung :

$$c(\text{DNA}) [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}(260\text{nm}) \times 50 \mu\text{g/ml} \times Y$$

II.5.c Photometrische Mengenbestimmung von RNA

Wie bei DNA wird auch die optische Dichte wäßriger RNA-Lösungen bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen, wobei 1 OD(260nm) einer Konzentration von 40 µg/ml entspricht. Zur Messung ihrer optischen Dichte müssen auch RNA-Lösungen verdünnt werden. Empfehlenswert ist auch hier der Faktor 200, was 5 µl RNA-Lösung in 1 ml Wasser entspricht. Dieser Verdünnungsfaktor Y muß ebenfalls bei der Berechnung der RNA-Konzentration berücksichtigt werden, so daß sich folgende Rechnung ergibt :

$$c(\text{RNA}) [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}(260\text{nm}) \times 40 \mu\text{g/ml} \times Y$$

II.6 Präparationen von DNA und RNA

II.6.a Präparation von Plasmiden aus *Agrobacterium tumefaciens*

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *Agrobacterium tumefaciens* erfolgte mit dem E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit von Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen nach Angaben des Herstellers für Low-Copy Plasmide.

II.6.b Präparation genomischer DNA aus Kartoffeln

Die Präparation genomischer DNA aus Kartoffeln erfolgte mit Blattmaterial von Pflanzen aus der *in vitro*-Kultur. Zum Zellaufschluß werden 250 mg Blattmaterial mit 1 ml CTAB-Puffer gemörsert. Der so erhaltene Pflanzensaft wird in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und für 1 std bei 60 °C inkubiert. Danach wird zum auf Raumtemperatur abgekühlten Pflanzensaft 1 ml Chloroform/Isoamylalkohol (49 : 1) gegeben und gut geschüttelt, zur Trennung der Phasen wird für 5 min bei 14000 U/min zentrifugiert. Anschließend werden 850 µl des wäßrigen Überstandes in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt und wiederum 850 µl Chloroform/ Isoamylalkohol (49 : 1) zugegeben. Nach gutem Schütteln und erneuter Zentrifugation bei 14000 U/min für 5 min werden 700 µl des wäßrigen Überstandes in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 500 µl Isopropanol zugegeben. Nun wird das Reaktionsgefäß vorsichtig gedreht bis sich ein DNA-Knäuel bildet. Dieses Knäuel wird mit einer Impföse herausgeholt und in einem neuen 1,5 ml Reaktionsgefäß in 500 µl Ethanol von der Impföse abgelöst. Nun wird für 10 min bei 14000 U/min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und 500 µl 70 % Ethanol zugegeben. Bei 14000 U/min wird nochmals 5 min lang zentrifugiert, der Überstand abgenommen und nochmals für 30 sek zentrifugiert. Nun kann auch das restliche Ethanol entfernt werden. Das DNA-Pellet wird für einige min bei Raumtemperatur getrocknet. Die DNA wird in 100-150 µl TE gelöst.

II.6.c Präparation von Gesamt-RNA aus Kartoffelblättern

Gesamt-RNA wurde aus ganz jungen Blättern von im Freiland wachsenden Kartoffeln präpariert. Bei dieser Arbeit ist ein Auftauen des Materials unbedingt zu vermeiden, um RNase-Aktivität zu verhindern. Die Präparation erfolgte mit dem RNeasy Plant Mini Kit von Qiagen nach Angaben des Herstellers.

II.6.d Reverse Transkription

Mit reverser Transkription wird mRNA in cDNA umgeschrieben. 5 µg Gesamt-RNA werden in 14 µl Wasser gelöst, dann wird 1 µl Oligo-dT Anker-Primer (25 µM) zugegeben und gut durch-

II. Material und Methoden

gemischt. Dieser Ansatz wird für 5 min auf 70 °C gestellt, danach auf Eis abgekühlt. Nun wird zugegeben :

5 µl First Strand Puffer 5x

2 µl 100 mM DTT

1 µl 10 mM dNTPs

Nach guter Durchmischung wird dieser Ansatz für 2 min auf 42 °C gestellt, danach wird 1 µl Reverse Transkriptase (200 u) zugegeben. Dieser gesamte Ansatz wird nun folgendermassen inkubiert :

20 min bei 42 °C

20 min bei 48 °C

10 min bei 70 °C

Danach wird mit Ethanol gefällt und das vollständig getrocknete Pellet in 50 µl T0,1E aufgenommen. 10 µl davon können zum Nachweis auf ein Agarosegel aufgetragen werden.

II.7 Allgemeine molekularbiologische Techniken

II.7.a Restriktionsverdau

DNA	etwa 1/10 Volumen des Gesamtansatzes
10x BSA	1/10 Volumen des Gesamtansatzes
10x Restriktionspuffer	1/10 Volumen des Gesamtansatzes
Restriktionsenzym	etwa 4 u je µg DNA
Wasser	restliches Volumen

Für analytische Verdauansätze eignet sich ein Gesamtvolumen von 20 µl. Die Wahl des Restriktionspuffers richtet sich nach den Angaben des Herstellers, ebenso wie die Inkubationstemperatur, die für die meisten Restriktionsenzyme jedoch bei 37 °C liegt. Bei der jeweiligen Temperatur werden die Verdauansätze für etwa 30 min inkubiert. Ein Verdau mit mehreren Enzymen gleich-

zeitig kann dann erfolgen, wenn die Enzyme im selben Restriktionspuffer eine genügend hohe Aktivität aufweisen.

II.7.b DNA-Fällung

Zu einer wäßrigen DNA-Lösung wird ein Zehntel Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,2 und ein Volumen Isopropanol, oder zwei Volumen Ethanol gegeben und gut vermischt, wobei das Reaktionsgefäß nicht stark geschüttelt werden sollte. Dieses Gemisch wird nun für 15 min auf Eis gestellt und danach für 10 min bei 14000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und verworfen, auf das verbleibende Pellet werden 150-200 µl 70 % Ethanol gegeben und nochmals kurz zentrifugiert. Der Überstand wird wiederum abgenommen und verworfen, und das Pellet wird nach kurzer Trocknung bei Raumtemperatur in TE gelöst.

II.7.c RNA-Fällung

Die Fällung von RNA aus einer wäßrigen Lösung geschieht ähnlich wie die Fällung von DNA, jedoch kann RNA nur mit Ethanol gefällt werden.

II.7.d PCR

Mit Hilfe von PCR wird aus cDNA, genomischer DNA oder auch aus einem Plasmid ein bestimmtes DNA-Stück amplifiziert. Das Volumen eines Ansatzes beträgt dabei 50 µl :

3,0 µl 25 mM MgCl₂

5,0 µl 10x Taq Polymerase-Puffer

1,0 µl cDNA in Wasser (soll etwa 10-20 ng DNA enthalten)

1,0 µl 10 mM dNTPs

2,5 µl 10 µM 5'-Primer

2,5 µl 10 µM 3'-Primer

0,5 µl Taq-Polymerase (1-2 u)

34,5 µl Wasser

II. Material und Methoden

In dieser Arbeit wurden folgende verwendete PCR-Bedingungen angewandt:

Zeit	Temperatur	Zyklusanzahl
1,5 min	94 °C	1
0,5 min	94 °C	40
1,0 min	60 °C	
2,0 min	72 °C	
10,0 min	72 °C	1
1,0 min	4 °C	1

Die Schmelztemperatur hängt dabei von der Länge und der Sequenz der verwendeten Primer ab.

II.7.e Agarosegelelektrophorese

400 ml 1x TAE
4 g Agarose (= 0,8 %)
1 %-Agarosegel (400 ml)
40 µl Ethidiumbromid-Lösung (= 1/10000
Volumen)

DNA-Stücke können durch Agarosegelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt werden, wobei sich kleinere Stücke schneller von der Kathode zur Anode durch das Gel bewegen als größere. Für Stücke oberhalb 400 bp werden 1 % Agarosegele verwendet, während kleinere Stücke in höherkonzentrierten Gelen aufgetrennt werden. Durch die Beimischung des mit der DNA interkalierenden Farbstoffes Ethidiumbromid in das Gel können die DNA-Banden unter UV-Licht mit 312 nm Wellenlänge sichtbar gemacht, und somit auch zur Abschätzung der Stücklänge mit einem im Gel mitgelaufenen DNA-Längenstandard verglichen werden.

Das Agarosegel wird so lange aufgekocht, bis es klar und ohne Schlieren vorliegt. Dann wird es in ein abgedichtetes Gelschiffchen mit eingehängtem Kamm etwa 5-7 mm hoch gegossen. Ist das Gel fest geworden, so wird der Kamm entfernt und das Gel wird in eine mit 1x TAE gefüllte Elektrophoresekammer gelegt, wobei es dann vollständig von TAE bedeckt sein muß. Die zu untersuchende und mit einem Zehntel Volumen DNA-Auftragspuffer versehene DNA-Lösung wird in die Geltaschen gegeben, und anschließend eine Gleichspannung von 1-5 V je cm Elektroden-

zwischenraum angelegt. Die meisten hier verwendeten Gele sind bei 100 V gefahren worden, bis die Bromphenolblau-Front etwa zwei Drittel des Gels durchlaufen hat. Nach Abbruch der Elektrophorese können die DNA-Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

II.8 Pflanzenkultur

II.8.a Gewächshaus- und Freilandkulturen

Die Kultur der Pflanzen erfolgte in den Gewächshäusern und auf den Freilandflächen des Lehrstuhls für Zierpflanzenbau, Technische Universität München, in der Versuchsstation Dürnast in Freising-Weihenstephan. Transgene Kartoffeln wurden in den Gewächshäusern der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft in Freising-Weihenstephan kultiviert. Die *in vitro*-Kultur von transgenen und nicht transgenen Kartoffeln erfolgte größtenteils ebenfalls an der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft in Freising-Weihenstephan, teilweise auch am Lehrstuhl für Zierpflanzenbau der Technischen Universität München in Freising-Weihenstephan.

II.8.b *in vitro*-Kultur von Kartoffeln

Sowohl transgene als auch untransformierte Kartoffeln in der *in vitro*-Kultur wuchsen einzeln in verschließbaren Reagenzgläsern auf MS-Medium bei 20 °C und 16 std Licht am Tag. Die Pflanzen können vermehrt werden, indem 5 bis 10 mm lange Sproßabschnitte, die jeweils eine Blattachsel enthalten, in Reagenzgläsern auf frisches MS-Medium gesetzt werden. Dort bildet sich aus dem Blattachselmeristem ein neuer Sproß, der dann bewurzelt.

II.8.c Behandlung mit Prohexadion-Ca

Die Behandlung der Pflanzen erfolgte mit einer Lösung aus 0,1 % Prohexadion-Ca BAS 125 10 W “Regalis” in Wasser, was 1 g/l entspricht. BAS 125 10 W “Regalis” enthält 10 % reines Prohexadion-Ca, so daß die Konzentration an reinem Prohexadion-Ca bei 0,01 %, was 0,1 g/l entspricht, lag. Diese Lösung wurde mit einer Handspritze auf die Pflanzen verteilt. Die Behandlung erfolgte einmal täglich und wurde je nach Versuch mehrere Tage fortgesetzt.

II.9 Transformationstechniken

II.9.a Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Herstellung kompetenter Zellen

Vor der Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* müssen kompetente Zellen hergestellt werden. Kommen die Bakterien aus einer Glycerindauerkultur, so werden sie zunächst für 2 Tage bei 28 °C auf festem YEB-Medium mit entsprechenden Antibiotika zur Selektion bebrütet, bis sich deutliche Kolonien bilden. Eine Kolonie wird in 16 ml antibiotikafreies YEB-Medium mit 10 mM MgSO₄ gesetzt und über Nacht bei 28 °C bebrütet. Danach wird die Kultur in 400 ml YEB-Medium mit 10 mM MgSO₄ überführt und weiter bei 28 °C bebrütet, bis eine OD₆₀₀ zwischen 0,1 und 0,5 erreicht ist, was nach etwa 4 bis 6 std der Fall ist. Nun wird die Bakteriensuspension auf Eis abgekühlt und bei 4°C für 15 min bei 4000 U/min zentrifugiert. Das Bakterienpellet wird in 200 ml eiskaltem 1 mM HEPES-Puffer pH 7,5 aufgenommen. Wiederum wird für 15 min bei 4000 U/min und 4 °C zentrifugiert und das Pellet nun in 100 ml eiskaltem 1 mM HEPES-Puffer pH 7,5 aufgenommen. Nochmals wird für 10 min bei 4000 U/min und 4 °C zentrifugiert und das Pellet diesmal in 10 ml eiskaltem 1 mM HEPES-Puffer pH 7,5 mit 10 % Glycerin aufgenommen. Ein weiteres Mal wird bei 4 °C und 4000 U/min für 7 min zentrifugiert und das Pellet anschließend in 1 ml eiskaltem 1 mM HEPES-Puffer pH 7,5 mit 10 % Glycerin aufgenommen. Diese Bakteriensuspension wird nun in Aliquots zu je 50 µl aufgeteilt, diese werden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und können über längere Zeit bei -70 °C gelagert werden.

Transformation mit Elektroporation

Die Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* erfolgt mit Elektroporation. Ein Aliquot kompetenter Zellen wird auf Eis aufgetaut. Zur Bakteriensuspension werden 10 bis 50 ng des zu transformierenden Plasmids hinzugefügt. Dieses Gemisch wird zwischen die Elektroden einer vorgekühlten Elektroporationsküvette gegeben. Nachdem die Küvette in den Elektroporator eingesetzt worden ist, wird ein Spannungsimpuls von 1500 V und 5 msec Dauer angelegt. Unmittelbar danach werden 500 µl auf 28 °C vorgewärmtes YEB-Medium zugegeben und die Suspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Diese Kultur wird nun für 2 std bei 28 °C und 150 U/min bebrütet. Danach werden jeweils 50 µl, 100 µl und 200 µl dieser Kultur auf festem YEB-Medium

mit entsprechenden Antibiotika zur Selektion ausgestrichen. Nach 2-3 Tagen Bebrütung bei 28 °C sollten auf den Platten Bakterienkolonien erscheinen.

II.9.b Transformation von Kartoffeln

Die Transformation von Kartoffeln geschieht mit *Agrobacterium tumefaciens*. Zur Transformation und Regeneration werden Internodienabschnitte von Kartoffelpflanzen verwendet, die unter sterilen Bedingungen in der *in vitro*-Kultur wachsen.

Eine frisch gewachsene Kolonie von Agrobakterien, welche das in die Kartoffel zu transformierende Konstrukt enthalten, wird in 4 ml YEP mit den entsprechenden, zur Selektion notwendigen Antibiotika, überführt. Diese Kultur wird bei 28 °C und etwa 150 U/min über Nacht bebrütet, die Bakterien sollten dann dicht gewachsen sein. Nun wird diese Kultur in 40 ml Minimal A-Medium überführt und bei 28 °C und 120 U/min für weitere 2 bis 5 std bebrütet.

Internodien sind die Sproßabschnitte zwischen den einzelnen Blattachsen. Diese Internodien werden in etwa 5 mm lange Stücke geschnitten und bis zur Verwendung in steriles Wasser gelegt. Bei der Präparation muß darauf geachtet werden, daß sich an den Internodienabschnitten kein Achselmeristem befindet. Die Internodienabschnitte werden nun in die Minimal A-Agrobakterienkultur gelegt und dort unter leichtem Schütteln für etwa 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden die Internodienabschnitte aus der Bakteriensuspension wieder herausgenommen und auf Filterpapier getrocknet. Anschließend werden sie auf Platten mit Kokulturmmedium gelegt, wo sie für 2 bis 3 Tage im Dunkeln bei 18 °C inkubiert werden.

Nach 2 bis 3 Tagen Kokultur wird die erste Subkultur angelegt. Dazu werden die Internodienabschnitte von der Kokulturplatte genommen, und für 5 min in sterilem Wasser gewaschen. Anschließend werden die Internodienabschnitte für etwa 15 min in 500 mg/l Cefotaxim getaucht, um die übrigen Agrobakterien abzutöten. Nocheinmal wird für 5 min mit sterilem Wasser gewaschen, bevor die Internodienabschnitte auf Filterpapier getrocknet und dann auf ER-Medium, das das entsprechende Antibiotikum zur Selektion enthält, gelegt werden. Die transgenen Kartoffelpflanzen wurden in dieser Arbeit mit 50 mg/l Kanamycin selektiert. Auf diesem Medium werden die Internodienabschnitte bei 24 °C und 16 std Licht am Tag kultiviert, wobei sie alle zwei Wochen auf frisches ER-Medium umgesetzt werden müssen.

II.9.c Regeneration transgener Kartoffelpflanzen

Ab etwa der zweiten Subkultur bilden sich an den Internodienabschnitten Kalli und in weiteren Kulturen dann auf den Kalli vollständige Sprosse. Diese Sprosse werden vom Kallus entfernt und einzeln in ein Reagenzglas mit MS-Medium und Antibiotikum zur Selektion gesetzt. Die Sprosse bilden in diesem Medium dann Wurzeln aus. Die so entstandenen Pflanzen können in der *in vitro*-Kultur auf die gleiche Weise wie untransformierte Pflanzen vermehrt werden. Jedoch werden die Sproßabschnitte transgener Pflanzen auf MS-Medium mit Antibiotikum zur Selektion gesetzt. Mit PCR kann nun aus genomischer DNA dieser Pflanzen das transformierte Gen nachgewiesen werden. Diejenigen Pflanzen, welche das transformierte Gen enthalten, werden auf MS-Medium ohne Selektion gesetzt und neu bewurzelt. Sind die Pflanzen etwa 8 cm groß können sie aus der *in vitro*-Kultur auf normale Erde überführt und im Gewächshaus weiter kultiviert werden.

II.10 Inokulationsversuche mit Sternrußtau

Die Inokulationsversuche wurden an Laubblättern der Rosensorten „Pariser Charme“ und „Hekkenzauber“ durchgeführt. Die Blätter sollten sich dabei alle etwa im gleichen Entwicklungsstadium befinden. Für die Versuche in dieser Arbeit wurden jüngere, vollständig ausgebildete Laubblätter verwendet.

II.10.a Kultur des Sternrußtaus

Die Sternrußtaukulturen wurden freundlicherweise von Dr. Thomas Debener, Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen, Institut für Zierpflanzenzüchtung, in Ahrensburg zur Verfügung gestellt. Sternrußtau wird auf Laubblättern von Rosen kultiviert und alle zwei Wochen auf neue Blätter umgesetzt.

Dazu werden junge, vollständig ausgebildete Blätter der Sorten „Pariser Charme“ oder „Mariandele“ verwendet. Die Blätter werden unter fließendem Wasser abgewaschen, die obere Wachsschicht abgerieben und anschließend werden die Blätter trocken getupft. Dann werden die Blätter mit der Blattoberseite nach oben auf eine doppelte Lage feuchtes Papier in eine Plastikkiste gelegt. Die Inokulation mit Sternrußtau und die weitere Behandlung erfolgt wie im Weiteren be-

schrieben. Nach etwa zwei Wochen bilden sich auf den Inokulationspunkten Konidien. In dieser Entwicklungsstufe hat der Pilz die höchste Infektiosität erreicht.

II.10.b Herstellung der Inokulationslösung

Die Konidien werden in 10 ml Wasser in einem kleinen Becherglas von den Blättern abgewaschen. Vor der erneuten Inokulation werden die Konidien auf ihre Vitalität überprüft. Dazu werden zu 40 µl der Konidienlösung 40 µl 0,1 % Phenosafraninlösung gegeben. Unter dem Lichtmikroskop erscheinen die aus zwei Zellen aufgebauten Sternrußtaukonidien länglich und bananenförmig. Ungefärbte Zellen sind dabei vital, gefärbte Zellen dagegen tot. Mit einer Neubauer-Zählkammer wird nun die Konidienkonzentration bestimmt, wobei nur Konidien berücksichtigt werden, die noch mindestens eine vitale, also ungefärbte, Zelle aufweisen. Die Konidienkonzentration sollte für die Inokulation 10^5 Konidien/ml betragen. Ist die Konzentration zu hoch, so kann die Suspension weiter verdünnt werden. Ist die Konzentration dagegen zu niedrig, wird die Suspension für 15 min bei 4500 U/min zentrifugiert und das Pellet anschließend in einem geringeren Volumen Wasser wieder aufgenommen.

II.10.c Inokulation der Rosenblätter

Zunächst werden die Blätter unter fließendem Wasser abgewaschen, um möglicherweise anhaftende Pilzsporen oder Spritzmittelrückstände zu entfernen. Anschließend wird die obere Wachsschicht der Blätter vorsichtig abgerieben, um eine bessere Anhaftung der Inokulationslösung zu ermöglichen. Die auf diese Weise vorbehandelten Blätter werden mit der Blattoberseite nach oben auf eine doppelte Lage feuchtes Papier in eine Plastikkiste gelegt.

Zur Konidien suspension wird 0,001 % Tween 20 gegeben, um die Oberflächenspannung herabzusetzen, was den Auftrag auf die Blattfläche erleichtert. Mit einer Pipette werden nun auf jedes Blatt etwa 10 Tropfen der Konidien suspension zu je 20 µl aufgetragen. Anschließend werden die Kisten mit den Blättern leicht geöffnet bei Raumtemperatur ins Dunkle gestellt. Nach zwei bis drei Tagen werden die Tropfen wieder mit der Pipette entfernt, damit der Pilz genügend Sauerstoff für sein weiteres Wachstum bekommen kann. Nach etwa 10 bis 14 Tagen erscheinen die ersten dunkelbraunen Stellen, auf denen sich kurz darauf Acervuli mit frischen Konidien bilden.

II.10.d Versuche mit Prohexadion-Ca

Zur Untersuchung, ob die Behandlung mit Prohexadion-Ca bei der Rose eine gesteigerte Resistenz gegen Sternrußtau verursacht, wurden Pflanzen der Sorten „Pariser Charme“ und „Heckenzauber“ einmalig 4-6 Tage vor der Inokulation mit Prohexadion-Ca behandelt (Stefanek, nicht veröffentlicht) .

II.10.e Auswertung

Bei der Auswertung werden nur diejenigen Inokulationsstellen berücksichtigt, auf denen sich Acervuli und damit neue Konidien befinden. Zur Auswertung wird bei den behandelten und unbehandelten Blättern jeweils der Anteil der Inokulationsstellen mit Acervulibildung ermittelt. Diese beiden Werte werden ins Verhältnis gesetzt.

III. Ergebnisse

III.1 Die Flavonoidbiosynthese in Laubblättern von Rosen

Enzymologische und biochemische Untersuchungen zur Flavonoidbiosynthese konzentrierten sich bei Rosen bisher nur auf die Blütenblätter (Elsherif 2000). Über das Flavonoidmuster und die ablaufenden Flavonoidbiosynthesewege in den Laubblättern lagen bisher keine Erkenntnisse vor. Die Laubblätter stellen jedoch die Angriffspunkte für Pathogene wie Sternrußtau (*Diplocarpon rosae*) oder Mehltau (*Podosphaera pannosa*) dar, weshalb im Hinblick auf eine mögliche, durch die Behandlung mit Prohexadion-Ca verursachte und auf der damit verbundenen Umleitung der Flavonoidbiosynthese beruhende, gesteigerte Resistenz die Kenntnis der in den Laubblättern ablaufenden Flavonoidbiosynthesewege notwendig ist. Für diese Untersuchung wurde bei verschiedenen Rosensorten ermittelt, welche Flavonoide in den Laubblättern vorhanden sind, und welche Enzyme Aktivität zeigen. Darüber hinaus wurde der Einfluß von Prohexadion-Ca auf das Flavonoidmuster in den Laubblättern untersucht.

III.1.a Nachweis der in den Laubblättern der Rose enthaltenen Flavonoide

Das Flavonoidmuster wurde in jungen, vollständig ausgebildeten und noch leicht rötlich gefärbten Laubblättern verschiedener Rosensorten mit unterschiedlicher Blütenfarbe dünnschichtchromatographisch untersucht. In Tabelle 3 sind die dabei nachgewiesenen Flavonoidglyka aufgeführt.

Zwischen den Flavonoidmustern in den Laubblättern der meisten untersuchten Rosensorten trat kein schwerwiegender Unterschied auf. An Flavonolen sind bei allen Sorten Quercetinderivate, bei "Kardinal", "Frisco", "Königin der Rosen", "Crimson Glory", "Versicolor" und der Rose der Herkunft "Drewlo" zusätzlich auch Kämpferolderivate enthalten (Abb. 7). Bei allen Sorten wurden in den Laubblättern 3'4'-hydroxylierte Anthocyanidine nachgewiesen. Dabei kam Cyanidin bei allen Sorten vor, bis auf "Kardinal", "Versicolor" und "Drewlo" bei allen übrigen auch Päonidin (Abb. 8). Bei der Sorte "Samba" konnte zusätzlich noch in kleinen Mengen das 3'4'5'-hydroxylierte Delphinidin nachgewiesen werden, während 4'-hydroxylierte Anthocyanidine bei keiner der untersuchten Sorten auftraten (Abb. 8). Im Gegensatz zu allen anderen Sorten sind die jun-

Tabelle 3 : Flavonoidaglyka in Rosenlaubblättern

Sorte	Km	Qu	Cy	Pä	Pg	Dp	Cat	Eri	Luli
Heckenzauber	-	+	+	+	-	-	+	-	-
Pariser Charme	-	+	+	+	-	-	+	-	-
Kardinal	+	+	+	-	-	-	+	-	-
Frisco	+	+	+	+	-	-	+	-	-
Königin der Rosen	+	+	+	+	-	-	+	-	-
Crimson Glory	+	+	+	+	-	-	+	-	-
Mariandl	-	+	+	+	-	-	+	-	-
Samba	-	+	+	+	-	+	+	-	-
Versicolor	+	+	+	-	-	-	+	-	-
Drewlo	+	+	+	-	-	-	-	-	-

gen Laubblätter bei “Versicolor” und “Drewlo“ nicht deutlich rot gefärbt, sondern grün. Lediglich bei “Drewlo“ tritt gelegentlich bei ganz jungen Blättern eine schwach sichtbare Rotfärbung auf. Sowohl bei “Versicolor“, als auch bei “Drewlo“ war auch der Gehalt an Cyanidin im Vergleich mit den übrigen Sorten sehr niedrig (Abb. 8). Catechin wurde bei allen untersuchten Sorten in den Laubblättern nachgewiesen, mit Ausnahme der Rose der Herkunft “Drewlo“ (Abb. 9). Eriodictyol und Luteoliflavan konnten bei keiner der untersuchten Sorten in den Laubblättern nachgewiesen werden.

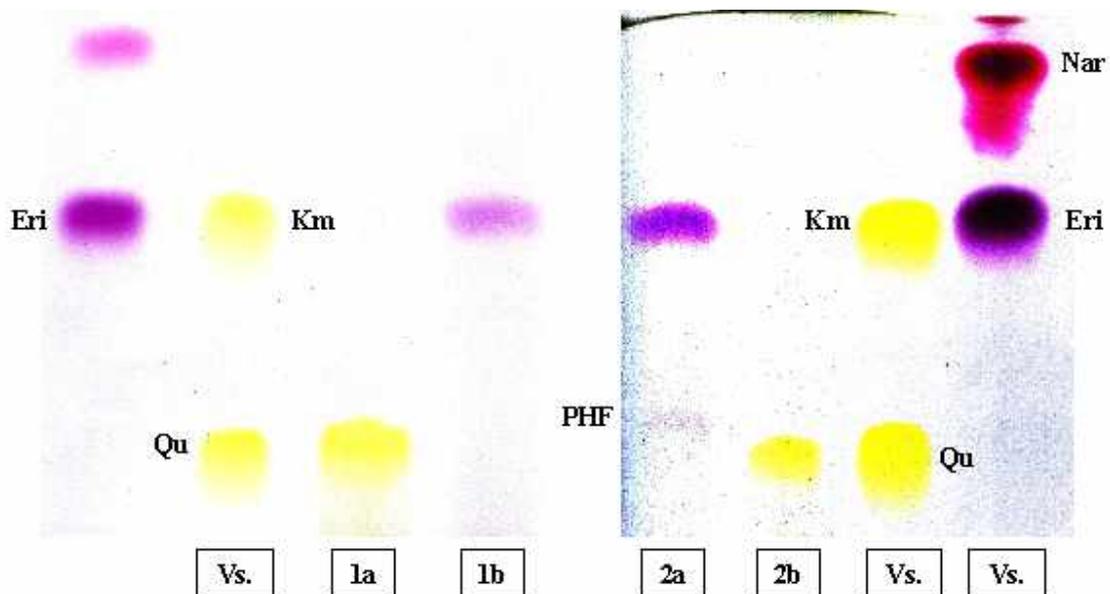


Abb. 7 : Nachweis der Flavanone und Flavonole in jungen Laubblättern von Rosen; 1 : “Pariser Charme“; 2 : “Samba“; a : ohne Prohexadion-Ca; b : nach Behandlung mit Prohexadion-Ca; Vs : Vergleichssubstanzen; Dünnschichtchromatogramm, Laufmittel CAW

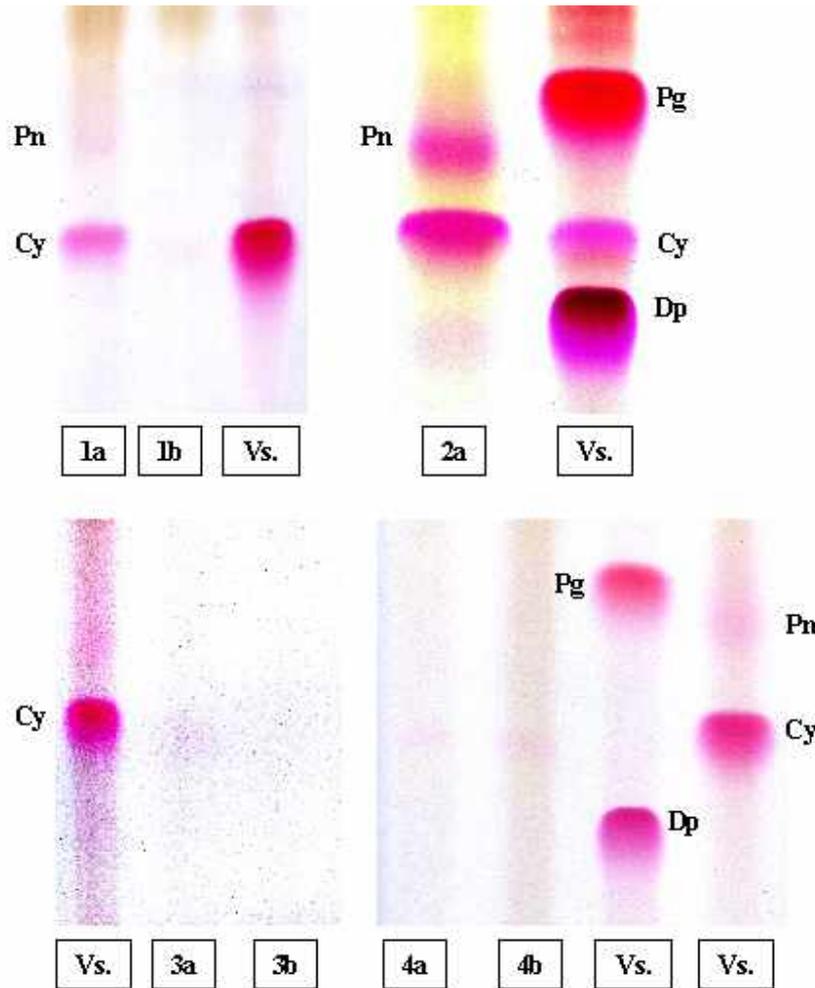


Abb. 8 : Nachweis der Anthocyanidine in jungen Laubblättern von Rosen; 1 : “Pariser Charme“; 2 : “Samba“; 3 : “Drewlo” ; 4 : “Versicolor“; a : ohne Prohexadion-Ca; b : nach Behandlung mit Prohexadion-Ca; Vs : Vergleichssubstanzen; Dünnschichtchromatogramm, Laufmittel Forestal

III.1.b Der Einfluß von Prohexadion-Ca auf das Flavonoidmuster und den Flavonoidgehalt bei Rosenlaubblättern

Junge, noch leicht rötlich gefärbte Laubblätter verschiedener Rosensorten wurden 10 Tage lang einmal täglich mit einer Lösung von 0,1 % Prohexadion-Ca (BAS 125 10 W “Regalis”). Die Blattproben wurden am elften Tag entnommen. Tabelle 4 zeigt die nach der Behandlung in den Laubblättern vorhandenen Flavonoidaglyka.

Die jungen Laubblätter verloren nach der Behandlung mit Prohexadion-Ca ihre rötliche Färbung und wurden grün (Abb. 11). Bei allen Sorten ging der Gehalt an Flavonolen und Anthocyanen in den Laubblättern deutlich zurück, und beide Flavonoidklassen waren nach der Behandlung nicht

III. Ergebnisse

mehr nachweisbar oder nur noch in sehr geringen Mengen vorhanden (Abb. 7, Abb. 8). Dagegen reicherte sich bei der Behandlung mit Prohexadion-Ca in den Laubblättern bei allen untersuchten Sorten Eriodictyol an, bei "Samba" zusätzlich noch Pentahydroxyflavanon (Abb. 7). Der Gehalt an Catechin in den Laubblättern ging bei keiner Sorte bei der Behandlung mit Prohexadion-Ca zurück. (Abb. 9). Bei der Rose der Herkunft "Drewlo" enthielten die Laubblätter auch ohne Behandlung mit Prohexadion-Ca kein Catechin.

Tabelle 4 : Flavonoidaglyka in Rosenlaubblättern nach der Behandlung mit Prohexadion-Ca

Sorte	Km	Qu	Cy	Pn	Dp	Cat	Nar	Eri	PHF	Luli
Heckenzauber	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
Pariser Charme	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+/-
Kardinal	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
Frisco	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
Samba	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+
Versicolor	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+
Drewlo	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-

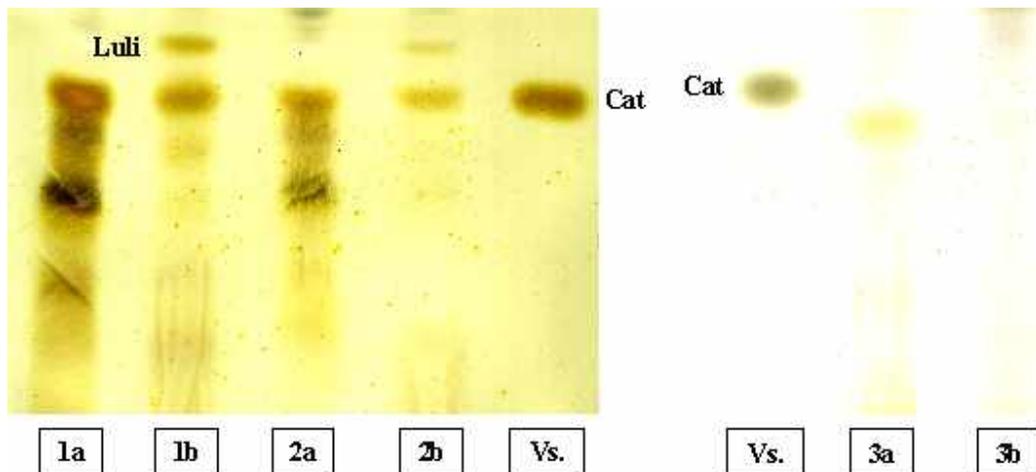


Abb. 9 : Nachweis von Catechin und Luteoliflavan in jungen Laubblättern von Rosen bei Temperatur über 28 °C; 1 : "Heckenzauber"; 2 : "Pariser Charme"; 3 : Herkunft "Drewlo"; a : ohne Prohexadion-Ca; b : nach Behandlung mit Prohexadion-Ca; Vs : Vergleichssubstanzen; Dünnschichtchromatogramm, Laufmittel TAA

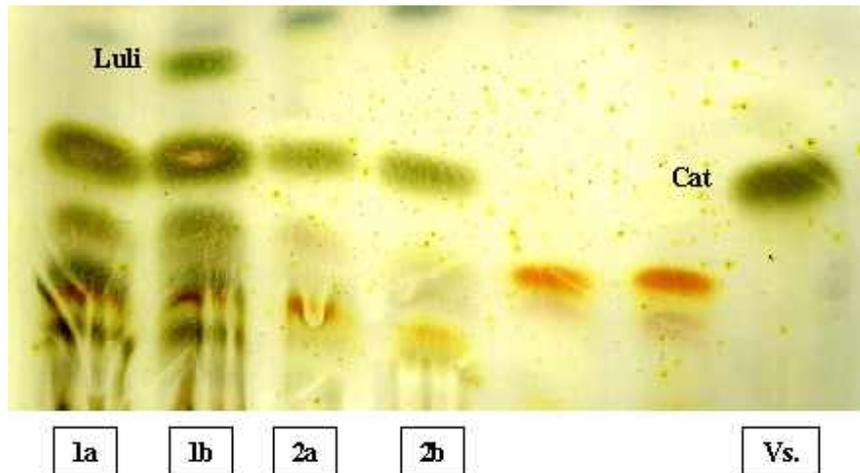


Abb. 10 : Nachweis von Catechin und Luteoliflavan in jungen Laubblättern von Rosen bei Temperatur unter 28 °C; 1 : “Heckenzauber“; 2 : “Pariser Charme“; a : ohne Prohexadion-Ca; b : nach Behandlung mit Prohexadion-Ca; Vs : Vergleichssubstanzen; Dünnschichtchromatogramm, Laufmittel TAA

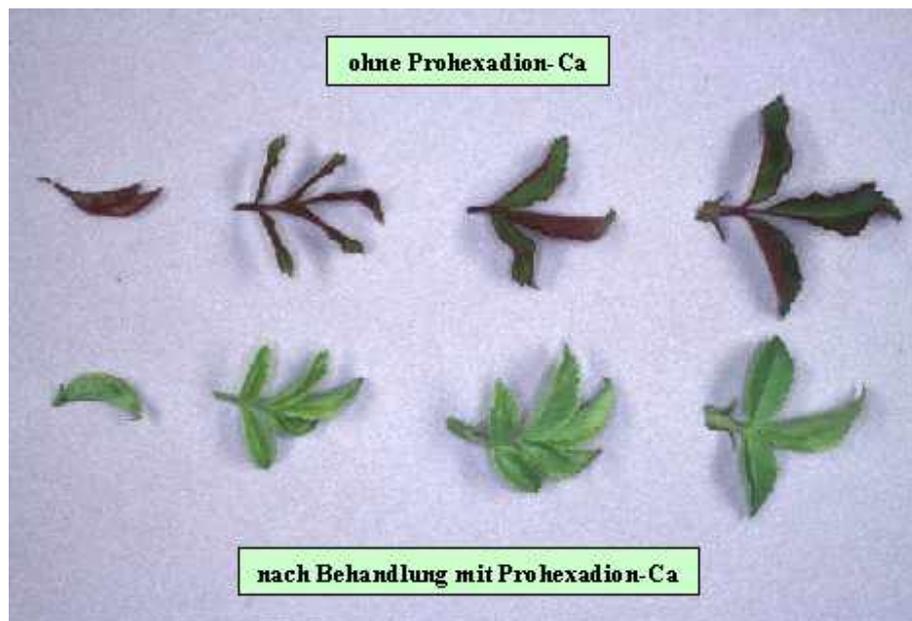


Abb. 11 : junge Laubblätter der Sorte “Kardinal” mit (untere Reihe) und ohne (obere Reihe) Behandlung mit Prohexadion-Ca

Außer bei der Rose “Drewlo” konnte bei allen untersuchten Rosensorten nach der Behandlung mit Prohexadion-Ca in den Laubblättern Luteoliflavan, ein 3-Deoxyflavonoid, nachgewiesen werden (Abb. 9). Bei der Sorte “Pariser Charme” wurde in den Laubblättern nur dann Luteoliflavan gebildet, wenn die Behandlung mit Prohexadion-Ca bei Temperaturen oberhalb etwa 28 °C stattfand. Fand die Behandlung bei niedrigeren Temperaturen statt, so war kein Luteoliflavan in

den Laubblättern nachweisbar (Abb. 9, Abb. 10). Jedoch kam es bei allen untersuchten Temperaturen im Bereich zwischen 18 °C und 40 °C zur Anreicherung von Eriodictyol in den behandelten Laubblättern, und sowohl in behandelten, als auch in unbehandelten Laubblättern konnte wie bei anderen untersuchten Rosensorten Catechin nachgewiesen werden. Ein Nachweis des Luteoforols, das die Vorstufe zu Luteoliflavan darstellt, war mit den zur Verfügung stehenden Methoden nicht möglich.

III.1.c Nachweis der Enzyme der Flavonoidbiosynthese in Laubblättern von Rosen

In den Laubblättern der Rose wurden bisher keine Untersuchungen über die Aktivitäten der am Flavonoidbiosyntheseweg beteiligten Enzyme angestellt. Dagegen konnten in Enzymextrakten aus Blütenblättern der Sorten "Kardinal", "Königin der Rosen", "Crimson Glory" und "Reinweiß" die Aktivitäten der CHS, der FHT und der DFR nachgewiesen werden (Elsherif, 2000).

Zum Nachweis der Aktivität der an der Flavonoidbiosynthese beteiligten Enzyme in den Laubblättern der Rose wurden Enzymextrakte aus jungen, rötlich gefärbten Laubblättern mit der bei Dellus, 1997, beschriebenen Aufarbeitungsmethode hergestellt. Da das Flavonoidmuster in den Laubblättern der verschiedenen Rosensorten nur sehr geringe Unterschiede zeigt, wurden sämtliche Enzymtests mit Enzymextrakten aus Blättern der Sorte "Pariser Charme" durchgeführt. Für die Enzymtests wurden Substrate eingesetzt, die mit radioaktivem ^{14}C markiert sind. Die entstandenen Produkte wurden anschließend dünnenschichtchromatographisch aufgetrennt und nachgewiesen. Mit der Aufarbeitungsmethode nach Dellus konnten in den Enzymextrakten aus Laubblättern die Aktivitäten der Enzyme CHS, CHI, FHT, DFR und LAR nachgewiesen werden. Nicht nachweisbar waren die Aktivitäten der Enzyme F3'H, FLS, ANS und FNR. Die Aktivität der FNR war jedoch nachweisbar, wenn bei der Aufarbeitung die Gelfiltration des Enzymextrakts über Sephadex G-50 weggelassen wurde. Zudem zeigten die Enzyme CHS, CHI, FHT, DFR und LAR in diesem Fall höhere Aktivitäten, jedoch waren auch hier die Aktivitäten der Enzyme F3'H, FLS und ANS nicht nachweisbar. Mit dieser abgewandelten Aufarbeitungsmethode wurden dann sämtliche weiteren enzymologischen Untersuchungen durchgeführt. Tabelle 5 gibt einen Überblick über die Enzymaktivitäten in den Laubblättern.

Tabelle 5 : Enzymaktivitäten in Laubblättern von Rosen

Gewebe	Enzym	Substrat	Produkt
junge, rötlich gefärbte Blätter Sorte "Pariser Charme"	CHS/CHI	4-Cumaroyl-CoA	Naringenin
		Kaffeoyl-CoA	Eriodictyol
	FHT	Naringenin	Dihydrokämpferol
		Eriodictyol	Dihydroquercetin
	FHT Proh.	Naringenin	kein Umsatz
		Eriodictyol	kein Umsatz
	F3'H	Naringenin	kein Umsatz
		Dihydrokämpferol	kein Umsatz
	FLS	Dihydrokämpferol	kein Umsatz
		Dihydroquercetin	kein Umsatz
	DFR/LAR	Dihydrokämpferol	kein Umsatz
		Dihydroquercetin	Catechin
	FNR/LAR	Naringenin	kein Umsatz
		Eriodictyol	Luteoliflavan
DFR/ANS	Dihydroquercetin	kein Umsatz	

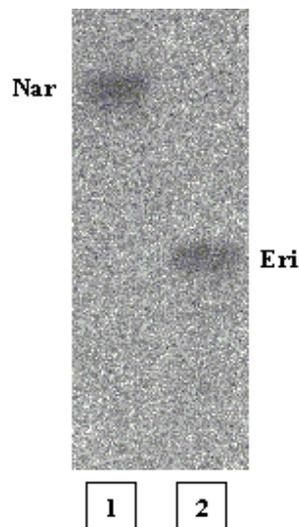


Abb. 12 : Aktivität von CHS und CHI in Enzymextrakten aus Laubblättern der Sorte "Pariser Charme"; 1 : Substrat 4-Cumaroyl-CoA; 2 : Substrat Kaffeoyl-CoA; Dünnschichtchromatogramm, Laufmittel CAW

III. Ergebnisse

Durch die Enzyme CHS und CHI im Enzymextrakt wurde sowohl 4-Cumaroyl-CoA zu Naringenin, als auch von Kaffeoyl-CoA zu Eriodictyol umgesetzt (Abb. 12). Der Umsatz war bei beiden Substraten bei einem pH-Wert von 7,5 am höchsten. Bis zu einer Gesamtproteinmenge von 100 µg stieg der Umsatz von 4-Cumaroyl-CoA linear an und erreichte darüber die Sättigung. Wurden 4-Cumaroyl-CoA und Kaffeoyl-CoA zusammen in den Enzymtestansatz gegeben, so war der Umsatz von beiden Substraten bei einem pH-Wert von 7,5 gleich hoch. Wurde dieser Versuch bei einem pH-Wert von 6,0 durchgeführt, so war der Umsatz von Kaffeoyl-CoA zu Eriodictyol knapp doppelt so hoch wie der Umsatz von 4-Cumaroyl-CoA zu Naringenin.

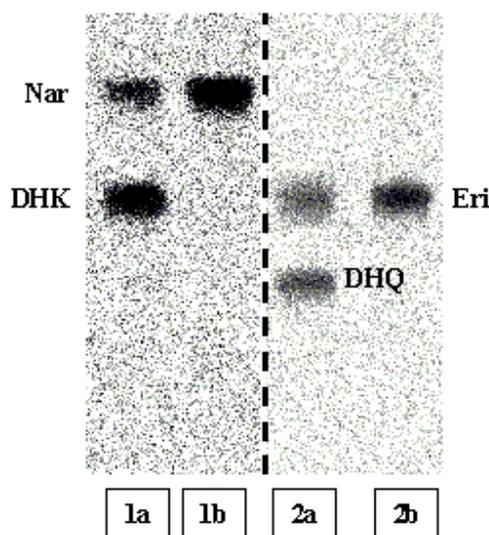


Abb. 13 : Aktivität der FHT in Enzymextrakten aus Laubblättern der Sorte “Pariser Charme”; 1 : Substrat Naringenin; 2 : Substrat Eriodictyol; a : ohne Prohexadion-Ca; b : mit Prohexadion-Ca; Dünnschichtchromatogramm, Laufmittel CAW

Durch die FHT wurde im Enzymextrakt aus den Laubblättern Naringenin zu Dihydrokämpferol und Eriodictyol zu Dihydroquercetin umgesetzt. Die Umsätze von Naringenin und Eriodictyol waren dabei in den Tests mit jeweils einer der beiden Substanzen als Substrat mit jeweils etwa 55 % gleich hoch (Abb. 17). Durch die Zugabe von 0,42 mg Prohexadion-Ca (BAS 125 10 W “Regalis”) in den Enzymtestansatz, was 167 nmol reinem Prohexadion-Ca entspricht, konnten beide Umsätze vollständig gehemmt werden (Abb. 13).

Die DFR setzte im Enzymextrakt nur Dihydroquercetin um. Ein Umsatz von Dihydrokämpferol war bei keinem der getesteten pH-Werte zwischen 6,0 und 8,0 nachweisbar. Durch dünnschichtchromatographische Auftrennung der Produkte aus dem Enzymtest in den Laufmitteln CAW, BAW und Forestal wurde festgestellt, daß Dihydroquercetin zu Catechin umgesetzt wurde (Abb.

III. Ergebnisse

14). Daran zeigte sich, daß im Enzymextrakt auch die Aktivität der LAR vorlag. Leukocyanidin als Zwischenprodukt war bei diesem Umsatz nicht nachweisbar, was auf eine hohe Aktivität der LAR hindeutet.

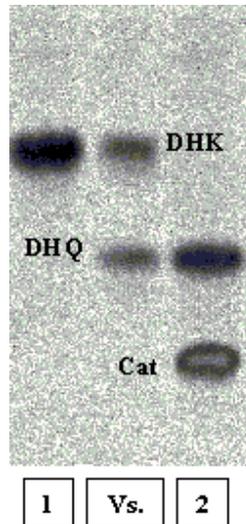


Abb. 14 : Aktivität von DFR und LAR in Enzymextrakten aus Laubblättern der Sorte "Parisier Charme"; 1 : Substrat Dihydrokämpferol; 2 : Substrat Dihydroquercetin; Vs. : Vergleichssubstanzen; Dünnschichtchromatogramm, Laufmittel CAW

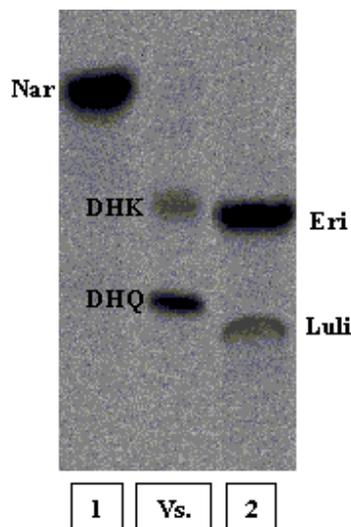


Abb. 15 : Aktivität von FNR und LAR in Enzymextrakten aus Laubblättern der Sorte "Parisier Charme"; 1 : Substrat Naringenin; 2 : Substrat Eriodictyol; Vs. : Vergleichssubstanzen; Dünnschichtchromatogramm, Laufmittel CAW

Im Enzymextrakt aus den Laubblättern konnte auch die Aktivität der FNR nachgewiesen werden. Eriodictyol wurde dabei zu Luteoliflavan umgesetzt. Wurde Naringenin als Substrat eingesetzt, so fand bei allen getesteten pH-Werten zwischen 6,0 und 8,0 kein Umsatz statt (Abb. 15). Der Umsatz von Eriodictyol zu Luteoliflavan war bei einem pH-Wert von 6,0 an höchsten, bei pH-Werten über 7,5 konnte kein Umsatz mehr nachgewiesen werden. Der Umsatz von Eriodictyol zu Luteoliflavan zeigt, daß auch hier, wie schon beim Umsatz von Dihydroquercetin zu Catechin, die DFR und die LAR aktiv sind. Luteoforol als Zwischenprodukt war im Dünnschichtchromatogramm nicht nachweisbar.

Die Aktivitäten der Enzyme F3'H, FLS und ANS waren bei keinem der jeweils getesteten pH-Werte zwischen 6,0 und 8,0 nachweisbar. Im Testansatz für die F3'H wurden Naringenin und Dihydrokämpferol als Substrate eingesetzt, für die FLS Dihydrokämpferol und Dihydroquercetin. Beim Testansatz für die ANS wurde Dihydroquercetin als Substrat eingesetzt, welches zunächst durch die DFR zu Leukocyanidin umgesetzt werden sollte. Nach 30 min Inkubationszeit wurde nochmals frischer Enzymextrakt zugegeben, um das entstandene Leukocyanidin durch die ANS zu Cyanidin umsetzen zu können.

III.1.d Flavonoidbiosynthesewege in Laubblättern von Rosen

Aufgrund der Befunde bei der Untersuchung der Enzymaktivitäten und des Flavonoidmusters mit und ohne Behandlung mit Prohexadion-Ca in den Laubblättern der Rose läßt sich der in Abb. 16 gezeigte Flavonoidbiosyntheseweg aufstellen. Dieser Syntheseweg läuft in den Laubblättern der meisten der untersuchten Rosensorten ab.

III.1.e Enzymologische Ursachen für Abweichungen im Flavonoidmuster

Zeigen die meisten der untersuchten Rosensorten in den Laubblättern ein ziemlich einheitliches Flavonoidmuster, so konnten bei einigen Sorten größere Abweichungen festgestellt werden. Bei der Sorte "Samba" kommt zusätzlich zum Cyanidin noch in geringem Umfang Delphinidin in den Laubblättern vor, bei der Sorte "Versicolor" fehlen die Anthocyane, und bei der Rose der Herkunft "Drewlo" ist der Anthocyangehalt der Laubblätter sehr niedrig, und Flavan 3-ole fehlen dort ganz. Es sollte nun untersucht werden, ob sich in den Laubblättern dieser Sorten auch Ab-

III. Ergebnisse

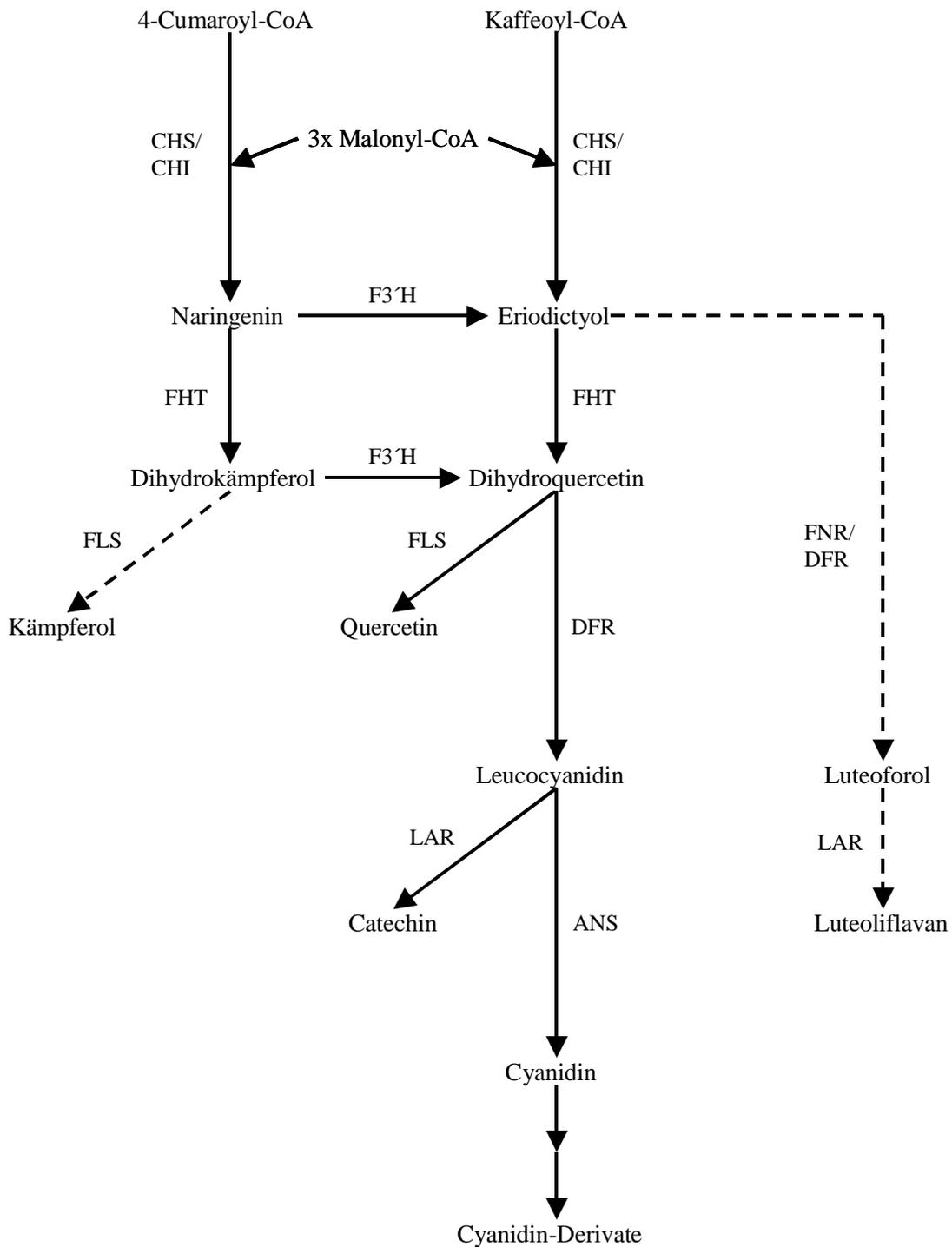


Abb. 16 : Der Flavonoidbiosyntheseweg in den Laubblättern von Rosen; Kämpferol wird nicht bei allen Sorten gebildet; Luteoliflavan wird nur bei Behandlung mit Prohexadion-Ca gebildet

III. Ergebnisse

weichungen in der Aktivität oder Substratspezifität der betreffenden Enzyme im Vergleich zu den übrigen untersuchten Sorten mit einheitlichem Flavonoidmuster zeigen.

Für die Bildung von Delphinidin ist in den Laubblättern der Sorte "Samba" die Aktivität der F3'5'H notwendig. Im Enzymextrakt aus den Laubblättern dieser Sorte konnte die Aktivität der F3'5'H nicht nachgewiesen werden. Es wurden bei keinem der getesteten pH-Werte zwischen 6,0 und 8,0 Naringenin oder Dihydrokämpferol umgesetzt. Im Enzymextrakt aus den Laubblättern der Sorte "Samba" konnte der Umsatz von Pentahydroxyflavanon zu Dihydromyricetin durch die FHT nachgewiesen werden. Auch im Enzymextrakt aus Laubblättern der Sorte "Pariser Charme", bei der in den Laubblättern keine 3'5'-hydroxylierten Flavonoide vorkommen, war dieser Umsatz nachweisbar. Der Umsatz von Pentahydroxyflavanon zu Dihydromyricetin war bei beiden Sorten etwa gleich hoch und beträgt bei "Pariser Charme" 26 %, bei "Samba" 29 % (Abb. 17). Damit lag der Umsatz der FHT von Pentahydroxyflavanon zu Dihydromyricetin bei beiden Sorten deutlich niedriger als der Umsatz von Naringenin zu Dihydrokämpferol oder von Eriodictyol zu Dihydroquercetin, der bei beiden Sorten zwischen 55 % und 59 % lag. Es ist also kein Unterschied in der Substratspezifität der FHT der Sorte "Samba" zur FHT der Sorte "Pariser Charme" zu erkennen.

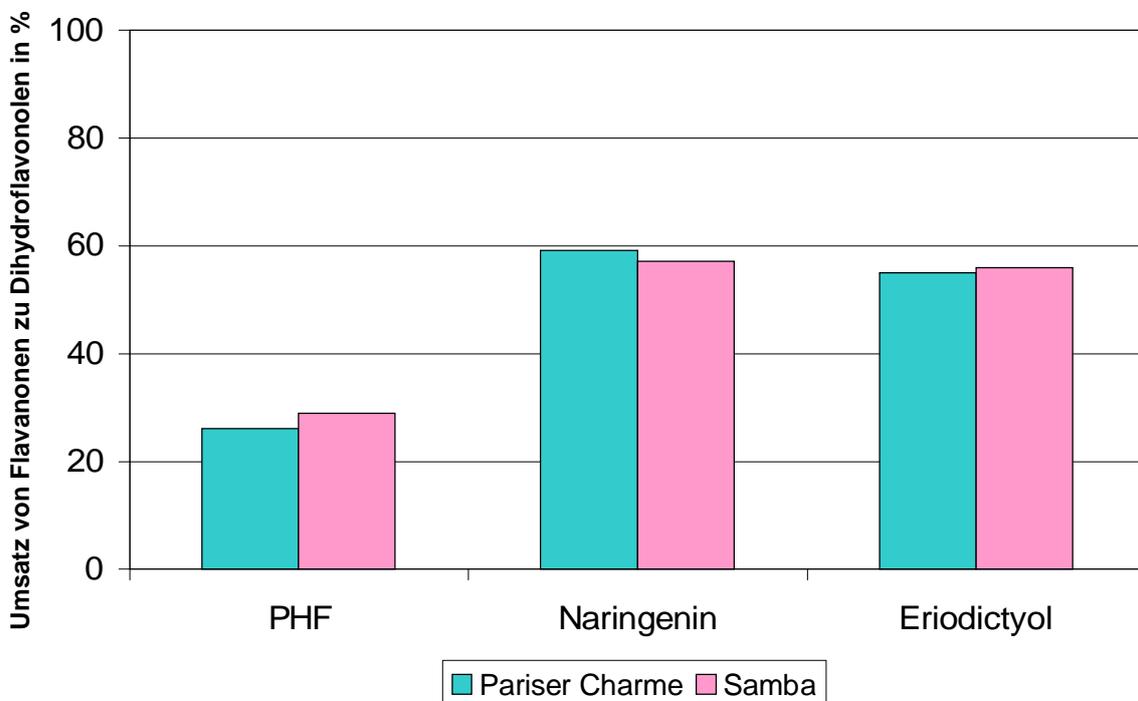


Abb. 17 : Vergleich der Umsätze von Pentahydroxyflavanon (PHF), Naringenin und Eriodictyol durch die FHT bei den Rosensorten "Pariser Charme" und "Samba"

III. Ergebnisse

Die Laubblätter der Rose der Herkunft "Drewlo" enthielten kein Catechin oder andere Flavan 3-ole und wiesen einen sehr niedrigen Anthocyan Gehalt auf. Im Enzymextrakt aus Laubblättern dieser Rose konnte jedoch der Umsatz von Dihydroquercetin zum Catechin nachgewiesen werden. Dies weist sowohl auf eine Aktivität der DFR, als auch der LAR hin. Wie bei der Sorte "Pariser Charme" wurde auch bei "Drewlo" das beim Umsatz von Dihydroquercetin durch die DFR entstandene Leukocyanidin sofort zu Catechin umgesetzt, ohne daß Leukocyanidin im Dünnschichtchromatogramm als Zwischenprodukt nachweisbar war. Es liegt also in den Laubblättern der Rose "Drewlo" eine hohe Aktivität der LAR vor. Der Gesamtumsatz von Dihydroquercetin zu Catechin war aber in Enzymtests mit unterschiedlichen Gesamtproteinmengen bei "Drewlo" bei nahezu allen untersuchten Gesamtproteinmengen um etwa die Hälfte niedriger als bei der Sorte "Pariser Charme" (Abb. 18). Der Gesamtumsatz stieg bei "Pariser Charme" bis zu 100 µg Gesamtprotein an und erreichte 48 %, während er bei "Drewlo" nur bis 50 µg Gesamtprotein anstieg. Bei dieser Gesamtproteinmenge wurde ein Gesamtumsatz von 20 % erreicht, der dann bis zu einer Gesamtproteinmenge von 100 µg nur mehr schwach auf 25 % weiter anstieg. Da bei "Drewlo" beim Gesamtumsatz von Dihydroquercetin zu Catechin die Bildung von Leukocyanidin als Zwischenprodukt einerseits nicht nachweisbar war, und andererseits der Gesamtumsatz niedriger war als bei der Sorte "Pariser Charme", kann daher bei "Drewlo" von einer niedrigeren Aktivität der DFR als bei der Sorte "Pariser Charme" ausgegangen werden.

Die Sorte "Versicolor" wies in den Laubblättern einen sehr niedrigen Anthocyan Gehalt auf. Wie bei allen anderen untersuchten Rosensorten, außer "Drewlo", enthielten die Laubblätter Catechin. Es zeigte sich in Enzymextrakten aus Laubblättern der Sorte "Versicolor" ein wesentlich höherer Gesamtumsatz von Dihydroquercetin zu Catechin als bei "Pariser Charme". Bei Enzymtests mit unterschiedlichen Gesamtproteinmengen lag der Gesamtumsatz bei "Versicolor" schon bei einer Gesamtproteinmenge von 10 µg bei 70 % und blieb bis zu einer Gesamtproteinmenge von 100 µg bei diesem Wert, während "Pariser Charme" bei 100 µg Gesamtprotein erst 48 % erreichte (Abb. 18).

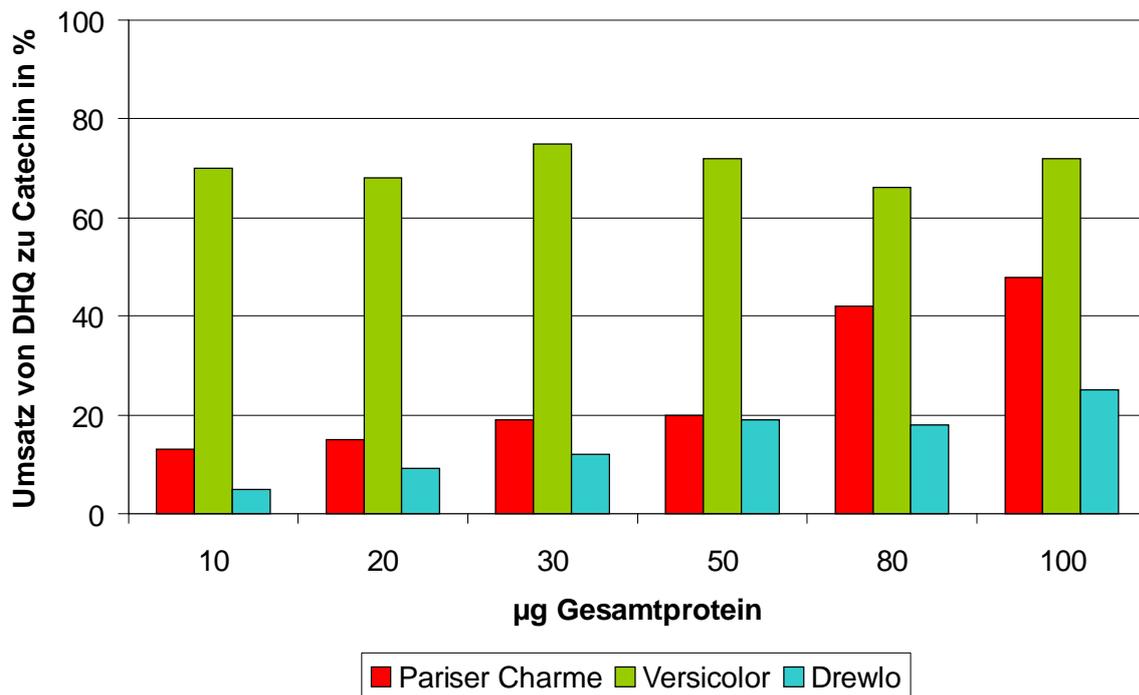


Abb. 18 : Vergleich der Gesamtumsätze von Dihydroquercetin zu Catechin durch die DFR und LAR bei “Pariser Charme” “Versicolor” und “Drewlo” bei verschiedenen Gesamtproteinmengen

III.2 Die Flavonoidbiosynthese in Blütenblättern verschiedener Rosensorten

III.2.a Nachweis des Flavonoidmusters in den Blütenblättern

Das Anthocyanmuster und der Anthocyangehalt in den Blütenblättern verschiedener Sorten, darunter “Kardinal”, “Königin der Rosen” und “Crimson Glory”, ist bereits bestimmt worden. Dabei sind je Sorte unterschiedliche Anteile an Pelargonidin und Cyanidin gefunden worden (Elsharif, 2000). Es fehlten bisher jedoch Kenntnisse darüber, ob in den Blütenblättern Flavonole und Flavan 3-ole enthalten sind, und welche Auswirkungen auf den Flavonoidgehalt und das Flavonoidmuster der Blütenblätter eine Behandlung mit Prohexadion-Ca hat. Auch das Anthocyanmuster in den Blütenblättern der Sorten “Pariser Charme” und “Heckenzauber” wurde bisher nicht untersucht.

Wie bei den Laubblättern wurde auch die Flavonoidzusammensetzung der Blütenblätter dünn-schichtchromatographisch untersucht. Hierzu wurden junge, vollständig durchgefärbte Blütenblätter gerade voll aufgeblühter Blüten der rotblühenden Sorten “Pariser Charme” und “Heckenzauber”, sowie der gelbblühenden Sorte “Frisco” verwendet. Zusätzlich wurden bei der Sorte

III. Ergebnisse

“Pariser Charme” auch ältere Blütenblätter von Blüten, die schon einige Tage aufgeblüht waren, untersucht. In den Tabellen 6 und 7 sind die Flavonoidaglyka in den Blütenblättern der verschiedenen Sorten aufgeführt.

Tabelle 6 : Flavonoidaglyka in jungen Rosenblüten

Sorte	Km	Qu	Cy	Pn	Pg	Dp	Cat	Nar	Eri	Luli
Heckenzauber	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
Pariser Charme	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Frisco	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 7 : Flavonoidaglyka in älteren Rosenblüten

Sorte	Km	Qu	Cy	Pn	Pg	Dp	Cat	Nar	Eri	Luli
Pariser Charme	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-

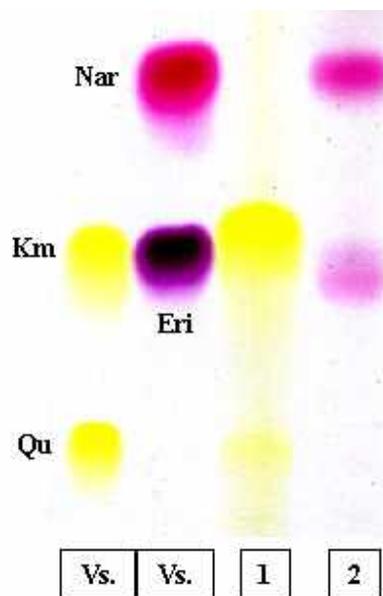


Abb. 19 : Nachweis der Flavanone und Flavonole in jungen Blütenblättern der Sorte “Pariser Charme“; 1 : ohne Prohexadion-Ca; 2 : nach Behandlung mit Prohexadion-Ca; Vs : Vergleichssubstanzen; Dünnschichtchromatogramm, Laufmittel CAW

III. Ergebnisse

In den Blütenblättern aller drei Sorten wurden die Flavonole Kämpferol und Quercetin nachgewiesen, wobei der Kämpferolgehalt jeweils höher lag als der Quercetingehalt (Abb. 19). Anthocyane waren in den Blütenblättern der rotblühenden Sorten "Pariser Charme" und "Heckenzauber" enthalten, nicht jedoch in den Blütenblättern der gelbblühenden Sorte "Frisco". In den Blütenblättern der Sorte "Pariser Charme" wurden etwa gleich große Mengen Cyanidin und Pelargonidin, sowie in geringerem Maße Päonidin nachgewiesen. In den Blütenblättern der Sorte "Heckenzauber" konnte hauptsächlich Cyanidin und nur ein sehr niedriger Gehalt an Pelargonidin nachgewiesen werden (Abb. 20). Flavan 3-ole konnten in den jungen Blütenblättern bei allen drei untersuchten Sorten nicht nachgewiesen werden (Abb. 21), ebensowenig Flavanone (Abb. 19) oder Luteoliflavan (Abb 21). In älteren Blütenblättern der Sorte "Pariser Charme" war jedoch Catechin vorhanden (Abb 22). Ansonsten zeigten sich keine weiteren Unterschiede zwischen den Flavonoidmustern der älteren und der jungen Blütenblätter.

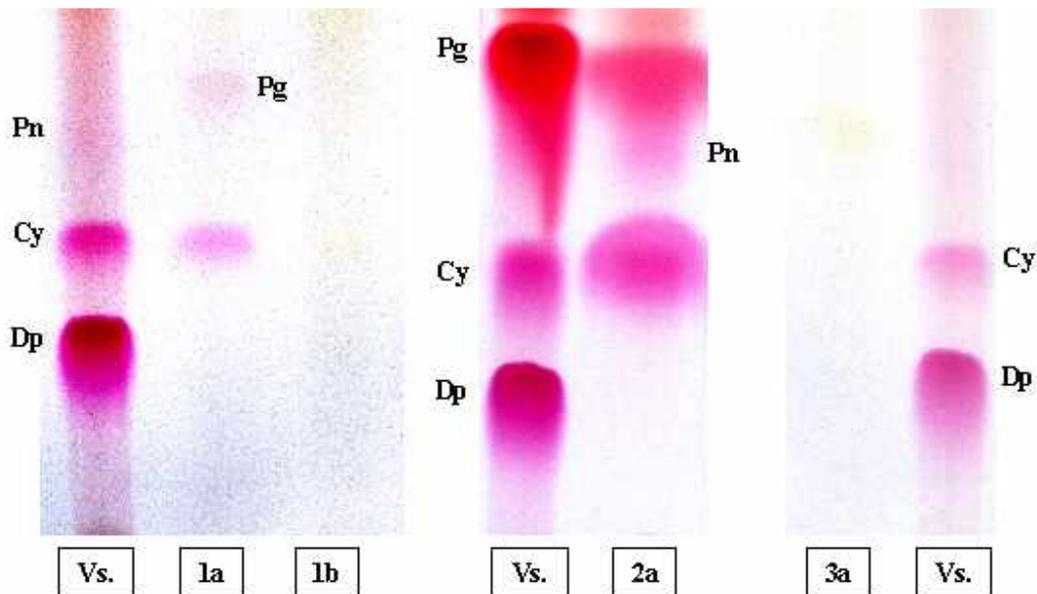


Abb. 20 : Nachweis der Anthocyane in jungen Blütenblättern von Rosen; 1 : Sorte "Heckenzauber"; 2 : Sorte "Pariser Charme"; 3 : Sorte "Frisco"; a : ohne Prohexadion-Ca; b : nach Behandlung mit Prohexadion-Ca; Vs : Vergleichssubstanzen; Dünnschichtchromatogramm, Laufmittel Forestal

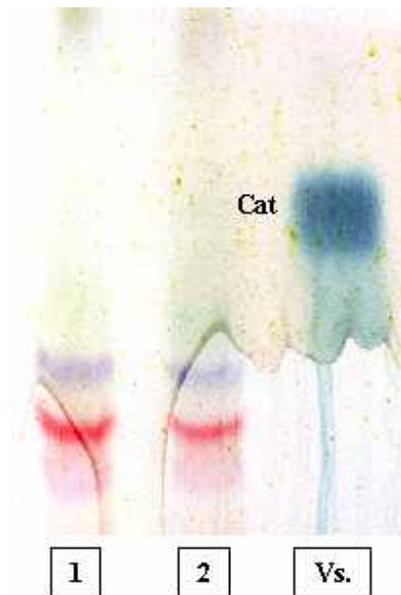


Abb. 21 : Nachweis der Flavan 3-ole in jungen Blütenblättern der Sorte “Pariser Charme“; 1 : ohne Prohexadion-Ca; 2 : nach Behandlung mit Prohexadion-Ca; Vs : Vergleichssubstanzen; Dünnschichtchromatogramm, Laufmittel BAW

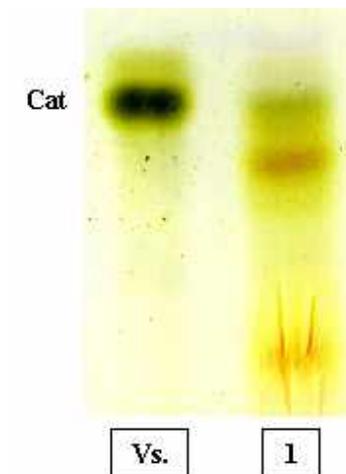


Abb. 22 : Nachweis der Flavan 3-ole in älteren Blütenblättern von Rosen; 1 : Sorte “Pariser Charme“; Vs : Vergleichssubstanzen; Dünnschichtchromatogramm, Laufmittel TAA

III.2.b Der Einfluß von Prohexadion-Ca auf das Flavonoidmuster und den Flavonoidgehalt in Rosenblüten

Junge, noch nicht vollständig durchgefärbte Knospen der rotblühenden Rosensorten “Pariser Charme” und “Heckenzauber”, sowie der gelbblühenden Sorte “Frisco” wurden ähnlich wie die Laubblätter zehn Tage lang einmal täglich mit einer Lösung von 0,1 % Prohexadion-Ca (BAS 125 10 W “Regalis “) in Wasser behandelt. Die sich aus den behandelten Knospen entwickelten, eigentlich rot gefärbten Blüten wurden hellrot oder rosa, in manchen Fällen sogar nahezu weiß (Abb. 23). Diese Beobachtung spiegelte sich auch in einem veränderten Flavonoidmuster und Flavonoidgehalt in den mit Prohexadion-Ca behandelten Blütenblättern wieder. Wurden die Blüten in einer späteren Entwicklungsstufe behandelt, so waren die Veränderungen weitaus schwächer. Tabelle 8 führt die in den Blütenblättern nach der Behandlung mit Prohexadion-Ca nachgewiesenen Flavonoidaglyka auf.

Wie sich schon an der veränderten Blütenfarbe zeigte, waren Anthocyane bei den rotblühenden Sorten in den Blütenblättern nicht mehr vorhanden (Abb. 20). Auch Flavonole waren nicht mehr in den Blütenblättern nachweisbar. Stattdessen wurden nach der Behandlung mit Prohexadion-Ca bei allen drei untersuchten Sorten in den Blütenblättern die Flavanone Naringenin und Eriodictyol angereichert (Abb. 19). Eine Bildung von Luteoliflavan nach der Behandlung mit Prohexadion-Ca war in den Blütenblättern, im Gegensatz zu den Laubblättern, nicht zu beobachten (Abb. 21).

Tabelle 8: Flavonoidaglyka in Rosenblüten nach der Behandlung mit Prohexadion-Ca

Sorte	Km	Qu	Cy	Pn	Pg	Dp	Cat	Nar	Eri	Luli
Heckenzauber	-	-	-	-	-	-		+	+	-
Pariser Charme	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Frisco	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-



Abb. 23 : Einfluß von Prohexadion-Ca auf die Blütenfarbe, Rosensorte “Kardinal”; die behandelte Blüte ist hellrot/rosa

III.2.c Nachweis der Enzyme der Flavonoidbiosynthese in Blütenblättern von Rosen

In Enzymextrakten aus Blütenblättern der Sorten “Kardinal”, “Königin der Rosen”, “Crimson Glory” und “Reinweiß” konnten bisher die Aktivitäten der Enzyme CHS, FHT und DFR nachgewiesen werden (Elsherif, 2000). Nicht untersucht wurden allerdings die Aktivitäten der FNR und der LAR.

Aus jungen, noch nicht vollständig rot gefärbten Blütenblättern der Sorten “Pariser Charme” und “Heckenzauber” wurden mit derselben Aufarbeitungsmethode, die auch für die Standardtests bei den enzymologischen Untersuchungen in den Laubblättern angewandt wurde, Enzymextrakte hergestellt. In diesen Enzymextrakten konnten bei beiden Sorten die Aktivitäten der Enzyme CHS, FHT, DFR, LAR und FNR nachgewiesen werden, während F3'H, FLS und ANS keine Aktivität zeigten. Tabelle 9 gibt einen Überblick über die Enzymaktivitäten in den Blütenblättern.

In Enzymtests mit Enzymextrakten aus den Blütenblättern setzten die CHS und die CHI 4-Cumaroyl-CoA zu Naringenin, und Kaffeoyl-CoA zu Eriodictyol um. Bei einem pH-Wert von 7,5 war in Enzymtests mit jeweils einer der beiden Substanzen als Substrat der Umsatz von 4-Cumaroyl-

III. Ergebnisse

CoA stärker (Abb. 24). Von der FHT wurde im Enzymextrakt Naringenin zu Dihydrokämpferol und Eriodictyol zu Dihydroquercetin umgesetzt (Abb. 24).

Tabelle 9 : Enzymaktivitäten in Blütenblättern von Rosen

Gewebe	Enzym	Substrat	Produkt
noch nicht vollständig rot gefärbte Blütenblätter Sorten "Pariser Charme" und „Heckenzauber“	CHS/CHI	4-Cumaroyl-CoA	Naringenin
		Kaffeoyl-CoA	Eriodictyol
	FHT	Naringenin	Dihydrokämpferol
		Eriodictyol	Dihydroquercetin
	F3'H	Naringenin	kein Umsatz
		Dihydrokämpferol	kein Umsatz
	FLS	Dihydrokämpferol	kein Umsatz
		Dihydroquercetin	kein Umsatz
	DFR	Dihydrokämpferol	Leukopelargonidin
	DFR/LAR	Dihydroquercetin	Catechin
	FNR/LAR	Naringenin	kein Umsatz
		Eriodictyol	Luteoliflavan
DFR/ANS	Dihydroquercetin	kein Umsatz	

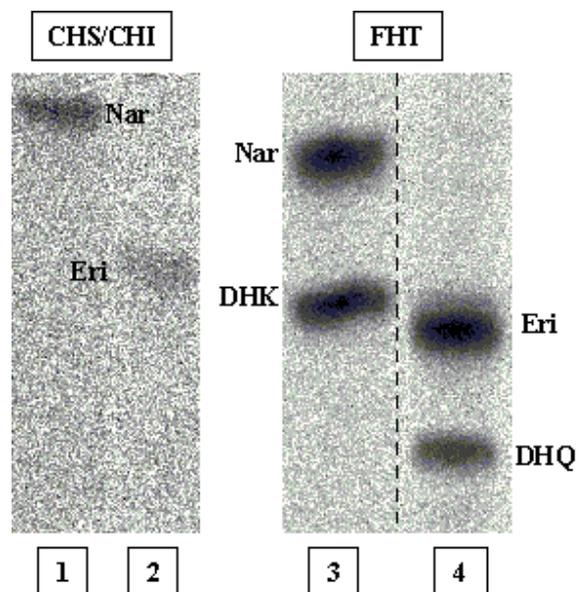


Abb. 24 : Aktivität der CHS, CHI (links) und der FHT (rechts) in Enzymextrakten aus Blütenblättern der Sorte "Pariser Charme"; 1 : Substrat 4-Cumaroyl-CoA; 2 : Substrat Kaffeoyl-CoA; 3 : Substrat Naringenin; 4 : Substrat Eriodictyol; Dünnschichtchromatogramm, Laufmittel CAW

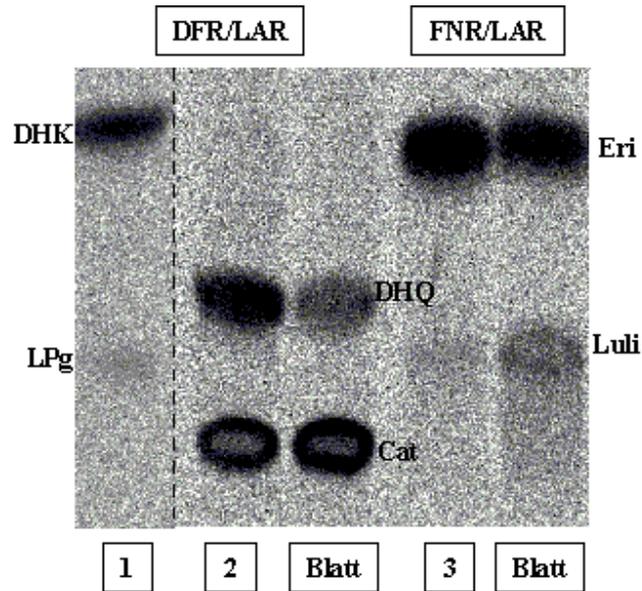


Abb. 25 : Aktivität von DFR und FNR sowie der LAR in Enzymextrakten aus Blütenblättern der Sorte „Pariser Charme“; 1 : Substrat Dihydrokämpferol; 2 : Substrat Dihydroquercetin; 3 : Substrat Eriodictyol; Dünnschichtchromatogramm, Laufmittel CAW

In Enzymtests mit einem Enzymextrakt aus Blütenblättern der Sorte „Pariser Charme“ wurde von der DFR bei einem pH-Wert von 7,5 sowohl Dihydrokämpferol, als auch Dihydroquercetin umgesetzt, wobei der Umsatz von Dihydrokämpferol wesentlich schwächer war als der Umsatz von Dihydroquercetin. Dihydrokämpferol wurde zu Leukopelargonidin umgesetzt und Dihydroquercetin zu Catechin (Abb. 25). Der Umsatz von Dihydroquercetin zu Catechin weist darauf hin, daß in den Blütenblättern auch die Aktivität der LAR vorliegt. Bei diesem Umsatz war Leukocyanidin als Zwischenprodukt nicht nachweisbar.

Die Aktivität der FNR konnte ebenfalls im Enzymextrakt aus den Blütenblättern nachgewiesen werden. Bei einem pH-Wert von 6,0 wurde Eriodictyol zu Luteoliflavan umgesetzt. Naringenin wurde im getesteten pH-Bereich zwischen 6,0 und 8,0 nicht umgesetzt (Abb. 25). Auf Grund der Bildung von Luteoliflavan beim Umsatz von Eriodictyol kann wiederum auf die Aktivität der LAR geschlossen werden.

Die Aktivitäten der Enzyme F3'H, FLS und ANS waren bei keinem der jeweils getesteten pH-Werte zwischen 6,0 und 8,0 in den Enzymextrakten aus den Blütenblättern nachweisbar. Im Testansatz für die F3'H wurden Naringenin und Dihydrokämpferol als Substrate eingesetzt, für die FLS Dihydrokämpferol und Dihydroquercetin. Beim Testansatz für die ANS wurde Dihydroquercetin als Substrat eingesetzt, welches zunächst durch die DFR zu Leukocyanidin umgesetzt

werden sollte. Nach 30 min Inkubationszeit wurde nochmals frischer Enzymextrakt zugegeben, um das entstandene Leukocyanidin durch die ANS zu Cyanidin umsetzen zu können.

III.3 Phytopathologische Untersuchungen bei Rosen mit Sternrußtau

Zur Untersuchung, ob die mit einer Behandlung mit Prohexadion-Ca verbundenen Veränderungen im Flavonoidmuster der Laubblätter eine gesteigerte Resistenz gegen Pathogene bei Rosen verursachen, wurden behandelte und unbehandelte Laubblätter der Rosensorten "Pariser Charme" und "Heckenzauber" mit Sternrußtaukonidien inokuliert.

Die Inokulation erfolgte mit einer wäßrigen Suspension aus frischen Sternrußtaukonidien mit einer Konzentration von etwa 10^5 Konidien je ml. Von dieser Suspension wurden Tropfen zu je 20 µl sowohl auf unbehandelte, als auch auf Laubblätter, die vier bis sechs Tage zuvor einmalig mit Prohexadion-Ca behandelt worden waren, aufgetragen. Von der Sorte "Pariser Charme" wurden sowohl Blätter inokuliert, die Temperaturen über 28 °C ausgesetzt waren und nach der Behandlung Luteoliflavan bildeten, als auch solche, die bei Temperaturen unter 28 °C wuchsen, und bei denen keine Bildung von Luteoliflavan nachzuweisen war. Insgesamt wurden je Versuch jeweils 150 bis 200 Inokulationsstellen auf jeweils 20 behandelte und 20 unbehandelte Blätter verteilt, so daß sich auf einem Blatt etwa 10 Inokulationsstellen befanden. Nach zehn bis zwölf Tagen zeigten sich dunkle Flecken mit Acervuli auf den infizierten Blättern.

Das Verhältnis des Anteils an Inokulationsstellen mit Acervulibildung bei Behandlung mit Prohexadion-Ca zum Anteil an Inokulationsstellen mit Acervulibildung ohne Behandlung betrug bei der Sorte "Pariser Charme" ohne Bildung von Luteoliflavan bei Behandlung mit Prohexadion-Ca knapp 40 % (Abb. 26). Wurde in den Blättern bei der Behandlung mit Prohexadion-Ca Luteoliflavan gebildet, wie es bei Temperaturen über 28 °C der Fall ist, so betrug das Verhältnis des Anteils an Inokulationsstellen mit Acervulibildung bei Behandlung mit Prohexadion-Ca zum Anteil an Inokulationsstellen mit Acervulibildung ohne Behandlung 85 % bis 90 % (Abb. 27). Eine Anreicherung von Eriodictyol auf Grund der Hemmung der FHT durch die Behandlung mit Prohexadion-Ca war in beiden Fällen nachweisbar. Bei den behandelten Blättern ohne Bildung von Luteoliflavan ging zudem auch der Anteil der Inokulationsstellen, bei denen sich dunkle Flecken ausbilden, um über die Hälfte gegenüber unbehandelten Blättern zurück. Bei Bildung von Luteoliflavan nach Behandlung der Blätter mit Prohexadion-Ca blieb der Anteil der sich dunkel färbenden Inokulationsstellen jeweils gleich.

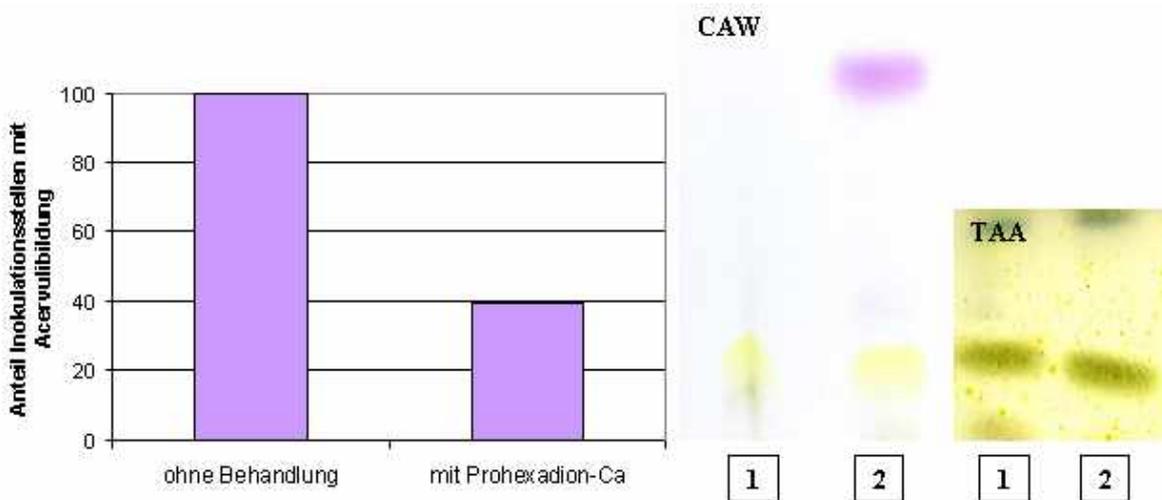


Abb. 26 : Inokulationsversuch mit Sternrußtau bei der Sorte “Pariser Charme“, ohne Bildung von Luteoliflavan bei Behandlung mit Prohexadion-Ca (unter 28 °C); 1 : ohne Behandlung ; 2 : mit Behandlung mit Prohexadion-Ca

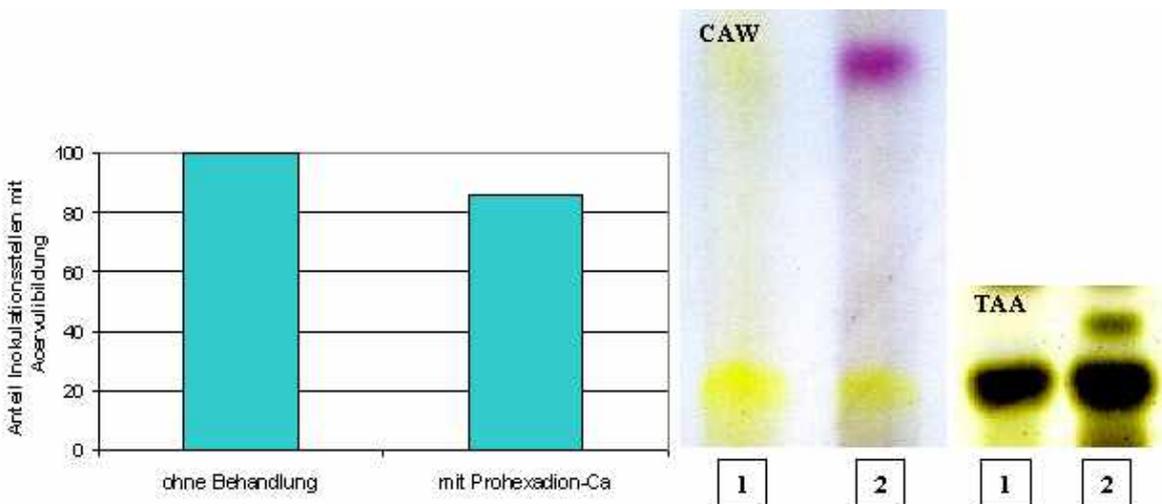


Abb. 27 : Inokulationsversuch mit Sternrußtau bei der Sorte “Pariser Charme“, mit Bildung von Luteoliflavan bei Behandlung mit Prohexadion-Ca (über 28 °C); 1 : ohne Behandlung ; 2 : mit Behandlung mit Prohexadion-Ca

Bei der Sorte “Heckenzauber” bildete sich bei Behandlung mit Prohexadion-Ca bei allen untersuchten Bedingungen Luteoliflavan in den Blättern. Bei allen Versuchen war auch eine Anreicherung von Eriodictyol nachweisbar. Der Anteil an Inokulationsstellen mit Acervulibildung war nach Behandlung mit Prohexadion-Ca jeweils etwas höher als ohne Behandlung. Das Verhältnis des Anteils an Inokulationsstellen mit Acervulibildung bei Behandlung mit Prohexadion-Ca zum

Anteil an Inokulationsstellen mit Acervulibildung ohne Behandlung betrug hierbei 120-130 % (Abb. 28).

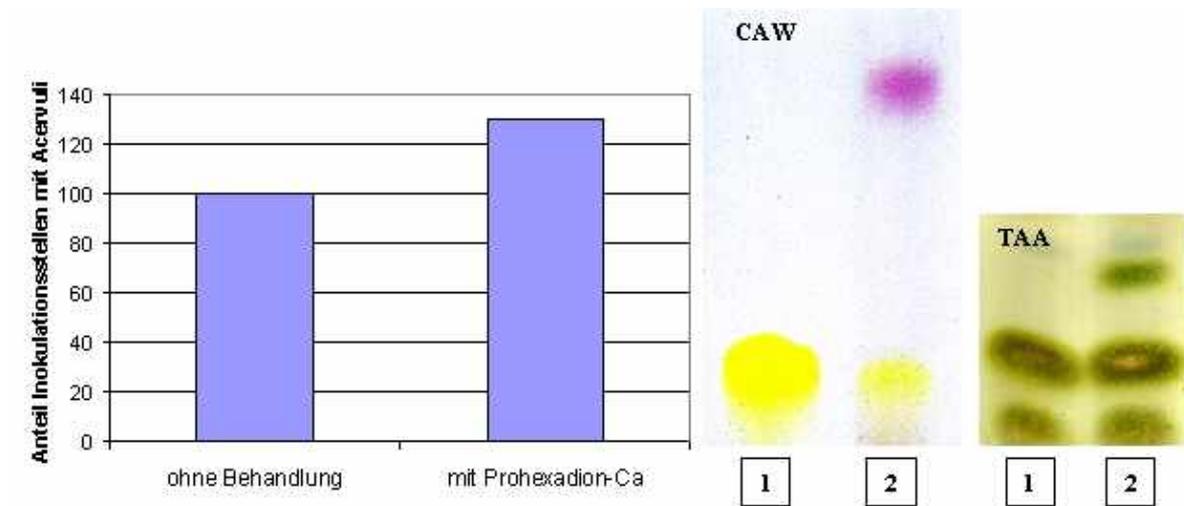


Abb. 28 : Inokulationsversuch mit Sternrußtau bei der Sorte “Heckenzauber“; 1 : ohne Behandlung ; 2 : mit Behandlung mit Prohexadion-Ca

III.4 Die Flavonoidbiosynthese bei der Kartoffel

Zur Aufklärung der Flavonoidbiosynthese in den Laubblättern und im Sproß der Kartoffelpflanze, die beide Angriffspunkte für Pathogene darstellen, wurde das jeweilige Flavonoidmuster ermittelt, und die Aktivität der dazugehörigen Enzyme nachgewiesen. Daraus konnte der im jeweiligen Gewebe ablaufende Flavonoidbiosyntheseweg abgeleitet werden.

III.4.a Nachweis der in verschiedenen Kartoffelgeweben enthaltenen Flavonoide

Die Flavonoidzusammensetzung wurde in vollständig ausgebildeten Blättern, in Blättern von 11 Tage alten Pflanzen nach der Keimung und in Sproßgewebe aus dem unteren Teil des Sprosses von vollständig ausgebildeten Pflanzen mittels Dünnschichtchromatographie untersucht. Diese Untersuchung wurde bei den Sorten “Walli”, “Producent” und “Feska” durchgeführt. Vor allem die vollständig ausgebildeten Blätter und der untere Sproßteil stellen Hauptangriffspunkte für

III. Ergebnisse

Pathogene wie *Phytophthora infestans* und *Erwinia carotovora* dar. Tabelle 10 zeigt eine Übersicht über die in den verschiedenen Pflanzenteilen enthaltenen Flavonoide.

Tabelle 10 : Flavonoidaglyka bei Kartoffelpflanzen

	vollständig ausgebildete Blätter	Blätter 11 Tage nach Keimung	Sproß
Walli	Qu	Qu, Km, Pä	Qu
Producent	Qu	Qu, Km, Pä	Qu
Feska	Qu	Qu, Km, Pet	Qu

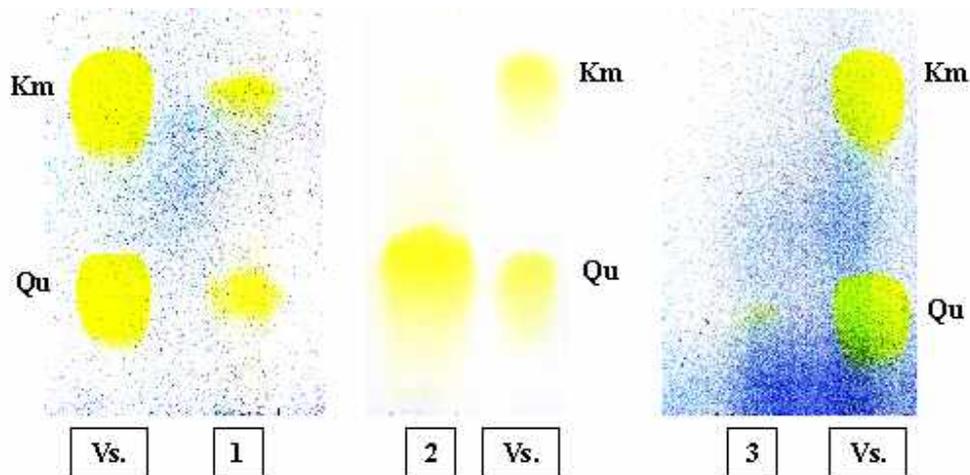


Abb. 29 : Flavonole in verschiedenen Gewebetypen von Kartoffelpflanzen, Sorte “Walli“; 1 : junge Blätter 11 Tage nach der Keimung; 2 : vollständig ausgebildete Blätter; 3 : Sproß; Vs : Vergleichssubstanzen; Dünnschichtchromatogramm, Laufmittel CAW

Zwischen den drei untersuchten Kartoffelsorten bestanden keine Unterschiede in den Flavonolmustern der vollständig ausgebildeten Blätter, der jungen Blätter kurz nach der Keimung und des Sprosses. In den jungen Blättern waren bei allem drei Sorten Quercetin und Kämpferol nachweisbar, in den vollständig ausgebildeten Blättern und im Sproß jeweils nur Quercetin (Abb. 29). Im Sproß war dabei der Gehalt an Quercetin wesentlich niedriger als in den jungen oder vollständig ausgebildeten Blättern. Bei Pflanzen, die im Freiland wuchsen, war in den vollständig ausgebildeten Blättern deutlich mehr Quercetin nachweisbar als bei solchen, die im Gewächshaus wuchsen (Abb. 30). Anthocyane konnten bei allen drei untersuchten Sorten nur in den jungen Blättern nachgewiesen werden, nicht jedoch in den vollständig ausgebildeten Blättern oder im Sproß. Bei den Sorten “Walli” und “Producent” waren in den jungen Blättern Päonidinderivate enthalten, bei

III. Ergebnisse

der Sorte "Feska" dagegen Petunidinderivate (Abb. 31). Flavon-3-ole oder Flavone waren in keinem der untersuchten Gewebe nachweisbar.

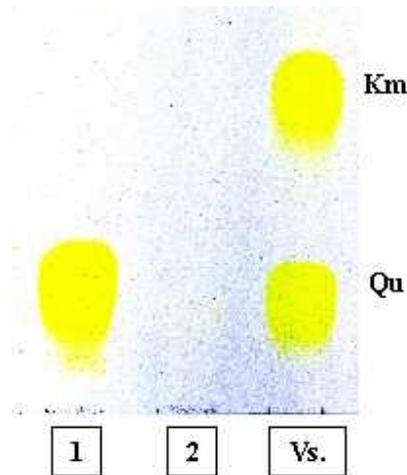


Abb. 30 : Nachweis von Flavonolen in vollständig ausgebildeten Blättern der Sorte "Walli"; 1 : Pflanzen im Freiland; 2 : Pflanzen im Gewächshaus; Vs : Vergleichssubstanzen; Dünnschichtchromatogramm, Laufmittel CAW, von den Vergleichssubstanzen wurden jeweils 8 µg aufgetragen

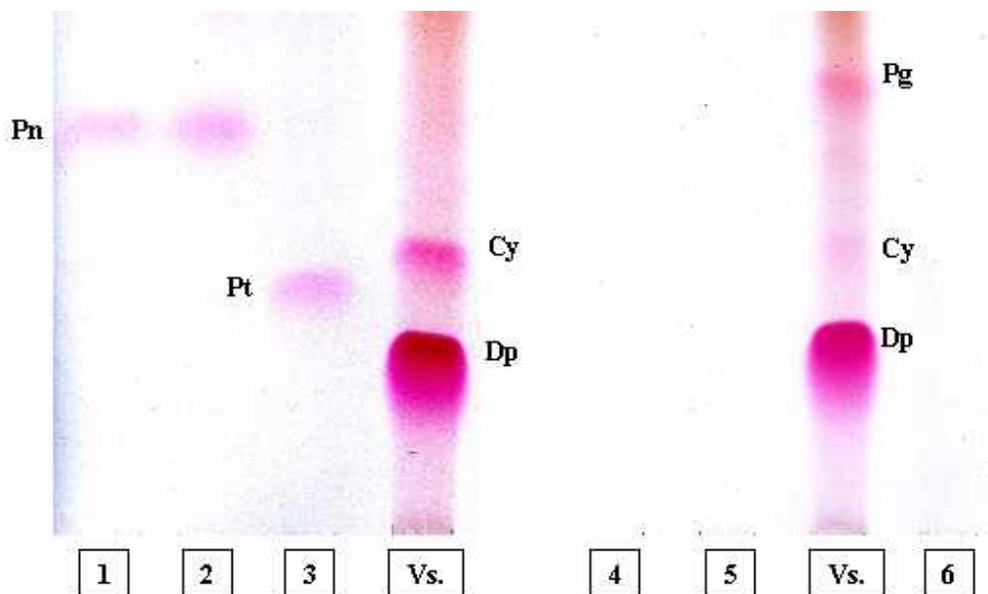


Abb. 31 : Nachweis der Anthocyane in verschiedenen Gewebetypen von Kartoffelpflanzen; 1-3 junge Blätter 11 Tage nach der Keimung; 4-5 vollständig ausgebildete Blätter; 1 : "Walli"; 2 : "Producent"; 3 : "Feska"; 4 : "Walli"; 5 : "Feska"; 6 : "Walli" Sproß; Vs : Vergleichssubstanzen; Dünnschichtchromatogramm, Laufmittel Forestal

III.4.b Der Einfluß von Prohexadion-Ca auf Flavonoidmuster und Flavonoidgehalt bei Kartoffelpflanzen

Junge und vollständig ausgebildete Blätter der Sorte “Walli” wurden zehn Tage lang einmal täglich mit einer Lösung aus 0,1 % Prohexadion-Ca (BAS 125 10 W “Regalis”) in Wasser behandelt. Bei den jungen Blättern begann die Behandlung unmittelbar nach der Keimung. Am 11. Tag wurde bei beiden Blattparten das Flavonoidmuster des behandelten Blattmaterials dünnschichtchromatographisch untersucht. Dabei konnte bei den jungen Blättern ein deutlicher Rückgang sowohl von Kämpferol und Quercetin, als auch von Päonidin nachgewiesen werden (Abb. 32, Abb. 33). Bei vollständig ausgebildeten Blättern trat nach einer Behandlung mit Prohexadion-Ca kein Rückgang im Flavonolgehalt auf (Abb. 32). Flavanone wurden bei der Behandlung mit Prohexadion-Ca weder in den jungen, noch in den vollständig ausgebildeten Blättern angereichert. Bei den mit Prohexadion-Ca behandelten Pflanzen war ein deutlich verringertes Längenwachstum feststellbar (Abb. 34).

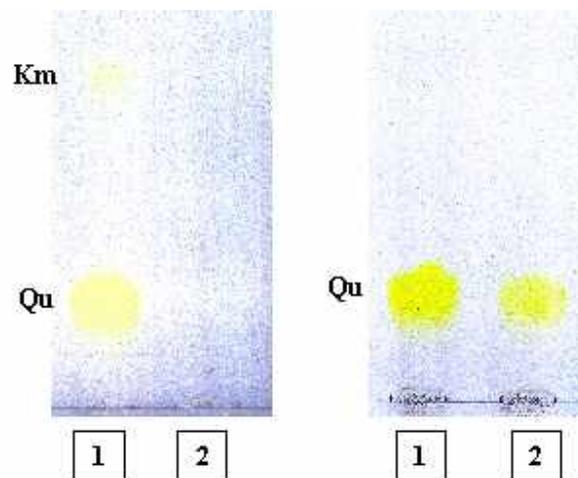


Abb. 32 : Nachweis von Flavonolen in Kartoffelblättern der Sorte “Walli” nach Behandlung mit Prohexadion-Ca; 1 : ohne Behandlung; 2 : nach abgeschlossener Behandlung; links : junge Blätter 11 Tage nach der Keimung; rechts : vollständig ausgebildete Blätter; Dünnschichtchromatogramme, Laufmittel CAW



Abb. 33 : Nachweis von Anthocyanen in jungen Blättern 11 Tage nach der Keimung, Sorte "Walli" nach Behandlung mit Prohexadion-Ca; 1 : ohne Behandlung; 2 : nach abgeschlossener Behandlung; Dünnschichtchromatogramm, Laufmittel Forestal



Abb. 34 : Einfluß von Prohexadion-Ca auf das Längenwachstum von Kartoffelpflanzen; links unbehandelte Pflanze; rechts behandelte Pflanze

III.4.c Nachweis der Enzyme der Flavonoidbiosynthese in jungen Kartoffelblättern

In den Kartoffelblättern wurden bisher keine Untersuchungen über die Aktivitäten der am Flavonoidbiosyntheseweg beteiligten Enzyme angestellt. Zum Nachweis der Aktivität der an der Flavonoidbiosynthese beteiligten Enzyme wurden Enzymextrakte aus jungen Kartoffelblättern 11 Tage nach der Keimung mit der für die Standardenzymtests bei Rosenblättern verwendeten Aufarbeitungsmethode hergestellt. Sämtliche Enzymtests wurden an der Sorte "Walli" durchgeführt, da das Flavonoidmuster in den Blättern der drei untersuchten Kartoffelsorten kaum Unterschiede zeigt, und weil diese Sorte auch für die Transformationsversuche verwendet wurde. Mit der verwendeten Aufarbeitungsmethode konnten in den Enzymextrakten aus den jungen Blättern die Aktivitäten der Enzyme CHS, CHI, FHT, F3'H, FLS und DFR nachgewiesen werden. Nicht nachweisbar war die Aktivität der FNR und ANS. Tabelle 10 gibt einen Überblick über die Enzymaktivitäten in den jungen Kartoffelblättern.

Tabelle 10 : Enzymaktivitäten in jungen Kartoffelblättern

Gewebe	Enzym	Substrat	Produkt
junge Blätter 11 Tage nach Keimung	CHS/CHI	4-Cumaroyl-CoA	Naringenin
		Caffeoyl-CoA	Eriodictyol
	FHT	Naringenin	Dihydrokämpferol
		Eriodictyol	Dihydroquercetin
	FHT Proh.	Naringenin	kein Umsatz
		Eriodictyol	kein Umsatz
	F3'H	Naringenin	Eriodictyol
		Dihydrokämpferol	Dihydroquercetin
	FLS	Dihydrokämpferol	Kämpferol
		Dihydroquercetin	Quercetin
	DFR	Dihydrokämpferol	kein Umsatz
		Dihydroquercetin	Leukocyanidin
	FNR	Naringenin	kein Umsatz
		Eriodictyol	kein Umsatz
DFR/ANS	Dihydroquercetin	kein Umsatz	

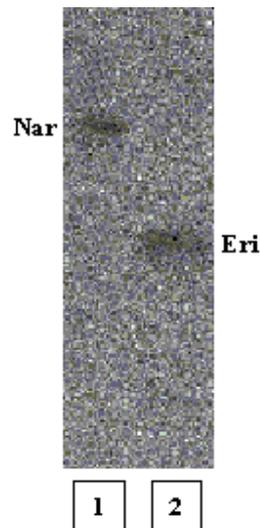


Abb. 35 : Aktivität von CHS und CHI im Enzymextrakt aus jungen Blättern der Sorte “Walli”; 1 : Substrat 4-Cumaroyl-CoA; 2 : Substrat Kaffeoyl-CoA; Dünnschichtchromatogramm, Laufmittel CAW

Von den Enzymen CHS und CHI wurde im Enzymextrakt aus den jungen Blättern 11 Tage nach der Keimung sowohl 4-Cumaroyl-CoA zu Naringenin, als auch Kaffeoyl-CoA zu Eriodictyol umgesetzt (Abb. 35). Der Umsatz von 4-Cumaroyl-CoA war bei einem pH-Wert von 7,5 am höchsten, während der Umsatz von Kaffeoyl-CoA bei einem pH-Wert von 6,0 am höchsten war. Bis zu einer Gesamtproteinmenge von 80 µg stieg der Umsatz von 4-Cumaroyl-CoA zu Naringenin linear an. Darüber erreichte die Naringeninbildung die Sättigung (Abb. 36). Wurden 4-Cumaroyl-CoA und Kaffeoyl-CoA zusammen in den Enzymtestansatz gegeben, so war der Umsatz von 4-Cumaroyl-CoA bei einem pH-Wert von 7,5 nur unwesentlich höher als der Umsatz von Kaffeoyl-CoA. Bei einem pH-Wert von 6,0 war der Umsatz von Kaffeoyl-CoA mehr als doppelt so hoch wie der Umsatz von 4-Cumaroyl-CoA.

III. Ergebnisse

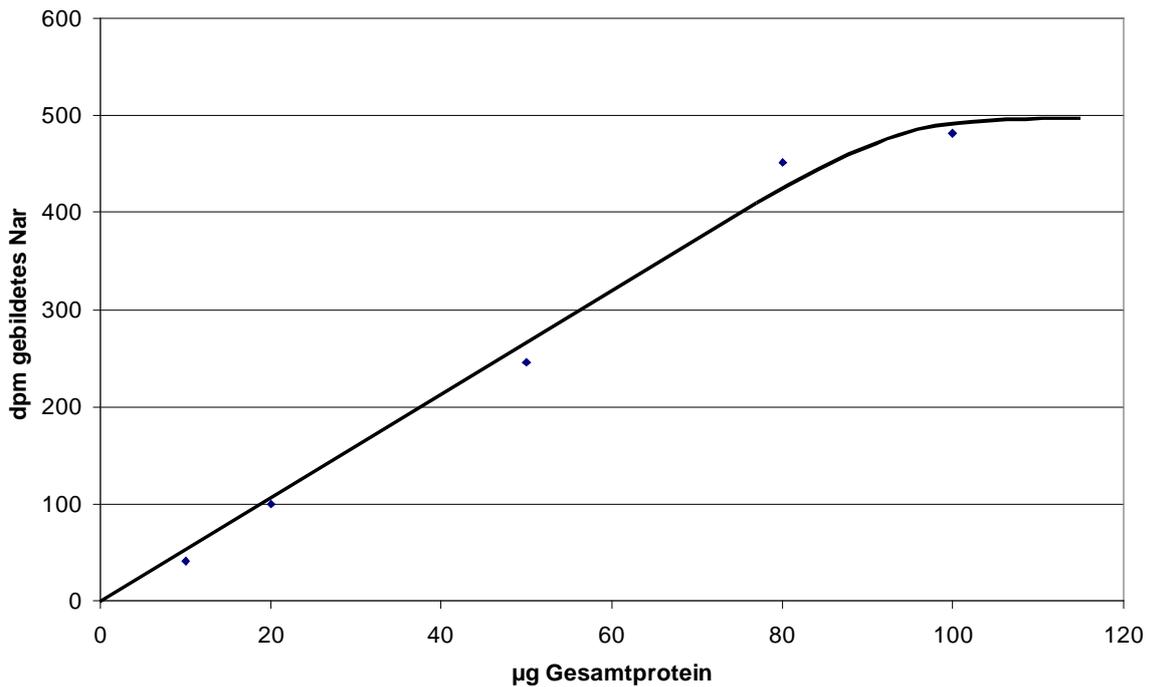


Abb. 36 : Proteinlinearität der CHS in jungen Blättern 11 Tage nach der Keimung, Sorte "Walli"

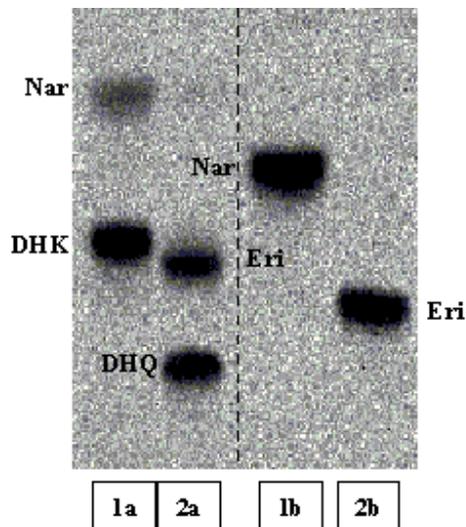


Abb. 37 : Aktivität der FHT im Enzymextrakt aus jungen Blättern der Sorte "Walli"; 1 : Substrat Naringenin; 2 : Substrat Eriodictyol; a : ohne Prohexadion-Ca; b : mit Prohexadion-Ca; Dünnschichtchromatogramm, Laufmittel CAW

Durch die FHT wurde im Enzymextrakt aus den jungen Blättern bei einem pH-Wert von 7,5 Naringenin zu Dihydrokämpferol und Eriodictyol zu Dihydroquercetin umgesetzt (Abb 37). Bei

III. Ergebnisse

diesem pH-Wert war Umsatz von Naringenin zu Dihydrokämpferol höher als der Umsatz von Eriodictyol zu Dihydroquercetin. Bis zu einer Gesamtproteinmenge von 30 µg stieg der Umsatz von Naringenin zu Dihydrokämpferol linear an. Aus den eingesetzten 3000 dpm ^{14}C -Naringenin wurden etwa 1800 dpm ^{14}C -Dihydrokämpferol gebildet. Die Bildung von Dihydrokämpferol nahm darüber nur noch schwach bis auf etwa 2200 dpm bei 100 µg eingesetztem Gesamtprotein weiter zu (Abb. 38). Durch die Zugabe von 0,42 mg Prohexadion-Ca (BAS 125 10 W "Regalis") in den Enzymtestansatz, was 167 nmol reinem Prohexadion-Ca entspricht, konnten sowohl der Umsatz von Naringenin, als auch der Umsatz von Eriodictyol vollständig gehemmt werden (Abb. 37).

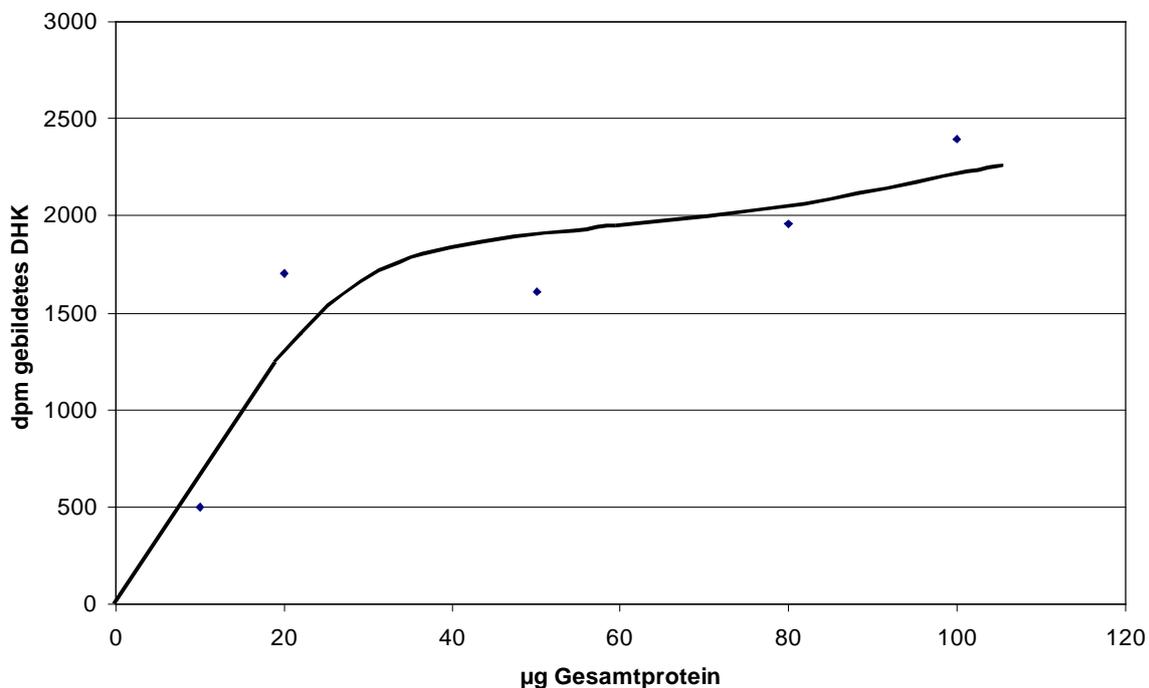


Abb. 38 : Proteinlinearität der FHT in jungen Blättern 11 Tage nach der Keimung, Sorte "Walli", eingesetzt wurden 3000 dpm ^{14}C -Naringenin

Die F3H setzte im Enzymextrakt aus den jungen Blättern bei einem pH-Wert von 7,5 Naringenin zu Eriodictyol und Dihydrokämpferol zu Dihydroquercetin um (Abb. 39). Bei diesem pH-Wert waren beide Umsätze etwa gleich hoch.

III. Ergebnisse

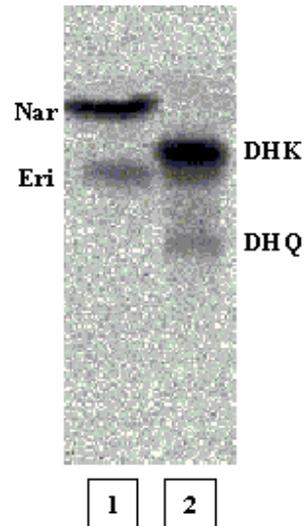


Abb. 39 : Aktivität der F3'H im Enzymextrakt aus jungen Blättern der Sorte "Walli"; 1 : Substrat Naringenin; 2 : Substrat Dihydrokämpferol; Dünnschichtchromatogramm, Laufmittel CAW

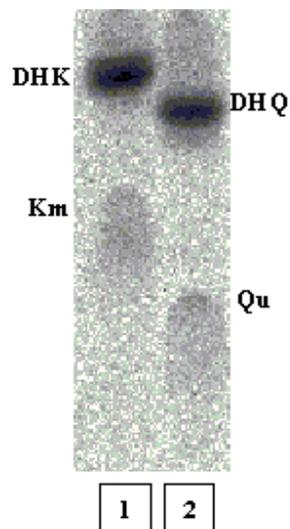


Abb. 40 : Aktivität der FLS im Enzymextrakt aus jungen Blättern der Sorte "Walli"; 1 : Substrat Dihydrokämpferol; 2 : Substrat Dihydroquercetin; Dünnschichtchromatogramm, Laufmittel BAW

Von der FLS wurden im Enzymextrakt aus den jungen Blättern bei einem pH-Wert von 7,5 Dihydrokämpferol zu Kämpferol und Dihydroquercetin zu Quercetin umgesetzt (Abb. 40). Bei diesem pH-Wert war der Umsatz beider Substrate etwa gleich hoch.

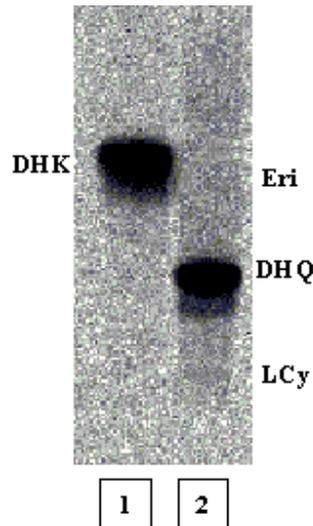


Abb. 41 : Aktivität der DFR im Enzymextrakt aus jungen Blättern der Sorte ‘Walli’; 1 : Substrat Dihydrokämpferol; 2 : Substrat Dihydroquercetin; Dünnschichtchromatogramm, Laufmittel CAW

Die DFR setzte im Enzymextrakt aus den jungen Blättern nur Dihydroquercetin um (Abb. 41). Ein Umsatz von Dihydrokämpferol war bei keinem der getesteten pH-Werte zwischen 6,0 und 8,0 nachweisbar. Dihydroquercetin wurde zu Leukocyanidin umgesetzt. Der Umsatz war allerdings sehr schwach und nur bei einem pH-Wert von 7,5 nachweisbar.

Die Aktivitäten der Enzyme FNR und ANS waren bei keinem der jeweils getesteten pH-Werte zwischen 6,0 und 8,0 nachweisbar. Im Testansatz für die FNR wurden Naringenin oder Eriodictyol als Substrate eingesetzt. Beim Testansatz für die ANS wurde Dihydroquercetin als Substrat eingesetzt, welches zunächst durch die DFR zu Leukocyanidin umgesetzt werden sollte. Nach 30 min Inkubationszeit wurde nochmals frischer Enzymextrakt zugegeben, um das entstandene Leukocyanidin durch die ANS zu Cyanidin umsetzen zu können.

III.4.d Nachweis der Enzyme der Flavonoidbiosynthese in vollständig ausgebildeten Kartoffelblättern und im Sproß

Auch in den vollständig ausgebildeten Blättern und im Sproß der Kartoffel wurden die Aktivitäten der an der Flavonoidbiosynthese beteiligten Enzyme untersucht. Dazu wurden aus diesen Gewebetypen mit der gleichen Aufarbeitungsmethode wie sie für die jungen Blätter angewandt wurde, Enzymextrakte hergestellt. Untersucht wurde wiederum die Sorte ‘Walli’.

III. Ergebnisse

Mit dieser Aufarbeitungsmethode konnten im Enzymextrakt aus den vollständig ausgebildeten Blättern die Aktivitäten der Enzyme CHS, CHI, FHT, F3'H und FLS nachgewiesen werden. Nicht nachweisbar waren die Aktivitäten der DFR und der FNR. Die Aktivität der ANS wurde nicht untersucht. Im Enzymextrakt aus dem Sproß konnten die Aktivitäten der Enzyme CHS, CHI und F3'H nachgewiesen werden. Die Aktivitäten der Enzyme FHT, FLS, DFR und FNR waren nicht nachweisbar. Tabelle 11 gibt einen Überblick über die Enzymaktivitäten in den vollständig ausgebildeten Kartoffelblättern und Tabelle 12 einen Überblick über die Enzymaktivitäten im Sproß.

Tabelle 11 : Enzymaktivitäten in vollständig ausgebildeten Kartoffelblättern

Gewebe	Enzym	Substrat	Produkt
vollständig ausgebildete Blätter	CHS/CHI	4-Cumaroyl-CoA	Naringenin
		Kaffeoyl-CoA	Eriodictyol
	FHT	Naringenin	Dihydrokämpferol
		Eriodictyol	Dihydroquercetin
	FHT Proh.	Naringenin	kein Umsatz
		Eriodictyol	kein Umsatz
	F3'H	Naringenin	Eriodictyol
		Dihydrokämpferol	Dihydroquercetin
	FLS	Dihydrokämpferol	Kämpferol
		Dihydroquercetin	Quercetin
	DFR	Dihydrokämpferol	kein Umsatz
		Dihydroquercetin	kein Umsatz
	FNR	Naringenin	kein Umsatz
		Eriodictyol	kein Umsatz

Tabelle 12 : Enzymaktivitäten im Sproß von Kartoffeln

Gewebe	Enzym	Substrat	Produkt
Sproß	CHS/CHI	4-Cumaroyl-CoA	Naringenin
		Kaffeoyl-CoA	Eriodictyol
	FHT	Naringenin	kein Umsatz
		Eriodictyol	kein Umsatz
	F3'H	Naringenin	Eriodictyol
		Dihydrokämpferol	Dihydroquercetin
	FLS	Dihydrokämpferol	kein Umsatz
		Dihydroquercetin	kein Umsatz
	DFR	Dihydrokämpferol	kein Umsatz
		Dihydroquercetin	kein Umsatz
	FNR	Naringenin	kein Umsatz
		Eriodictyol	kein Umsatz

Im Enzymextrakt aus den vollständig ausgebildeten Blättern wurde von den Enzymen CHS und CHI bei einem pH-Wert von 7,5 sowohl 4-Cumaroyl-CoA zu Naringenin, als auch Kaffeoyl-CoA zu Eriodictyol umgesetzt. Durch die FHT wurde bei einem pH-Wert von 7,5 Naringenin zu Dihydrokämpferol und Eriodictyol zu Dihydroquercetin umgesetzt. Durch die Zugabe von 0,42 mg Prohexadion-Ca (BAS 125 10 W "Regalis") in den Enzymtestansatz, was 167 nmol reinem Prohexadion-Ca entspricht, konnten sowohl der Umsatz von Naringenin, als auch der Umsatz von Eriodictyol vollständig gehemmt werden. Die F3'H setzte im Enzymextrakt aus den vollständig ausgebildeten Blättern bei einem pH-Wert von 7,5 Naringenin zu Eriodictyol und Dihydrokämpferol zu Dihydroquercetin um. Von der FLS wurden bei einem pH-Wert von 7,5 Dihydrokämpferol zu Kämpferol und Dihydroquercetin zu Quercetin umgesetzt. Die Aktivitäten der Enzyme DFR und FNR waren im Enzymextrakt aus den vollständig ausgebildeten Blättern bei keinem der jeweils getesteten pH-Werte zwischen 6,0 und 8,0 nachweisbar. In den Testansätzen für die DFR wurden Dihydrokämpferol oder Dihydroquercetin als Substrate eingesetzt, in den Testansätzen für die FNR Naringenin oder Eriodictyol.

Im Enzymextrakt aus dem Sproß wurde von der CHS und der CHI bei einem pH-Wert von 7,5 4-Cumaroyl-CoA zu Naringenin und Kaffeoyl-CoA zu Eriodictyol umgesetzt. Die F3'H setzte bei einem pH-Wert von 7,5 Naringenin zu Eriodictyol und Dihydrokämpferol zu Dihydroquercetin um. Bei keinem der jeweils getesteten pH-Werte zwischen 6,0 und 8,0 waren im Enzymextrakt

aus dem Sproß die Aktivitäten der Enzyme FHT, FLS, DFR oder FNR nachweisbar. Als Substrate für die FHT und die FNR wurden Naringenin oder Eriodictyol eingesetzt, für die FLS und die DFR Dihydrokämpferol oder Dihydroquercetin.

III.4.e Vergleich der Enzymaktivitäten von CHS und FHT bei Freiland- und Gewächshauspflanzen

Die vollständig ausgebildeten Blätter von im Freiland wachsenden Kartoffelpflanzen enthalten deutlich mehr Quercetin als die vollständig ausgebildeten Blätter gleich alter Gewächshauspflanzen. Zum Vergleich der Enzymaktivitäten von CHS und FHT in den vollständig ausgebildeten Blättern von Freiland- und Gewächshauspflanzen wurde die Proteinlinearität dieser beiden Enzyme bestimmt. Die Enzymtests wurden bei einer Inkubation bei 25 °C für 30 min und einem pH-Wert von 7,5 durchgeführt. Je Ansatz wurden jeweils 10, 20, 50, 80 oder 100 µg Gesamtprotein eingesetzt. Für die CHS-Testansätze wurde 4-Cumaroyl-CoA und Malonyl-CoA als Substrat verwendet, bei den FHT-Testansätzen Naringenin.

Im Enzymextrakt aus vollständig ausgebildeten Blättern von etwa fünf Wochen alten Gewächshauspflanzen zeigte sich kaum Aktivität der CHS. Dagegen stieg die Aktivität der CHS im Enzymextrakt aus den vollständig ausgebildeten Blättern von Freilandpflanzen bis zu einer Gesamtproteinmenge von etwa 80µg linear an. Darüber erreichte die Naringeninbildung die Sättigung (Abb 42).

Die Aktivität der FHT stieg im Enzymextrakt aus den vollständig ausgebildeten Blättern von Freilandpflanzen linear bis zu einer Gesamtproteinmenge von etwa 30 µg an, darüber erreichte die Bildung von Dihydrokämpferol die Sättigung. Dabei wurde bei den vollständig ausgebildeten Blättern aus den eingesetzten 3000 dpm ¹⁴C-Naringenin etwa 1500 dpm ¹⁴C-Dihydrokämpferol gebildet, was dann weiter auf über 2000 dpm bei 100 µg Gesamtprotein anstieg. Auch bei der Aktivität der FHT zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen Freiland- und Gewächshauspflanzen. Im Enzymextrakt aus den vollständig ausgebildeten Blättern von Gewächshauspflanzen stieg die Enzymaktivität ebenfalls bis etwa 30 µg Gesamtprotein linear an, darüber erreichte die Bildung von Dihydrokämpferol die Sättigung. Aus den eingesetzten 3000 dpm ¹⁴C-Naringenin wurden nur knapp 1000 dpm ¹⁴C-Dihydrokämpferol gebildet. Bei 100 µg eingesetztem Gesamtprotein sank die gebildete Menge an Dihydrokämpferol wieder ab (Abb. 43).

III. Ergebnisse

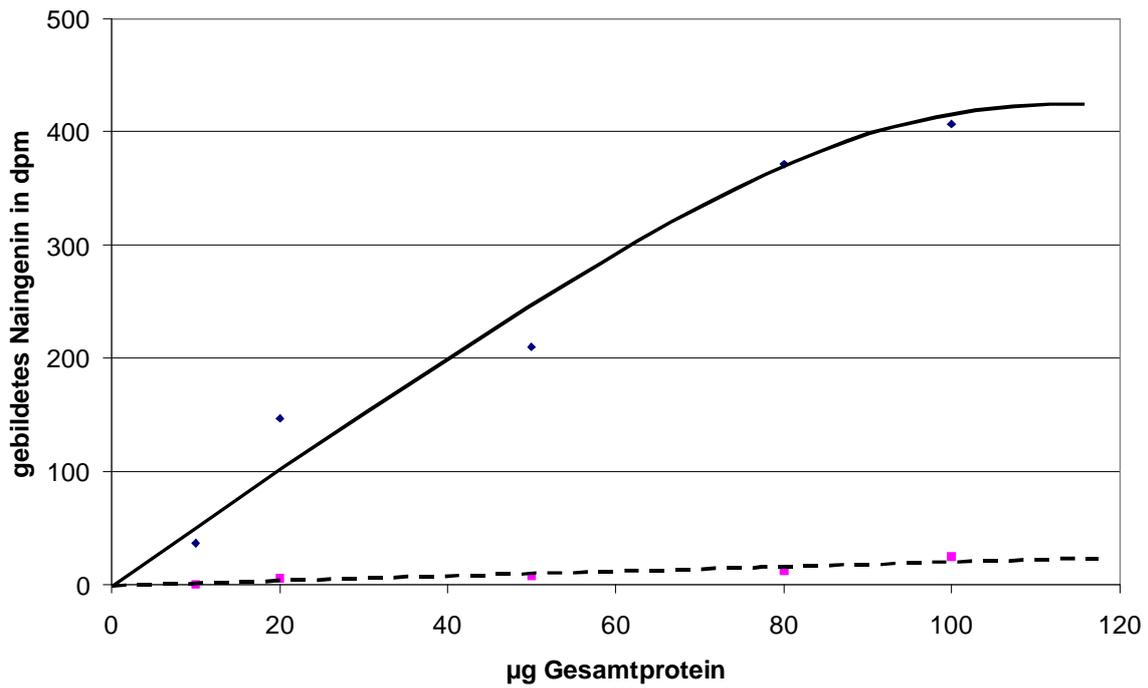


Abb 42 : Proteinlinearität der CHS in vollständig ausgebildeten Blättern, Sorte "Walli"; durchgezogene Linie : Pflanzen im Freiland; gestrichelte Linie : Pflanzen im Gewächshaus

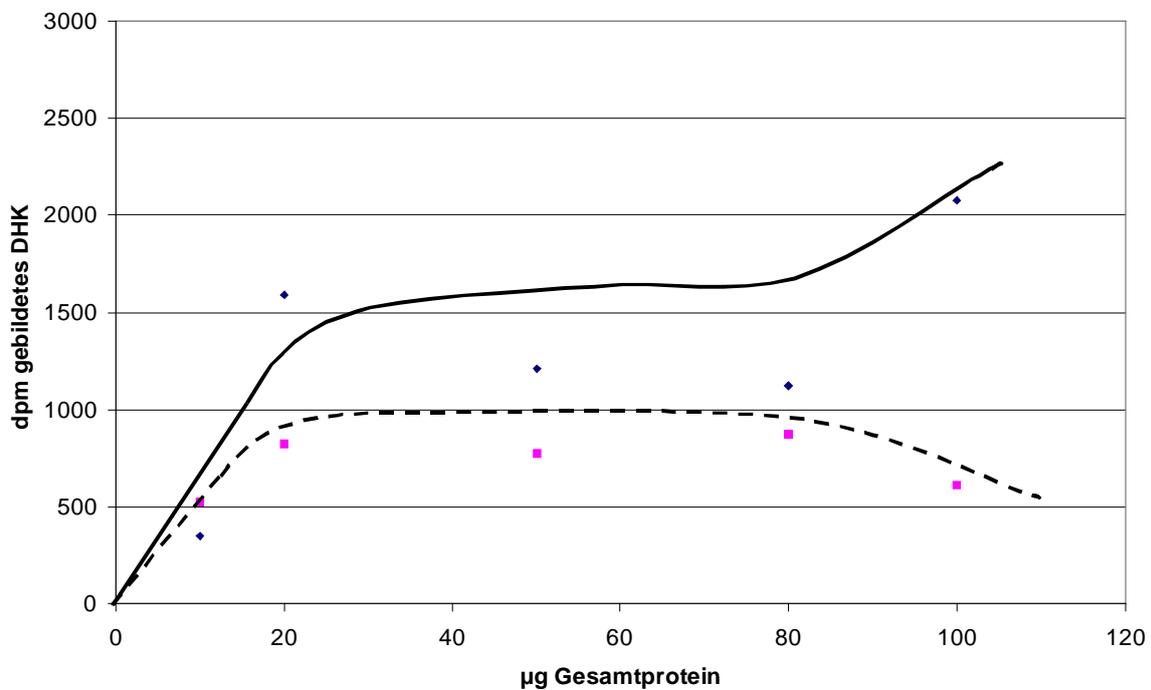


Abb 43 : Proteinlinearität der FHT in vollständig ausgebildeten Blättern, Sorte "Walli"; durchgezogene Linie : Pflanzen im Freiland; gestrichelte Linie : Pflanzen im Gewächshaus

III.4.f Flavonoidbiosynthesewege in Kartoffelblättern

Auf Grund der Ergebnisse bei der Untersuchung der Enzymaktivitäten und des Flavonoidmusters mit und ohne Behandlung mit Prohexadion-Ca in den jungen und vollständig ausgebildeten Blättern konnte für die Kartoffelsorten "Walli" und "Producent" der in Abb. 44 dargestellte Flavonoidbiosyntheseweg aufgestellt werden.

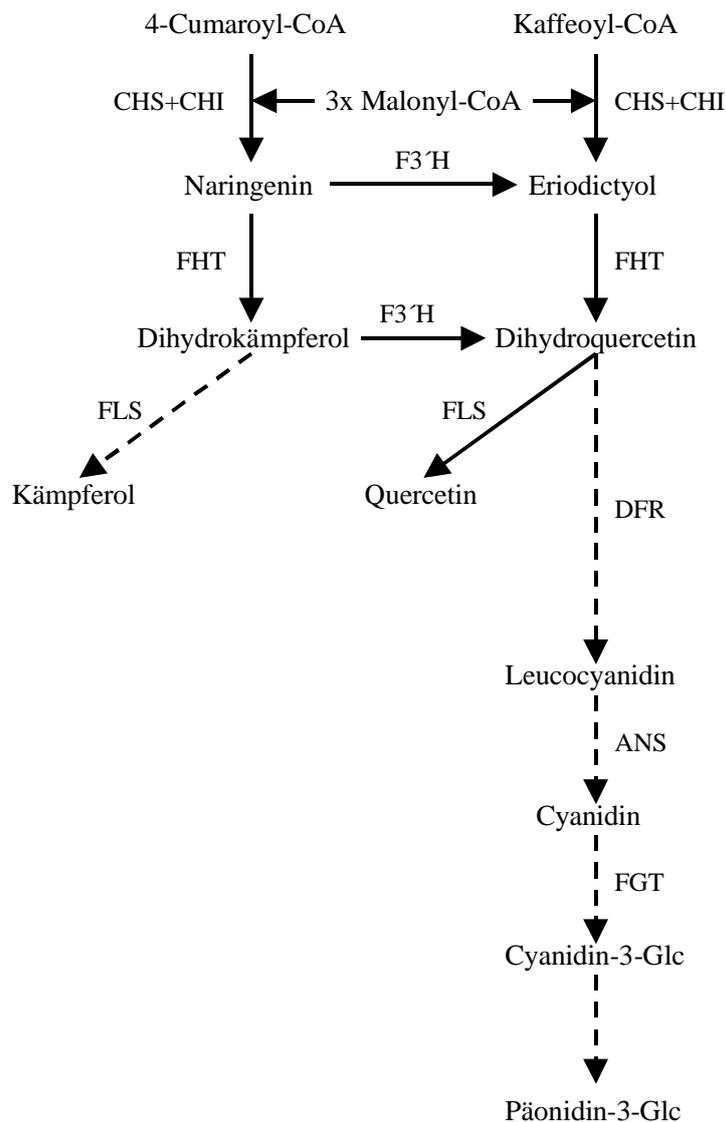


Abb. 44 : Flavonoidbiosyntheseweg bei den Kartoffelsorten "Walli" und "Producent"; durchgezogene Wege laufen in jungen und vollständig ausgebildeten Blättern ab, gestrichelte Wege nur in den jungen Blättern

III.5 Transformation von Kartoffeln mit dem *Dfr-Gen* des Apfels

In den Blättern der Kartoffel ist die Synthese von Luteoforol nicht möglich. Einerseits ist die DFR/FNR der Kartoffel nicht in der Lage Eriodictyol zu Luteoforol umzusetzen, andererseits ist dieses Enzym auch nur in den ganz jungen Blättern, nicht aber in den vollständig ausgebildeten aktiv. Kartoffelpathogene wie *Phytophthora infestans* befallen jedoch vor allem die vollständig ausgebildeten Blätter. Die Synthese von Luteoforol soll daher in den vollständig ausgebildeten Kartoffelblättern auf gentechnischem Wege ermöglicht werden. Luteoforol in den Blättern soll den Kartoffelpflanzen eine erhöhte Resistenz gegen verschiedene Pathogene verleihen.

III.5.a Herstellung und Transformation des Transformationskonstruktes

Die cDNA der Apfel-*Dfr* wurde in einem Transformationskonstrukt mit einem CaMV 35 S-Promotor, der in der Regel in jedem Gewebe bei normalen physiologischen Bedingungen aktiv ist, in die Kartoffel transformiert. Das DFR-Enzym des Apfels weist die für die Luteoforolbildung nötige FNR-Aktivität auf. Somit sollte es möglich sein, daß die transgene Kartoffelpflanze bei Behandlung mit Prohexadion-Ca Luteoforol in den Blättern bildet.

Die Transformation erfolgte mit *Agrobacterium tumefaciens*. Als Transformationsvektor wurde pBi 121 mit dem Selektionsmarker Kanamycin verwendet. Aus dem Vektor pBi 121 wurde zunächst mit den Restriktionsenzymen Xba I und Sac I das β -*Gluc* Markergen herausgeschnitten. Die Schnittstelle für Xba I sitzt unmittelbar hinter dem CaMV 35 S-Promotor des Vektors in der multiple cloning site, während Sac I knapp vor dem Nos-Terminator schneidet. In dieses linearisierte Plasmid wurde die mit den entsprechenden Schnittstellen versehene cDNA der Apfel-*Dfr* in Sense-Ausrichtung ligiert. Das fertige Transformationskonstrukt pBi 121 *Dfr* Ap (Abb. 7) wurde schließlich in *Agrobacterium tumefaciens*, Stamm LBA 4404, transformiert.

Zur Transformation mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* wurden Internodienabschnitte von Kartoffelpflanzen der Sorte "Walli" aus *in vitro*-Kultur verwendet. Aus diesen Internodienabschnitten erfolgte dann die Regeneration der transgenen Pflanzen. Von 136 bei der Transformation eingesetzten Internodienexplantaten wurden 77 auf kanamycinhaltigem Medium selektiert, aus welchen schließlich 36 Pflanzen regenerierten.

III.5.b Nachweis der Expression des transformierten *Dfr*-Gens

Die regenerierten Kartoffelpflanzen wurden nach der Bewurzelung aus der *in vitro*-Kultur ins Gewächshaus überführt, wo alle 36 regenerierten Pflanzen weiterwuchsen. Um die Expression des transformierten Apfel-*Dfr*-Gens in den regenerierten Pflanzen zu untersuchen, wurde aus vollständig ausgebildeten Blättern Gesamt-RNA hergestellt und diese zu cDNA umgeschrieben. Daraus wurde mit den Primern DFRApvo und DFRAphi mittels PCR die cDNA der Apfel-*Dfr* amplifiziert. Da die verwendeten Primer jeweils direkt am 5'- beziehungsweise am 3'-Ende der *Dfr*-cDNA binden, sollte bei der PCR ein etwa 1200 bp langer DNA-Abschnitt amplifiziert werden. Dieses 1200 bp lange DNA-Stück wurde bei allen untersuchten transformierten Pflanzen nachgewiesen, nicht jedoch bei untransformierten (Abb. 45). Dies zeigt deutlich die Expression des *Dfr*-Gens des Apfels in den Blättern der transgenen Kartoffelpflanzen.

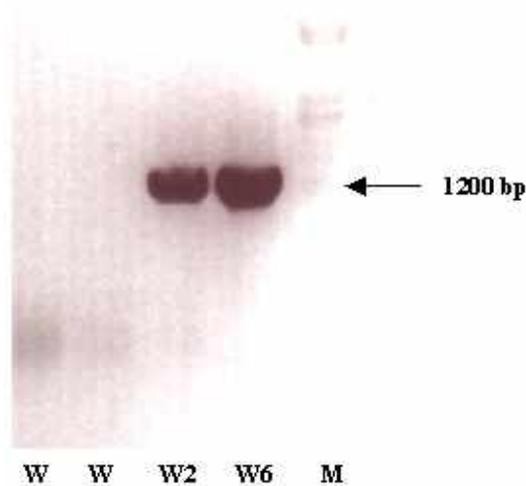


Abb. 45 : Nachweis der Expression der transformierten Apfel-*Dfr* in vollständig ausgebildeten Kartoffelblättern durch PCR; W : “Walli” untransformiert; W2 und W6 : “Walli” transformiert mit *Dfr* Ap; M : Marker; Agarosegelelektrophorese

III.5.c Nachweis der Enzymaktivität der Apfel-DFR in transgenen Kartoffeln

Aus vollständig ausgebildeten Blättern der mit *Dfr* Ap transformierten Kartoffelpflanzen wurde mit der für die Standardenzymtests verwendeten Aufarbeitungsmethode ein Enzymextrakt hergestellt. In diesem Enzymextrakt konnte die Aktivitäten der DFR und der FNR nachgewiesen wer-

III. Ergebnisse

den. Im Enzymextrakt aus vollständig ausgebildeten Blättern untransformierter Kartoffelpflanzen konnten diese Aktivitäten nicht nachgewiesen werden.

Durch die DFR wurde im Enzymextrakt aus den vollständig ausgebildeten Blättern transgener Pflanzen bei einem pH-Wert von 7,5 Dihydroquercetin zu Leukocyanidin umgesetzt. Dihydrokämpferol wurde bei keinem der getesteten pH-Werte zwischen 6,0 und 8,0 umgesetzt (Abb. 46). Bei einem pH-Wert von 6,0 wurde im Enzymextrakt aus den vollständig ausgebildeten Blättern transgener Pflanzen durch die FNR Eriodictyol zu Luteoforol umgesetzt, während ein Umsatz von Naringenin durch die FNR bei keinem der getesteten pH-Werte zwischen 6,0 und 8,0 stattfand (Abb. 47).

Wie bei den untransformierten, im Gewächshaus wachsenden Kartoffelpflanzen (sh. III.4.e) war auch bei den mit *Dfr* Ap transformierten Pflanzen, die ebenfalls allesamt im Gewächshaus wuchsen, die Aktivität der CHS in den vollständig ausgebildeten Blättern nicht nachweisbar. Durch die fehlende Aktivität dieses Schlüsselenzyms der Flavonoidbiosynthese kann die DFR weder Dihydroquercetin noch Eriodictyol als Substrat erhalten. Veränderungen im Flavonoidgehalt und Flavonoidmuster der vollständig ausgebildeten Blätter der mit *Dfr* Ap transformierten Kartoffelpflanzen gegenüber den vollständig ausgebildeten Blättern untransformierter Pflanzen konnten daher nicht festgestellt werden.

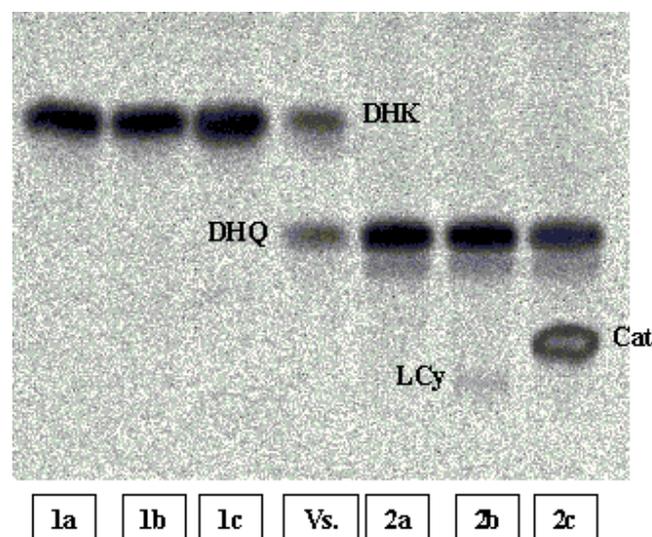


Abb. 46 : Nachweis der Aktivität der DFR in vollständig ausgebildeten Blättern; 1: Substrat Dihydrokämpferol; 2 : Substrat Dihydroquercetin; a : “Walli” untransformiert; b : “Walli” transformiert mit *Dfr* Ap; c : Blätter der Rosensorte “Pariser Charme”; Vs : Vergleichssubstanzen; Dünnschichtchromatogramm, Laufmittel CAW

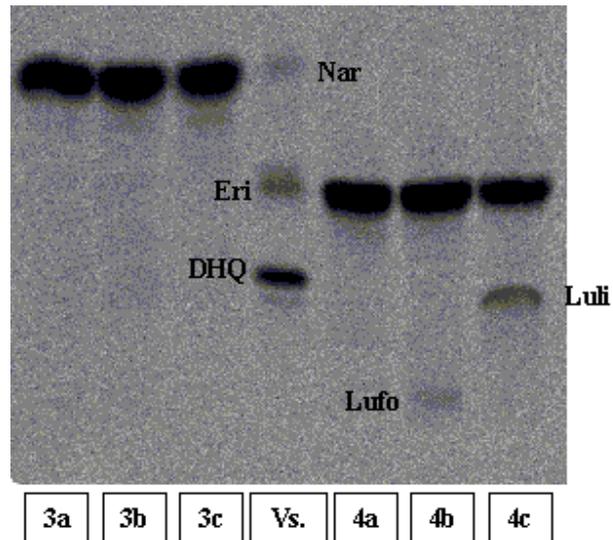


Abb. 47 : Nachweis der Aktivität der FNR in vollständig ausgebildeten Blättern; 3 : Substrat Naringenin; 4 : Substrat Eriodictyol; a : “Walli” untransformiert; b : “Walli” transformiert mit *Dfr* Ap; c : Blätter der Rosen-sorter “Pariser Charme”; Vs : Vergleichssubstanzen; Dünnschichtchromatogramm, Laufmittel CAW

III.6 Die Flavonoidbiosynthese in Laubblättern von Petunien

Bei der weißblühenden Petunienlinie W 39 wurde ein Block der FHT festgestellt (Froemel et al., 1985). Dieser Block der FHT sollte sich auf das Flavonoidmuster der Blätter ähnlich auswirken wie eine Behandlung mit Prohexadion-Ca bei Petunienlinien mit normaler FHT-Aktivität. Es wurden daher das Flavonoidmuster und die Aktivitäten der an der Flavonoidbiosynthese beteiligten Enzyme in den Laubblättern der Linie W 39 im Vergleich zu anderen Petunienlinien untersucht. Bei der Petunie wurde die Flavonoidbiosynthese enzymologisch bisher nur in den Blütenblättern eingehend untersucht. So konnten die Aktivitäten der CHS, der FHT, der F3'H und der F3'5'H, sowie der DFR nachgewiesen und verschiedene Gene kloniert werden (Stotz, 1985; Froemel, 1985; Britsch, 1986; van der Krol, 1990). Enzymologische Untersuchungen zur Flavonoidbiosynthese in den Laubblättern wurden bisher nicht durchgeführt.

III.6.a Nachweis des Flavonoidmusters in den Laubblättern der Petunie

Die Flavonoidmuster junger, vollständig ausgebildeter Laubblätter der weißblühenden Linie RL01, der dunkelblühenden Linie V 33 und der Linie W 39, die keine Aktivität der FHT in den Blütenblättern aufweist und daher wie die Linie RL01 weiße Blüten bildet (Froemel et al., 1985), wurden dünnschichtchromatographisch untersucht. Zusätzlich wurden Laubblätter der Linien RL01 und V 33 zehn Tage lang mit einer Lösung aus 0,1 % Prohexadion-Ca (BAS 125 10 W “Regalis”) in Wasser behandelt. Nach dieser Behandlung wurde ebenfalls dünnschichtchromatographisch das Flavonoidmuster in den Laubblättern ermittelt. Tabelle 13 zeigt eine Zusammenfassung der in den Laubblättern enthaltenen Flavonoidglyka mit und ohne Behandlung mit Prohexadion-Ca.

Tabelle 13 : Flavonoidglyka in Laubblättern von Petunien

Petunienlinie	junge, vollständig ausgebildete Blätter	nach Behandlung mit Prohexadion-Ca
RL01	Km, Qu	Nar, Eri
V 33	Km ,Qu	Nar, Eri
W 39	Eri	nicht untersucht

Die beiden Linien RL01 und V 33 unterschieden sich nicht im Flavonoidmuster der Laubblätter. Bei beiden Linien waren in den Laubblättern die Flavonolglyka Kämpferol und Quercetin enthalten, wobei der Kämpferolgehalt bei beiden Linien höher lag als der Quercetingealt (Abb 48). Die Linie W 39 dagegen bildete in den Laubblättern keine Flavonole, dafür reicherte sich dort das Flavanon Eriodictyol an (Abb. 48). Keine der drei untersuchten Linien bildete in den Laubblättern Flavone, Anthocyane oder Flavan 3-ole.

Nach der Behandlung mit Prohexadion-Ca zeigten die Laubblätter der Linien RL01 und V 33 ein ähnliches Flavonoidmuster wie die Laubblätter der Linie W 39 ohne Behandlung (Abb. 48). In den Laubblättern der Linien RL01 und V 33 ging der Flavonolgehalt jeweils deutlich zurück, und es reicherten sich Flavanone an. Allerdings wurden nach der Behandlung mit Prohexadion-Ca sowohl in den Laubblättern von RL01, als auch von V 33 Naringenin und Eriodictyol angereichert, während sich in unbehandelten Laubblättern von W 39 nur Eriodictyol anreicherte. Die Blockierung der FHT bei der Linie W 39 hat also eine ähnliche Auswirkung auf das Flavonoidmuster der Laubblätter wie eine Behandlung mit Prohexadion-Ca.

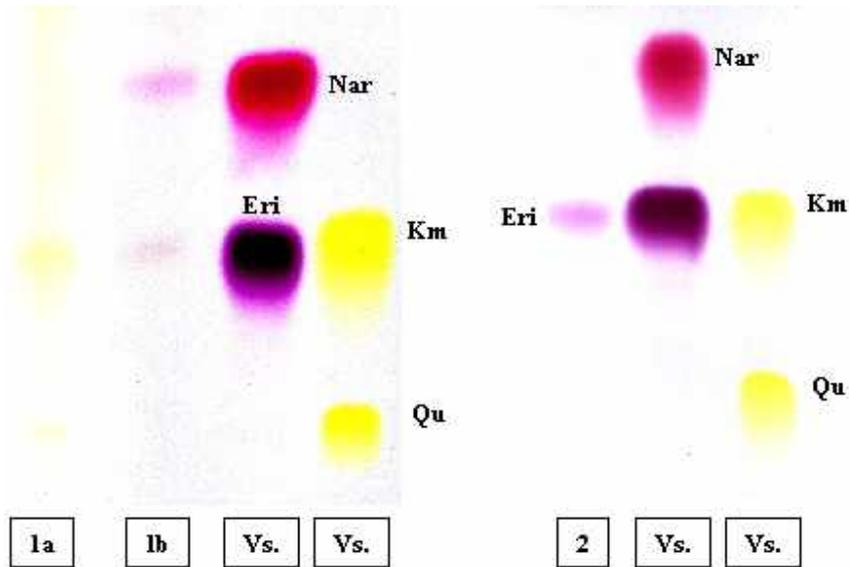


Abb 48 : Nachweis von Flavanonen und Flavonolen in den Laubblättern der Petunienlinien RL01 und W 39; 1a : RL01; 1b : RL01 nach Behandlung mit Prohexadion-Ca; 2 : W 39; Vs : Vergleichssubstanzen; Dünnschichtchromatogramme, Laufmittel CAW

III.6.b Enzyme der Flavonoidbiosynthese in den Laubblättern von Petunien

Zum Nachweis der Aktivität der an der Flavonoidbiosynthese in den Laubblättern der Petunie beteiligten Enzyme wurden mit der für die Standardenzymtests bei den Laubblättern der Rose angewandten Aufarbeitungsmethode Enzymextrakte aus jungen, vollständig ausgebildeten Laubblättern hergestellt. Untersucht wurden die Laubblätter der Petunienlinien RL01 und W 39. Da die Laubblätter der Linie V 33 das gleiche Flavonoidmuster aufweisen wie die Laubblätter der Linie RL01, ist bei diesen beiden Linien von gleichen Enzymaktivitäten in den Laubblättern auszugehen. Tabelle 14 gibt einen Überblick über die Enzymaktivitäten in den untersuchten Laubblättern. Im Enzymextrakt aus den Laubblättern der Linie RL01 konnten mit der verwendeten Aufarbeitungsmethode die Aktivitäten der Enzyme CHS, CHI, FHT und FLS nachgewiesen werden. Keine Aktivität zeigten die Enzyme F3'H, DFR und FNR. Die Aktivität der ANS wurde nicht untersucht, da in den Laubblättern keine Anthocyane enthalten sind.

Tabelle 14 : Enzymaktivitäten in Laubblättern der Petunienlinien RL01 und W 39

Gewebe	Enzym	Substrat	Produkt
vollständig ausgebildete Blätter RL01	CHS/CHI	4-Cumaroyl-CoA	Naringenin
		Kaffeoyl-CoA	Eriodictyol
	FHT	Naringenin	Dihydrokämpferol
		Eriodictyol	Dihydroquercetin
	FHT Proh.	Naringenin	kein Umsatz
		Eriodictyol	kein Umsatz
	F3'H	Naringenin	kein Umsatz
		Dihydrokämpferol	kein Umsatz
	FLS	Dihydrokämpferol	Kämpferol
		Dihydroquercetin	Quercetin
	DFR	Dihydrokämpferol	kein Umsatz
		Dihydroquercetin	kein Umsatz
	FNR	Naringenin	kein Umsatz
		Eriodictyol	kein Umsatz
vollständig ausgebildete Blätter W 39	CHS/CHI	4-Cumaroyl-CoA	Naringenin
		Kaffeoyl-CoA	Eriodictyol
	FHT	Naringenin	kein Umsatz
		Eriodictyol	kein Umsatz
	F3'H	Naringenin	kein Umsatz
		Dihydrokämpferol	kein Umsatz
	FLS	Dihydrokämpferol	kein Umsatz
		Dihydroquercetin	kein Umsatz
	DFR	Dihydrokämpferol	kein Umsatz
		Dihydroquercetin	kein Umsatz

III. Ergebnisse

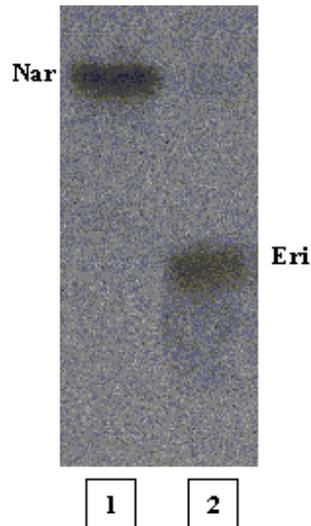


Abb. 49 : Aktivität von CHS und CHI im Enzymextrakt aus vollständig ausgebildeten Laubblättern der Petunienlinie RL01; 1 : Substrat 4-Cumaroyl-CoA; 2 : Substrat Kaffeoyl-CoA; Dünnschichtchromatogramm, Laufmittel CAW

Von den Enzymen CHS und CHI wurde sowohl 4-Cumaroyl-CoA zu Naringenin, als auch Kaffeoyl-CoA zu Eriodictyol umgesetzt (Abb. 49). Bei einem pH-Wert von 7,5 waren der Umsatz von 4-Cumaroyl-CoA und auch der Umsatz von Kaffeoyl-CoA am höchsten. Wurden beide Substrate zusammen in den Enzymtestansatz gegeben, so war der Umsatz der beiden Substrate bei einem pH-Wert von 7,5 gleich hoch.

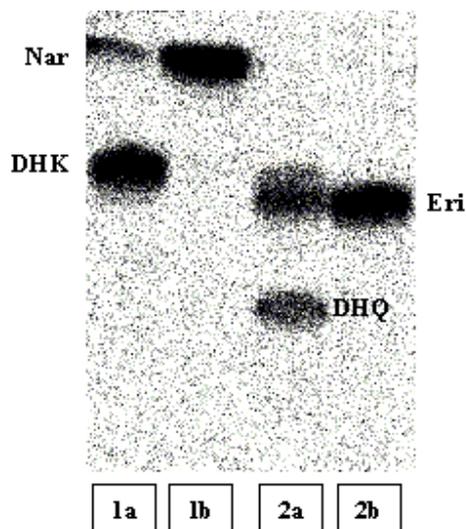


Abb. 50 : Aktivität der FHT im Enzymextrakt aus Laubblättern der Linie RL01; 1 : Substrat Naringenin; 2 : Substrat Eriodictyol; a : ohne Prohexadion-Ca; b : mit Prohexadion-Ca; Dünnschichtchromatogramm, Laufmittel CAW

III. Ergebnisse

Durch die FHT wurde im Enzymextrakt aus den Laubblättern der Linie RL01 bei einem pH-Wert von 7,5 Naringenin zu Dihydrokämpferol und Eriodictyol zu Dihydroquercetin umgesetzt. Bei diesem pH-Wert war Umsatz von Naringenin zu Dihydrokämpferol am höchsten und lag höher als der Umsatz von Eriodictyol zu Dihydroquercetin. Durch die Zugabe von 0,42 mg Prohexadion-Ca (BAS 125 10 W "Regalis") in den Enzymtestansatz, was 167 nmol reinem Prohexadion-Ca entspricht, konnten sowohl der Umsatz von Naringenin, als auch der Umsatz von Eriodictyol vollständig gehemmt werden (Abb. 50).

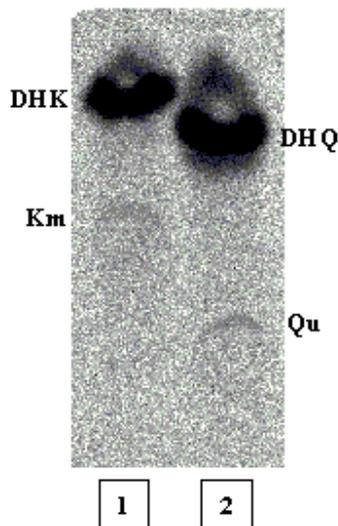


Abb. 51 : Aktivität der FLS im Enzymextrakt aus Laubblättern der Linie RL01; 1 : Substrat Dihydrokämpferol; 2 : Substrat Dihydroquercetin; Dünnschichtchromatogramm, Laufmittel BAW

Von der FLS wurden im Enzymextrakt aus den jungen Blättern bei einem pH-Wert von 7,5 Dihydrokämpferol zu Kämpferol und Dihydroquercetin zu Quercetin umgesetzt (Abb. 51). Der Umsatz war sehr schwach und nur bei diesem pH-Wert nachweisbar.

Die Aktivitäten der Enzyme F3'H, DFR und FNR waren bei keinem der jeweils getesteten pH-Werte zwischen 6,0 und 8,0 nachweisbar. Im Testansatz für die F3'H wurden entweder Naringenin oder Dihydrokämpferol als Substrate eingesetzt, im Testansatz für die DFR entweder Dihydrokämpferol oder Dihydroquercetin und im Testansatz für die FNR entweder Naringenin oder Eriodictyol.

Im Enzymextrakt aus den vollständig ausgebildeten Blättern der Linie W 39 konnte lediglich die Aktivität der Enzyme CHS und CHI festgestellt werden. Durch die CHS und die CHI wurden 4-Cumaroyl-CoA zu Naringenin und Kaffeyl-CoA zu Eriodictyol umgesetzt. Bei beiden Substra-

ten war der Umsatz bei einem pH-Wert von 7,5 am höchsten. Wurden bei diesem pH-Wert beide Substrate zusammen in den Enzymtestansatz gegeben, so war der Umsatz von beiden Substraten gleich hoch. Die CHS und die CHI in den Laubblättern der Linie W 39 verhalten sich also ebenso wie die CHS und die CHI in den Laubblättern der Linie RL01.

Im Gegensatz zum Enzymextrakt aus den Laubblättern der Linie RL01 konnte im Enzymextrakt aus den Laubblättern der Linie W 39 keine Aktivität der FHT nachgewiesen werden. Bei allen getesteten pH-Werten im Bereich zwischen 6,0 und 8,0 wurden weder Naringenin noch Eriodictyol umgesetzt.

Die Aktivitäten der Enzyme F3'H, FLS und DFR konnten im Enzymextrakt aus den Laubblättern der Linie W 39 bei keinem der jeweils getesteten pH-Werte zwischen 6,0 und 8,0 nachgewiesen werden. Die Aktivitäten der Enzyme FNR und ANS wurden nicht untersucht. Im Testansatz für die F3'H wurden entweder Naringenin oder Dihydrokämpferol als Substrate eingesetzt, im Testansatz für die FLS und die DFR entweder Dihydrokämpferol oder Dihydroquercetin.

III.6.c Flavonoidbiosynthesewege in den Laubblättern von Petunien

Auf Grund der Ergebnisse bei der Untersuchung der Enzymaktivitäten und des Flavonoidmusters mit und ohne Behandlung mit Prohexadion-Ca in vollständig ausgebildeten Laubblättern konnten für die Laubblätter der Petunienlinien RL01, V 33 und W 39 die in Abb. 52 dargestellte Flavonoidbiosyntheseweg aufgestellt werden.

III. Ergebnisse

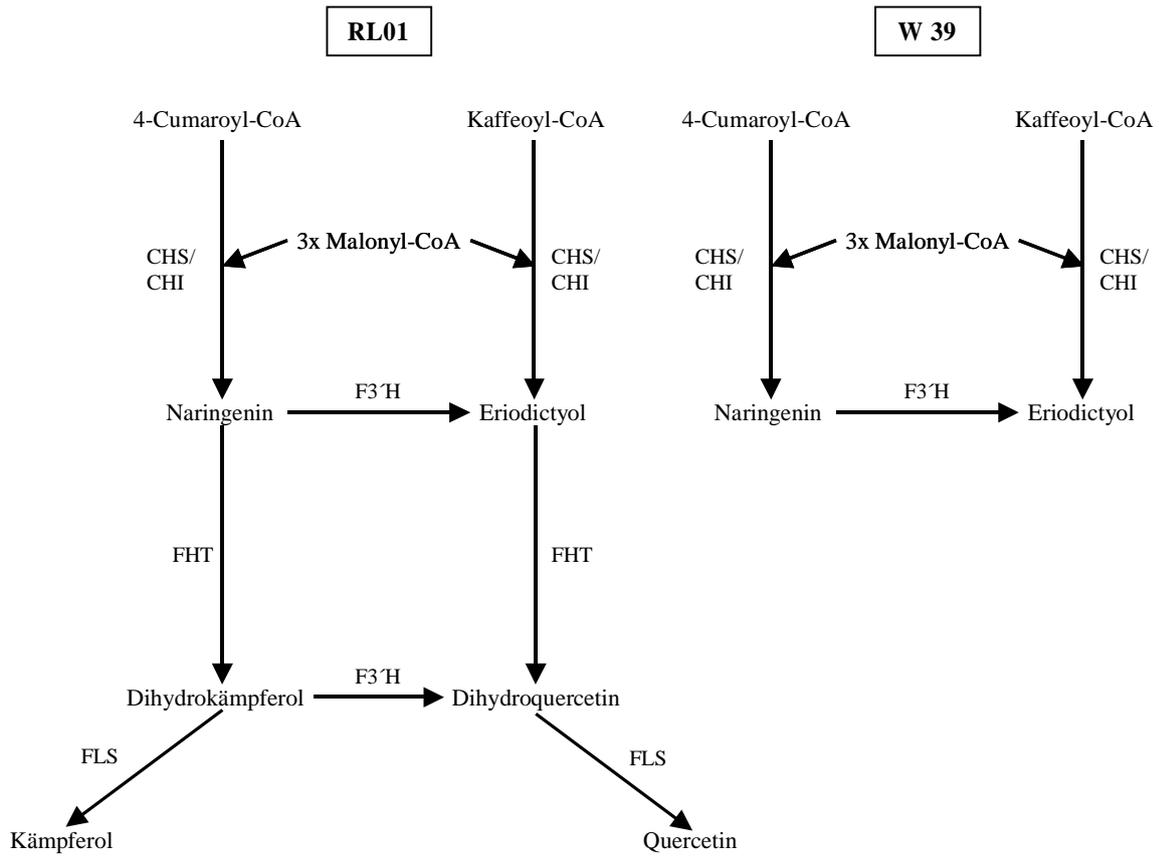


Abb 52 : Die Flavonoidbiosynthesewege in den Laubblättern der Petunienlinien RL01 bzw. V 33 und W 39

IV. Diskussion

Apfelbäume, die mit dem Wachstumsregulator Prohexadion-Ca behandelt worden sind, zeigen eine erhöhte Resistenz gegen den Befall von Feuerbrand (Yoder et al., 1999). Diese gesteigerte Resistenz wird dem bei der Behandlung mit Prohexadion-Ca im Apfelblatt neu gebildeten 3-Deoxyflavonoid Luteoforol zugeschrieben (Römmelt et al., 1999). Bei Luteoforol konnten antibakterielle Wirkungen nachgewiesen werden (Ramesh et al., 2001). Die Behandlung mit Prohexadion-Ca bewirkt im Apfelblatt eine Hemmung der Flavonoidbiosynthese, wodurch die Bildung der 3-Deoxyflavonoide Luteoforol und Luteoliflavan ermöglicht wird (Römmelt et al., 1999).

Biochemische und enzymologische Untersuchungen an den Laubblättern der Rose, der Kartoffel und der Petunie zeigten in dieser Arbeit, daß auch bei diesen Pflanzen wie beim Apfel die Flavonoidbiosynthese durch Prohexadion-Ca gehemmt werden kann. Bei der Rose war zudem die Bildung der 3-Deoxyflavonoide Luteoforol und Luteoliflavan möglich. In Inokulationsversuchen mit Sternrußtau zeigte sich bei mit Prohexadion-Ca behandelten Rosenblättern eine erhöhte Resistenz gegenüber unbehandelten Rosenblättern. Bei der Kartoffel sollte die Bildung von Luteoforol bei der Behandlung mit Prohexadion-Ca durch die Transformation des *Dfr*-Gens des Apfels ermöglicht werden.

IV.1 Das Flavonoidmuster in den Laubblättern

In sämtlichen in dieser Arbeit untersuchten Laubblättern, außer in denen der Petunienlinie W 39, sind Flavonole enthalten. In den Laubblättern aller untersuchter Rosensorten wurde Quercetin, bei einigen Sorten auch Kämpferol nachgewiesen. Quercetinderivate beinhalten auch die jungen, sowie die vollständig ausgebildeten Blätter der drei untersuchten Kartoffelsorten. Die jungen Blätter enthalten zusätzlich Kämpferolderivate. In den Laubblättern der Petunienlinien RL01 und V 33 wurden Kämpferol und Quercetin nachgewiesen. Auch in den Laubblättern des Apfels sind Flavonole enthalten, wobei vor allem Quercetinderivate vorkommen (Mayr et al., 1995). Anthocyane konnten in den Laubblättern aller untersuchter Rosensorten nachgewiesen werden. Auch in den jungen Kartoffelblättern sind Anthocyane enthalten, nicht jedoch in den vollständig ausgebildeten Blättern. Ebenfalls keine Anthocyane enthalten die Laubblätter der Petunie. Wie die Laubblätter der Rose und die jungen Blätter der Kartoffel enthalten auch die Laubblätter des Apfels

Anthocyane (Mayr et al., 1995). Flavan 3-ole sind nur in den Laubblättern der Rose enthalten, nicht jedoch in den Laubblättern von Kartoffel oder Petunie. Wie bei der Rose sind auch in den Apfelblättern Flavan 3-ole vorhanden. Bei der Rose kommt in den Laubblättern Catechin vor, in den Apfelblättern vor allem Epicatechin und nur in geringem Umfang Catechin (Mayr et al., 1995). Die Laubblätter der Rose weisen also mit Flavonolen, Anthocyanen und Flavan 3-olen ein ähnliches Flavonoidmuster auf wie die Laubblätter des Apfels. Die vollständig ausgebildeten Laubblätter von Kartoffel und Petunie enthalten weder Anthocyane noch Flavan 3-ole und zeigen daher im Flavonoidmuster größere Unterschiede zu den Laubblättern des Apfels.

Die Flavonoidmuster in den Laubblättern von Rose, Kartoffel und Petunie wurden bisher nicht oder nur wenig untersucht. Dagegen wurden in anderen Pflanzenteilen verschiedene Flavonoide nachgewiesen. Bei der Rose wurden in den Blütenblättern verschiedener Sorten unterschiedliche Anthocyanzusammensetzungen nachgewiesen, auf welche die unterschiedlichen Blütenfarben zurückzuführen sind (Elsherif, 2000; Mikanagi, 2000). Dagegen ist das Anthocyanmuster in den Laubblättern der verschiedenen Sorten weitgehend gleich. Bei der Kartoffel sind Flavonole auch in den Antheren, in reifen Pollen und im Pistil während der der Pollenschlauchkeimung enthalten (van Eldik et al., 1997). Anthocyane wurden in den Knollenschalen der Kartoffelsorte "Desirée" gefunden, wobei es sich hauptsächlich um Petunidin- und Pelargonidinderivate handelt (Stobiecki et al., 2003). Ähnlich wie bei der Rose liegen auch in den Blütenblättern verschiedener Petuniensorten unterschiedliche Anthocyanmuster vor, welche die verschiedenen Blütenfarben verursachen. In den Laubblättern wurden bei der Petuniensorte "Mitchell" wie bei den Linien RL01 und V 33 Kämpferol und Quercetin nachgewiesen (Bloor et al., 1998; Ryan et al., 2002). Wahrscheinlich sind Flavonole in den Laubblättern der meisten Petuniensorten unabhängig von deren Blütenfarbe vorhanden. RL01 und V 33 bringen vollkommen unterschiedliche Blütenfarben hervor, unterscheiden sich aber nicht im Flavonoidmuster der Laubblätter.

IV.2 Flavonoide als UV-B-Schutzpigmente

IV.2.a Unterschiede im Flavonolgehalt bei Kartoffeln im Freiland und im Gewächshaus

In vollständig ausgebildeten Laubblättern von Kartoffelpflanzen, die in einem Gewächshaus aus herkömmlichem Glas gewachsen waren, ist der Quercetiningehalt weitaus geringer als in vollständig ausgebildeten Laubblättern von Kartoffelpflanzen, die im Freiland gewachsen waren. Auch bei *Lactuca sativa* wurde beobachtet, daß bei Pflanzen in einem normalen Gewächshaus wesent-

lich weniger Flavonoide gebildet werden als bei Pflanzen im Freiland (Bogenrieder und Klein, 1978). Das auf die Erdoberfläche auftreffende Sonnenlicht enthält einen gewissen Anteil an UV-B-Strahlung. In mehreren Versuchen wurde festgestellt, daß im Gewächshaus unter herkömmlichem Glas wachsende Pflanzen keiner UV-B-Strahlung ausgesetzt sind (Bogenrieder und Klein, 1978). Eine Messung der Lichtverhältnisse an einem sonnigen Tag in dem Gewächshaus, in welchem die Kartoffelpflanzen in dieser Arbeit kultiviert worden waren, ergab, daß im gesamten Spektralbereich im Vergleich zum Freiland im Gewächshaus nur knapp 1/10 der Strahlungsintensität zur Verfügung steht und das Sonnenlicht kaum noch UV-B-Anteile enthält. Es ist also anzunehmen, daß die im Gewächshaus wachsenden Kartoffelpflanzen auf Grund fehlender UV-B-Strahlung keine Flavonoide in den vollständig ausgebildeten Blättern herstellen. Daß UV-B-Strahlung die Flavonoidbildung anregt, konnte bereits bei mehreren Pflanzenarten nachgewiesen werden, so bei Gerstekeimlingen (Tevini et al., 1981), Roggenkeimlingen (Tevini et al., 1991), *Arabidopsis thaliana* (Kubasek et al., 1992; Li et al., 1993), in Kiefernnadeln und Keimlingen (Schnitzler et al., 1996) und auch in Zellsuspensions-Kulturen von Petersilie (Wellmann, 1975).

Die Aktivität der CHS ist in vollständig ausgebildeten Blättern von im Gewächshaus wachsenden Kartoffelpflanzen kaum nachweisbar, jedoch eindeutig in Blättern von Pflanzen, die im Freiland wachsen. Im Promotor des *Chs*-Gens der Petunie und von *Antirrhinum majus* wurden Abschnitte entdeckt, die für eine Induzierbarkeit des *Chs*-Gens durch UV-B-Strahlung verantwortlich sind (van der Meer et al., 1990) (Staiger et al., 1989). Tatsächlich wurde auch beobachtet, daß schon wenige Minuten nach Bestrahlung mit UV-B-Licht die Expression des *Chs1*-Gens bei *Arabidopsis thaliana* stark zunimmt (Li et al., 1993). Somit läßt sich auch die fehlende Aktivität der CHS in den vollständig ausgebildeten Blättern der Kartoffeln im Gewächshaus gegenüber den Freilandpflanzen erklären. Es ist anzunehmen, daß die Expression des *Chs*-Gens ähnlich wie bei der Petunie, durch UV-B-Strahlung angeregt wird.

Auch für die Expression des *Fls*-Gens in den Blättern der Kartoffel kann eine Induktion durch UV-B-Strahlung angenommen werden. In einer früheren Untersuchung wurde in Kartoffelblättern keine Expression des *Fls*-Gens festgestellt (van Eldik et al., 1997). In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch eindeutig sowohl die Aktivität des FLS-Enzyms, als auch ein hoher Gehalt an Quercetin in den vollständig ausgebildeten Kartoffelblättern nachgewiesen, zu dessen Bildung die Aktivität der FLS notwendig ist. Das *Fls*-Gen sollte daher auch in den vollständig ausgebildeten Blättern exprimiert werden. Der Unterschied könnte sich daraus erklären, daß die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Kartoffelpflanzen im Freiland kultiviert wurden, während sie bei der Untersuchung von van Eldik et al. in Klimakammern wuchsen.

IV.2.b Flavonole als UV-B-Schutzpigmente

Flavonolderivate befinden sich in den Laubblättern aller untersuchter Rosen- Kartoffel- und Petunienarten mit Ausnahme der Petunienlinie W 39. Flavonole und deren Derivate werden bei nahezu allen Pflanzen als UV-B-Schutzpigment gebildet (Tevini et al., 1981). Sie sind daher in Geweben enthalten, die besonders der Sonneneinstrahlung ausgesetzt sind, also vor allem in den Laubblättern. Bei der Petunie weisen die Laubblätter fast aller bisher untersuchter Linien einen hohen Flavonolgehalt auf. Dagegen sind Flavonole in den Blütenblättern der Petunie bisher nur bei wenigen Linien nachgewiesen worden (Froemel et al., 1985). Da Blütenblätter jedoch nach ziemlich kurzer Zeit wieder absterben, und Laubblätter dagegen oft eine ganze Vegetationsperiode an der Pflanze bleiben, ist für die Blütenblätter ein Schutz vor UV-B-Strahlung weniger notwendig als für die Laubblätter.

Besonders das Flavonol Quercetin war in den vollständig ausgebildeten Laubblättern aller untersuchter Rosen- Kartoffel- und Petunienarten nachweisbar. Kämpferol trat dagegen nur in den Laubblättern der Petunienlinien RL01 und V 33, sowie in den Laubblättern einiger der untersuchten Rosensorten auf. In den vollständig ausgebildeten Blättern aller untersuchter Kartoffelsorten war kein Kämpferol nachweisbar. Quercetin wird eine bedeutende Rolle beim Schutz des Blattgewebes vor UV-B-Strahlung zugeschrieben (Tevini et al., 1981; Ryan et al., 2002). Gegenüber Kämpferol bietet Quercetin einen höheren Schutz vor UV-B-Strahlung und zeigt eine höhere antioxidative Wirkung (Montesinos et al., 1995).

IV.2.c Flavonoide als UV-B-Schutzpigmente in jungem Gewebe

In den vollständig ausgebildeten Kartoffelblättern konnte als einziges Flavonol Quercetin nachgewiesen werden. In jungen Kartoffelblättern befinden sich zusätzlich noch Kämpferolderivate sowie verschiedene Anthocyane. In den jungen Laubblättern der Rose liegt ein höherer Anthocyanengehalt vor als in älteren. Junges Gewebe weist also im Vergleich zum älteren einen höheren Flavonoidgehalt auf. Es wird vermutet, daß junges Pflanzengewebe gegenüber älterem deshalb einen höheren Flavonoidgehalt aufweist, weil dieses empfindlichere Gewebe stärker vor schädlicher UV-B-Strahlung geschützt werden muß (Tevini et al., 1981). In jungem Gewebe wird die Flavonoidbiosynthese meist ohne Einfluß von UV-B-Strahlung induziert, während in älterem Gewebe oft nur unter der Notwendigkeit des UV-B-Schutzes bei UV-B-Einstrahlung Flavonoide ge-

bildet werden. In jungem Gewebe wird die Flavonoidbiosynthese dagegen einmalig durch Blaulicht induziert und läuft dann ohne weitere Induktion begrenzt über einen bestimmten Zeitraum ab (Kubasek et al., 1992).

Ähnlich zu den jungen Kartoffelblättern werden auch in jungem Gewebe anderer Pflanzenarten zeitlich begrenzt Anthocyane gebildet, wie zum Beispiel in den Keimlingen von *Arabidopsis thaliana* (Kubasek et al., 1992), Senf (Mohr und Drumm-Herrel, 1983) und Tomate. Bei der Tomate werden ähnlich wie bei der Kartoffel auch in den ersten Laubblättern noch Anthocyane gebildet (Goldsbrough et al., 1994). Wie bei der Kartoffel weisen die vollständig ausgebildeten Blätter von *Arabidopsis thaliana* keine Anthocyane mehr auf, sondern nur noch Flavonole (Kubasek et al., 1992). Entsprechend dieser Befunde konnte bei Keimlingen von *Arabidopsis thaliana* in jungem, anthocyanidinhaltigem Gewebe auch eine starke Expression der Gene der *Chs* und der *Dfr* nachgewiesen werden.

Es wird vermutet, daß neben den Flavonolen auch die Anthocyane dem jungen Gewebe einen hohen Schutz vor UV-B-Strahlung bieten (Mohr und Drumm-Herrel, 1981). Auch bei der Rose läßt sich ein vorbeugender verstärkter Schutz vor UV-B-Strahlung als Grund für die Anthocyanbildung in den jungen Blättern annehmen (Mohr, 1981). In jungem Gewebe wird ein erhöhter Flavonoidgehalt also schon vorsorglich als Schutz vor UV-B-Strahlung angelegt, was sich auch an der Bildung von Anthocyanen in unterirdischen Kartoffelsprossen zeigt (Ergebnisse nicht dargestellt).

IV.3 Die Flavonoidbiosynthese bei der Rose

IV.3.a Die Enzymaktivitäten in den Laubblättern

In den Laubblättern bilden alle untersuchten Rosensorten ausschließlich 3'4'-hydroxylierte Anthocyane. Lediglich bei der Sorte "Samba" konnte in den Laubblättern mit Delphinidin ein 3'4'5'-hydroxyliertes Anthocyanidin nachgewiesen werden. Alle untersuchten Rosensorten bilden in den Laubblättern Quercetin, einige zusätzlich noch Kämpferol. Ebenfalls bei allen Sorten konnte in den Blättern Catechin nachgewiesen werden, mit Ausnahme der Rose der Herkunft "Drewlo".

Im Enzymextrakt aus den Laubblättern der Sorte "Pariser Charme" wurden die Aktivitäten der Enzyme CHS, CHI, FHT, DFR, FNR und LAR nachgewiesen. Der Enzymextrakt wurde zunächst mit der Aufarbeitungsmethode nach Dellus et al, 1997, hergestellt. Dabei konnte aller-

dings die Aktivität der FNR nicht nachgewiesen werden. Wurde jedoch die Gelfiltration über Sephadex G-50 weggelassen, so zeigte sich im Enzymextrakt auch die Aktivität der FNR. Die übrigen Enzyme zeigten gleich hohe, oder teilweise sogar höhere Aktivitäten als mit Gelfiltration. Die Aufarbeitungsmethode nach Dellus ohne Gelfiltration wurde daher für alle enzymologischen Untersuchungen an der Rose, der Petunie und der Kartoffel angewandt.

Im Enzymextrakt aus den Laubblättern der Rose setzt die DFR ausschließlich Dihydroquercetin als Substrat um, nicht jedoch Dihydrokämpferol. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, daß mit Cyanidin und Päonidin ausschließlich 3'4'-hydroxylierte Anthocyanidine, sowie mit Catechin ausschließlich ein 3'4'-hydroxyliertes Flavan 3-ol in den Laubblättern nachweisbar ist. Die Aktivität der DFR wird in einem Enzymtestansatz zusammen mit der Aktivität der LAR nachgewiesen. Eingesetztes Dihydroquercetin wird zu Catechin umgesetzt, ohne daß Leukocyanidin als Zwischenprodukt erscheint. Ähnlich wird beim beobachteten Umsatz von Eriodictyol zum Luteoliflavan wird die Aktivität der FNR zusammen mit der Aktivität der LAR nachgewiesen. Luteoforol als Zwischenprodukt läßt sich dabei nicht nachweisen. Diese Befunde lassen auf eine hohe Aktivität der LAR in den Laubblättern schließen. Die LAR kann dabei den Umsatz von Luteoforol zu Luteoliflavan ähnlich gut katalysieren, wie den Umsatz von Leukocyanidin zum Catechin.

Im Enzymextrakt aus den Laubblättern, der mit der Aufarbeitungsmethode nach Dellus ohne Gelfiltration hergestellt worden war, konnten die Aktivitäten der Enzyme FLS, F3'H und ANS nicht nachgewiesen werden. Für die Bildung der in den Laubblättern vorhandenen Flavonoide sind die Aktivitäten dieser Enzyme allerdings notwendig. In einem Enzymextrakt aus Laubblättern der Sorte "Kardinal", der mit der Enzymaufarbeitungsmethode nach Claudot et al., 1992 hergestellt worden war, konnte eine schwache Aktivität der FLS beobachtet werden (Schlangen et al., 2003). Für den Nachweis der Aktivität der FLS in den Laubblättern von Rosen scheint also die Aufarbeitungsmethode nach Claudot besser geeignet zu sein, als die hier für die Standardenzymtests verwendete Aufarbeitungsmethode nach Dellus ohne Gelfiltration. Jedoch konnten auch mit der Methode nach Claudot im Enzymextrakt aus den Laubblättern weder die Aktivität der F3'H, noch die der ANS nachgewiesen werden (Schlangen, 2003). Weil aber in den Blättern der Sorte "Pariser Charme" mit Quercetin, Catechin, Cyanidin und Päonidin ausschließlich 3'4'-hydroxylierte Flavonoide vorkommen, ist dort eine hohe Aktivität der F3'H anzunehmen. Bei der F3'H handelt es sich um ein Cytochrom P450-Enzym. Diese membrangebundenen Enzyme befinden sich in den mikrosomalen Zellbestandteilen. Ein Grund für die nicht nachweisbare Aktivität dieses Enzyms im Enzymextrakt könnte sein, daß weder bei der Aufarbeitungsmethode nach Dellus, noch bei der Aufarbeitungsmethode nach Claudot diese mikrosomalen Zellbestandteile besonders

abgetrennt werden. Bei der ANS handelt es sich zwar wie bei der FHT um eine lösliche α -keto-glutaratabhängige Dioxygenase, jedoch ist es bisher in noch keinem Pflanzengewebe und mit keiner Aufarbeitungsmethode gelungen, die Aktivität der ANS nachzuweisen. In den Laubblättern der Rose liegt aber ein hoher Gehalt an Anthocyanen vor, so daß von der Anwesenheit einer aktiven ANS ausgegangen werden kann.

IV.3.b Abweichende Flavonoidmuster bei Rosenlaubblättern

Einige Rosensorten zeigen größere Abweichungen im Flavonoidmuster der Laubblätter gegenüber den meisten anderen untersuchten Rosensorten. Bei der Sorte „Samba“ wird zusätzlich zu den 3'4'-hydroxylierten Anthocyanen in den Laubblättern auch noch in geringem Maße das 3'4'5'-hydroxylierte Delphinidin gebildet. Dies läßt bei der Sorte „Samba“ auf die Aktivität einer F3'5'H in den Laubblättern schließen. Diese Enzymaktivität konnte allerdings im Enzymextrakt ebensowenig wie die der F3'H nachgewiesen werden. Auch bei der F3'5'H handelt es sich um ein membrangebundenes Cytochrom P450-Enzym, was den Nachweis der Enzymaktivität mit der für die Standardenzymtests verwendeten Aufarbeitungsmethode nach Dellus ohne Gelfiltration aus den bereits in Kapitel IV.3.a angeführten Gründen erschwert. Der Nachweis der Aktivität der F3'H im Enzymextrakt aus Laubblättern ist auch bei anderen Rosensorten nicht möglich, obwohl 3'4'-hydroxylierte Flavonoide in wesentlich höherem Gehalt in den Laubblättern aller untersuchter Rosensorten vorliegen, als 3'4'5'-hydroxylierte Flavonoide bei der Sorte „Samba“. Es ist anzunehmen, daß die Bildung von Delphinidin in den Laubblättern der Sorte „Samba“ auf die Fähigkeit der F3'H zurückzuführen ist, auch die F3'5'H-Reaktion katalysieren zu können. Die Anwesenheit eines eigenen F3'5'H-Enzyms ist dagegen eher unwahrscheinlich. Außer bei der Sorte „Samba“ konnten bisher bei keiner weiteren Rosensorte weder in den Blütenblättern noch in den Laubblättern 3'4'5'-hydroxylierte Flavonoide nachgewiesen werden (Elsherif, 2000; Mikanagi et al., 2000). Auch ist der sehr Gehalt an Delphinidin in den Laubblättern der Sorte „Samba“ sehr niedrig. Auf Grund des Fehlens jeglicher 3'4'5'-hydroxylierte Flavonoide bei Rosen ist nicht anzunehmen, daß die Fähigkeit der F3'H, neben der F3'H-Reaktion auch die F3'5'H-Reaktion katalysieren zu können, unter den verschiedenen Rosensorten weit verbreitet sein könnte. Auch andere Befunde sprechen für das Vorhandensein einer F3'5'H-Nebenaktivität der F3'H speziell in den Laubblättern der Sorte „Samba“ und gegen eine veränderte veränderte Substratspezifität anderer Enzyme aus der Flavonoidbiosynthese.

Im Enzymextrakt aus den Laubblättern der Sorte „Samba“ konnte der Umsatz von Pentahydroxyflavanon zu Dihydromyricetin durch die FHT nachgewiesen werden. Dieser Umsatz ist im Enzymextrakt aus Laubblättern der Sorte „Pariser Charme“, wo keine 3'4'5'-hydroxylierten Flavonoide vorkommen, in gleichem Maße nachweisbar. Der Umsatz von Pentahydroxyflavanon zu Dihydromyricetin war sowohl bei „Samba“ als auch bei „Pariser Charme“ nur etwa halb so stark wie die Umsätze von Naringenin oder Eriodictyol. Insgesamt zeigen die FHT-Enzyme in den Laubblättern der Sorten „Samba“ und „Pariser Charme“ keinen bedeutsamen Unterschied in der Substratspezifität. Daher kann angenommen werden, daß die FHT der Rose grundsätzlich neben Naringenin und Eriodictyol auch Pentahydroxyflavanon umsetzen kann. Die Bildung von Delphinidin in den Laubblättern der Sorte „Samba“ kann also nicht auf eine gegenüber anderen Rosensorten veränderte Substratspezifität der FHT zurückgeführt werden.

In den Blüten- und Laubblättern wird die Bildung von 4'-hydroxylierten oder 3'4'-hydroxylierten Anthocyanen durch die Substratspezifität der DFR bestimmt (sh. IV.3.d). Im Enzymextrakt aus den Laubblättern konnte die DFR nur Dihydroquercetin, nicht jedoch Dihydrokämpferol umsetzen. Jedoch sollte die DFR in den Laubblättern der Rose grundsätzlich auch Dihydromyricetin umsetzen können, da es sonst in den Laubblättern der Sorte „Samba“ zu keiner Delphinidinbildung sondern zur Anreicherung von Dihydromyricetin kommen würde. Auch in den Laubblättern anderer Sorten müßte es zur Anreicherung von Dihydromyricetin kommen, wenn bei jeder Sorte in den Laubblättern die Aktivität einer F3'5'H vorliegen würde und nur eine veränderte Substratspezifität der DFR bei der Sorte „Samba“ für die Bildung von Delphinidin verantwortlich wäre. Da kein ¹⁴C-markiertes Dihydromyricetin zur Verfügung stand konnte der Umsatz von Dihydromyricetin durch die DFR jedoch nicht nachgewiesen werden.

Die Laubblätter der Sorte „Versicolor“ weisen einen sehr geringen Anthocyanengehalt auf. Dagegen ist der Umsatz von Dihydroquercetin zu Catechin im Enzymtest mit einem Enzymextrakt aus den Laubblättern der Sorte „Versicolor“ wesentlich stärker als im Enzymtest mit einem Enzymextrakt aus den Laubblättern der Sorte „Pariser Charme“. Dies deutet auf eine sehr hohe Aktivität der LAR bei der Sorte „Versicolor“ hin. Der größte Teil des durch die DFR gebildeten Leukocyanidins wird durch die LAR zu Catechin umgesetzt, so daß durch die ANS nur noch wenig Cyanidin gebildet werden kann (Abb. 53). Ein Nachweis der Aktivität der ANS im Enzymextrakt ist nicht möglich.

Wie in den Laubblättern der Sorte „Versicolor“ liegt auch in den Laubblättern der Rose „Drewlo“ ein sehr niedriger Anthocyanengehalt vor. Zusätzlich ist bei dieser Rose kein Catechin in den Laubblättern nachweisbar, ebensowenig wie Luteoliflavan nach der Behandlung mit Prohexadion-Ca.

IV. Diskussion

Im Enzymtest mit einem Enzymextrakt aus Laubblättern der Rose “Drewlo” konnte jedoch der Umsatz von Dihydroquercetin zu Catechin durch die DFR und die LAR nachgewiesen werden. Dieser Umsatz war schwächer als im Enzymtest mit einem Enzymextrakt aus Laubblättern der der Sorte “Pariser Charme”. Dieser niedrige Umsatz läßt in Verbindung mit dem Fehlen von Catechin und dem niedrigen Cyanidingehalt in den Laubblättern auf eine niedrige Aktivität der DFR in den Laubblättern schließen. Das wenige durch den schwachen Umsatz der DFR gebildete Leukocyanidin wird im Laubblatt durch die ANS zu Cyanidin umgesetzt, so daß für die LAR kein Leukocyanidin mehr als Substrat für den Umsatz zum Catechin zur Verfügung steht. Nachdem die ANS in Enzymextrakten aus Pflanzengeweben keinerlei Aktivität aufweist, kann im Enzymextrakt aus den Laubblättern der Rose “Drewlo” nun die LAR alles gebildete Leukocyanidin zu Catechin umsetzen. Leukocyanidin tritt beim Umsatz von Dihydroquercetin zum Catechin durch die DFR und die LAR in Enzymtests mit Enzymextrakten aus Laubblättern der Sorte “Drewlo” nicht als Zwischenprodukt auf, wie es auch bei Testansätzen für die DFR/LAR-Aktivität mit Enzymextrakten aus Laubblättern der Sorte “Pariser Charme” der Fall ist. Die LAR weist also in den Laubblättern der Rose “Drewlo” eine ähnlich starke Aktivität auf wie in den Laubblättern der Sorte “Pariser Charme” (Abb. 53).

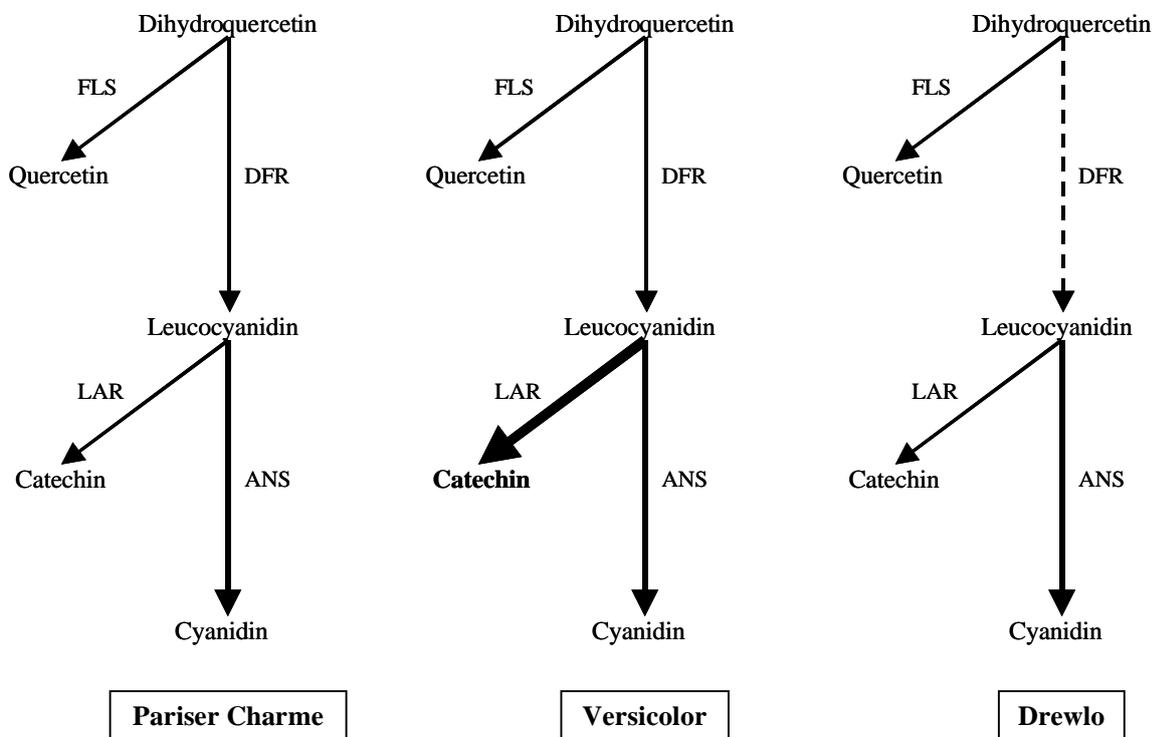


Abb. 53 : Synthesewege zu Cyanidin und Catechin bei “Pariser Charme”, “Versicolor” und “Drewlo”

Eine weitere Erklärung für den sehr niedrigen Anthocyangehalt in den Laubblättern der Rosensorten „Drewlo“ und „Versicolor“ könnte sein, daß dort die Flavonoid 3-O-Glycosyltransferase (FGT) nicht oder nur sehr schwach aktiv ist. Die Beobachtung, daß der Anthocyangehalt von der Expression der FGT abhängt, während CHS, FHT, DFR und ANS normal exprimiert werden, wurde bereits bei verschiedenen Sorten von Weintrauben gemacht (Boss, 1996).

IV.3.c Die Enzymaktivitäten in den Blütenblättern

Weisen die Laubblätter bei verschiedenen Rosensorten ein recht einheitliches Flavonoidmuster auf, so unterscheiden sich deren Blütenblätter darin deutlicher voneinander. Zwar kommen bei allen in dieser Arbeit untersuchten Sorten in den Blütenblättern die Flavonole Kämpferol und Quercetin vor, doch unterscheidet sich die Anthocyanzusammensetzung teilweise erheblich. Je nach Sorte sind in den Blütenblättern unterschiedliche Anteile an 4'-hydroxylierten und 3'4'-hydroxylierten Anthocyanen enthalten. Bei einigen Sorten kommen in den Blütenblättern auch ausschließlich 4'-hydroxylierte oder ausschließlich 3'4'-hydroxylierte Anthocyane vor (Elsherif, 2000). 3'4'5'-hydroxylierte Anthocyane wurden allerdings bei keiner Sorte in den Blütenblättern nachgewiesen (Elsherif, 2000). Daneben kommen auch Blütenblätter ganz ohne Anthocyane vor, wie zum Beispiel bei der gelbblühenden Sorte „Frisco“. Unabhängig vom Anthocyanmuster der jeweiligen Blütenblätter wurden in den Laubblättern bei allen untersuchten Sorten ausschließlich 3'4'-hydroxylierte Anthocyane nachgewiesen, mit Ausnahme der Sorte „Samba“.

Im Enzymextrakt aus den Blütenblättern der Sorte „Pariser Charme“ konnten wie im Enzymextrakt aus den Laubblättern die Aktivitäten der Enzyme CHS, CHI, FHT, DFR, FNR und LAR nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den Laubblättern setzt die DFR im Enzymextrakt aus den Blütenblättern zusätzlich zu Dihydroquercetin auch Dihydrokämpferol um, wobei Leukopelargonidin entsteht. Der Umsatz der DFR von Dihydrokämpferol geschieht deutlich schwächer als deren Umsatz von Dihydroquercetin, erklärt aber das Vorkommen von Pelargonidin in den Blütenblättern dieser Sorte.

Beim Umsatz von Dihydroquercetin wird wie bei den Laubblättern im Testansatz Catechin gebildet, ohne daß Leukocyanidin als Zwischenstufe nachweisbar ist. Im Enzymtestansatz können also die Aktivitäten der DFR und der LAR zusammen nachgewiesen werden. Ähnlich wird Eriodictyol im Enzymtest zu Luteoliflavan umgesetzt, ohne daß Luteoforol als Zwischenprodukt auftritt. Wie im Enzymextrakt aus den Laubblättern ist auch im Enzymextrakt aus den Blütenblättern die

Aktivität der FNR zusammen mit der Aktivität der LAR nachweisbar. Dies deutet auf eine hohe Aktivität der LAR in den Blütenblättern hin. Während die LAR Leukocyanidin und Luteoforol als Substrat umsetzen kann, findet dagegen kein Umsatz von Leukopelargonidin, das im Enzymtestansatz von der DFR aus Dihydrokämpferol gebildet wird, zum Flavan 3-ol Afzelechin statt. Für die Substratspezifität der LAR scheint also das Hydroxylierungsmuster am B-Ring entscheidend zu sein.

Obwohl die Enzymaktivität der LAR im Enzymextrakt aus Blütenblättern von jungen, noch nicht aufgeblühten Rosenblüten eindeutig nachweisbar ist, ist in diesen Blütenblättern kein Catechin vorhanden. Erst in Blütenblättern von Blüten, die bereits einige Tage aufgeblüht sind, ist Catechin enthalten. Zu Beginn der Blütenentwicklung ist die Anthocyanbildung am höchsten, so daß in einer frühen Blütenentwicklungsstufe mit einer hohen Aktivität der ANS zu rechnen ist. Leukocyanidin stellt sowohl für die ANS, als auch für die LAR das Substrat dar und wird daher bei wesentlich stärkerer Aktivität der ANS gegenüber derer der LAR eher zu Cyanidin als zu Catechin umgesetzt. In späteren Blütenentwicklungsstufen werden Anthocyane dann nicht mehr neu gebildet, weshalb die Aktivität der ANS in diesen Entwicklungsstufen deutlich zurückgehen sollte. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits bei Blütenblättern der Petunie gemacht, wo die Aktivitäten von FHT und F3'H nur in frühen Blütenstadien vorhanden sind (Froemel et al., 1985; Stotz et al., 1985). Weist die ANS in den Blütenblättern der Rose schließlich nur mehr eine geringe Aktivität auf, so kann Leukocyanidin durch die LAR zu Catechin umgesetzt werden. Die Aktivität der LAR ist also während der gesamten Blütenentwicklung zu einem gewissen Grad vorhanden, während die ANS nur in den frühen Entwicklungsstufen eine hohe Aktivität zeigt. Mit der Aufarbeitungsmethode nach Dellus ist allerdings weder mit noch ohne Gelfiltration der Nachweis der Aktivität der ANS möglich.

Im Enzymextrakt aus Blütenblättern der Sorte "Kardinal" konnten mit der Aufarbeitungsmethode nach Dellus mit Gelfiltration ebenfalls die Aktivitäten von CHS, FHT und DFR mit den gleichen Substratspezifitäten wie bei der Sorte "Pariser Charme" nachgewiesen werden. Die Aktivitäten der FNR und der LAR wurden bei dieser Sorte nicht untersucht (Elsherif, 2000). Weder im Enzymextrakt aus Blütenblättern der Sorte "Pariser Charme" noch im Enzymextrakt aus denen der Sorte "Kardinal" (Elsherif, 2000) konnten die Aktivitäten von F3'H, FLS, und ANS beobachtet werden. Auch im Enzymextrakt aus den Laubblättern mit der Aufarbeitungsmethode nach Dellus konnten die Aktivitäten dieser Enzyme nicht nachgewiesen werden. Aufgrund des Flavonoidmusters in den Blütenblättern kann jedoch von einer Aktivität dieser drei Enzyme in den Blütenblättern, zumindest in dem untersuchten frühen Blütenstadium, ausgegangen werden. Es ist anzuneh-

men, daß ähnlich wie bei den Laubblättern die verwendete Aufarbeitungsmethode nach Dellus, mit oder ohne Gelfiltration, für den Nachweis der Aktivität der Enzyme F3'H, FLS und ANS nicht geeignet ist.

IV.3.d Die Substratspezifität der DFR bei Rosen

Die DFR zeigt bei der Rose eine engere Substratspezifität als die Enzyme CHS und FHT. In den Laubblättern kann die CHS sowohl 4-Cumaroyl-CoA als auch Kaffeoyle-CoA mit etwa gleich guter Rate umsetzen, gleiches gilt für die FHT beim Umsatz von Naringenin oder Eriodictyol. Die DFR dagegen setzt ausschließlich Dihydroquercetin um, nicht jedoch Dihydrokämpferol. Die Laubblätter der untersuchten Rosensorten enthalten nur 3'4'-hydroxylierte Anthocyane. In den Blütenblättern der Sorte "Pariser Charme" wurde neben den 3'4'-hydroxylierten Anthocyanidinen Cyanidin und Päonidin auch das 4'-hydroxylierte Pelargonidin nachgewiesen. Damit stimmt überein, daß im Enzymextrakt aus Blütenblättern der Sorte "Pariser Charme" sowohl Dihydroquercetin, als auch Dihydrokämpferol durch die DFR zu den jeweiligen Flavan 3,4-Diolen Leukocyanidin und Leukopelargonidin, welche die Vorstufen für Cyanidin und Pelargonidin darstellen, umgesetzt werden. In den Blütenblättern der Sorte "Crimson Glory" wurde Cyanidin als einziges Anthocyanidin nachgewiesen. Im Enzymtest mit einem Enzymextrakt aus Blütenblättern dieser Sorte setzte die DFR nur Dihydroquercetin als Substrat um (Elsherif, 2000). Die jeweilige Substratspezifität der DFR ist also bei der Rose dafür entscheidend, welche Anthocyane in einem Gewebe gebildet werden.

Auch bei der Petunie wurde ein Zusammenhang zwischen der Substratspezifität der DFR und den in den Blütenblättern enthaltenen Anthocyanen gefunden. Die DFR-Enzyme aus den Blütenblättern verschiedener Petunienlinien setzen nur Dihydroquercetin oder Dihydromyricetin um, nicht jedoch Dihydrokämpferol (Forkmann und Ruhnau, 1987). Mit diesem Befund stimmt überein, daß bei keiner Linie in den Blütenblättern 4'-hydroxylierte Anthocyane nachgewiesen werden konnten (Meyer et al., 1987). Im *Dfr*-Gen der Petunie wurde eine 26 bp lange Sequenz ermittelt, welche für die Substratspezifität des DFR-Enzyms verantwortlich sein könnte. Der Austausch bestimmter einzelner Aminosäuren in diesem Bereich bewirkt eine Veränderung der Substratspezifität des DFR-Enzyms (Johnson et al., 2001).

Bei Rosen kann die DFR innerhalb der gleichen Pflanze in verschiedenen Geweben eine unterschiedliche Substratspezifität aufweisen. Bei der Sorte "Pariser Charme" wird im Laubblatt von

der DFR nur Dihydroquercetin, in den Blütenblättern jedoch Dihydroquercetin und Dihydrokämpferol umgesetzt. In einer Untersuchung mit Southern-Blot hat sich gezeigt, daß die Rose fünf *Dfr*-Gene besitzt (Stefanek, nicht veröffentlicht). Es kann angenommen werden, daß diese Gene für DFR-Enzyme mit jeweils unterschiedlicher Substratspezifität kodieren und in unterschiedlichen Geweben exprimiert werden. Solche Genfamilien für *Dfr*-Gene sind bereits bei Petunie (Beld et al., 1989), Gerbera (Helariutta et al., 1993) und den wie die Rose zu den *Rosaceae* gehörenden Apfel (Fischer et al., 2003) und Erdbeere (Moyano et al., 1998) nachgewiesen worden. Aus cDNA aus den Laubblättern der Rosensorte "Kardinal" wurde ein *Dfr*-Gen kloniert und heterolog in Hefe exprimiert. Dabei konnte der Umsatz von Dihydroquercetin zu Leukocyanidin nachgewiesen werden, aber auch, wenn auch deutlich schwächer, der Umsatz von Dihydrokämpferol zu Leukopelargonidin (Gosch, 2003). Dieser Befund steht im Gegensatz dazu, daß im Enzymextrakt aus den Laubblättern von der DFR ausschließlich Dihydroquercetin umgesetzt wird. Darüber hinaus stimmen die beobachtete Substratspezifität der DFR im Enzymextrakt aus den Laubblättern mit dem Anthocyanmuster in den Laubblättern überein. Möglicherweise geht die hohe Substratspezifität der DFR aus den Laubblättern der Rose bei heterologer Expression teilweise verloren. Der Grund dafür könnte sein, daß heterolog in Hefe exprimierte DFR anders als im Blattgewebe nicht mit anderen Enzymen der Flavonoidbiosynthese in einen Multienzymkomplex eingebunden ist (Winkel-Shirley, 1999). In Hefe heterolog exprimierte DFR-Enzyme aus Apfel und Birne, deren cDNA ebenfalls aus den Laubblättern kloniert worden ist, setzen ebenfalls sowohl Dihydroquercetin, als auch Dihydrokämpferol um. Jedoch konnte auch in Enzymextrakten aus den jeweiligen Laubblättern bei den DFR-Enzymen von Apfel und Birne jeweils der Umsatz von Dihydroquercetin und von Dihydrokämpferol nachgewiesen werden (Fischer et al., 2003). Die DFR-Enzyme aus den Laubblättern von Apfel und Birne weisen also im Gegensatz zur Rose bei heterologer Expression und im Enzymextrakt aus den Laubblättern die gleiche Substratspezifität auf. Allerdings besitzen die DFR-Enzyme aus den Laubblättern von Apfel und Birne eine weniger hohe Substratspezifität als die DFR aus den Laubblättern der Rose, so daß eine Abnahme der Substratspezifität von der DFR im Enzymextrakt zur heterolog exprimierten DFR nicht auftreten kann. Ähnlich wie die DFR aus den Laubblättern der Rose setzt im Enzymextrakt auch die DFR aus den jungen Blättern der Kartoffel, die DFR der Petunie (Forkmann und Ruhнау, 1987) und die DFR aus *Cymbidium hybrida* (Johnson et al., 1999) kein Dihydrokämpferol um.

IV.4 Die Flavonoidbiosynthese bei der Kartoffel

Die in den untersuchten Geweben der Kartoffelsorte "Walli" nachgewiesenen Aktivitäten und Substratspezifitäten der Enzyme stimmen mit dem jeweils dort nachgewiesenen Flavonoidmuster überein. Im Enzymextrakt aus den jungen Blättern 11 Tage nach der Keimung, sowie im Enzymextrakt aus den vollständig ausgebildeten Blättern konnten jeweils die Enzymaktivitäten der CHS, der CHI, der FHT, der F3'H und der FLS nachgewiesen werden. Diese Enzyme wiesen in den Enzymextrakten aus den jungen sowie aus den vollständig ausgebildeten Blättern die gleichen Substratspezifitäten auf.

Die Aktivität der DFR konnte nur im Enzymextrakt aus den jungen Blättern nachgewiesen werden, nicht jedoch im Enzymextrakt aus den vollständig ausgebildeten Blättern. Dies stimmt mit dem Befund überein, daß die jungen Blätter im Gegensatz zu den vollständig ausgebildeten Blättern Anthocyane enthalten. Im Enzymextrakt aus den jungen Blättern konnte der Umsatz von Dihydroquercetin zu Leukocyanidin durch die DFR nachgewiesen werden, nicht jedoch der Umsatz von Dihydrokämpferol zu Leukopelargonidin. Dies stimmt mit dem Anthocyanmuster in den jungen Blättern der Sorte "Walli" überein. Der Umsatz von Dihydroquercetin zu Leukocyanidin durch die DFR ist jedoch ziemlich schwach. Die jungen Blätter sind bereits vollständig rot gefärbt, sobald sie die Erdoberfläche durchbrechen, so daß ihr Anthocyangehalt danach nicht mehr weiter zunimmt. In den untersuchten jungen Blättern 11 Tage nach der Keimung ist die Anthocyanbildung also schon abgeschlossen, so daß die Enzymaktivität der DFR in dieser Blattentwicklungsstufe bereits deutlich abgesunken ist. Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei der Flavonbildung in den Blütenblättern von *Gerbera hybrida* gemacht. In späteren Blütenentwicklungsstufen, wo bereits der höchste Flavongehalt erreicht ist, nimmt die Aktivität der FNS II immer weiter ab (Martens, 2000). In Blüten von Petunien ist die Aktivität der FHT ebenfalls abhängig von der Entwicklungsstufe der Blüte und nimmt schnell ab, nachdem der Anthocyangehalt während der Blütenentwicklung seinen Höchststand erreicht hat (Froemel et al., 1985). Eine Aktivität der FNR konnte in den jungen Kartoffelblättern mit den Substraten Naringenin und Eriodictyol nicht nachgewiesen werden. Dies läßt darauf schließen, daß die DFR der Kartoffel nicht in der Lage ist auch Flavanone umzusetzen.

Die im Enzymextrakt aus den vollständig ausgebildeten Blättern nachgewiesenen Enzymaktivitäten führen zur Bildung des in den vollständig ausgebildeten Blättern enthaltenen Quercetins. Allerdings wurde im Enzymextrakt aus den vollständig ausgebildeten Blättern zusätzlich der Umsatz von Dihydrokämpferol zu Kämpferol durch die FLS beobachtet, obwohl Kämpferol in

den vollständig ausgebildeten Blättern nicht vorkommt. Ein Grund dafür könnte sein, daß Naringenin von der F3'H schnell zu Eriodictyol umgesetzt wird. Der Umsatz von Naringenin zu Eriodictyol durch die F3'H ist im Enzymtest mit einem Enzymextrakt aus den vollständig ausgebildeten Blättern deutlich höher als der Umsatz von Dihydrokämpferol zu Dihydroquercetin. Der Umsatz von Eriodictyol zu Dihydroquercetin durch die FHT ist im Enzymextrakt aus vollständig ausgebildeten Blättern gleich hoch wie der Umsatz von Naringenin zu Dihydrokämpferol. Das *Fht*-Gen wurde aus cDNA von vollständig ausgebildeten Blättern kloniert und in Hefe heterolog exprimiert. Auch dabei war der Umsatz von Eriodictyol zu Dihydroquercetin ebenso hoch wie der Umsatz von Naringenin zu Dihydrokämpferol (Betz, 2002). Eriodictyol, das durch den durch die F3'H katalysierten Umsatz aus Naringenin entstanden ist, kann also durch die FHT mit hoher Rate zu Dihydroquercetin umgesetzt werden. Diese Befunde legen also eine Bevorzugung des Syntheseweges von Naringenin über Eriodictyol und Dihydroquercetin zum Quercetin, anstatt über Dihydrokämpferol nahe (Abb. 54). Zwar wäre es aufgrund des guten Umsatzes von Kaffeo-yl-CoA zu Eriodictyol durch die CHS und die CHI auch denkbar, daß von vornherein kein Naringenin gebildet wird, sondern Eriodictyol. Dagegen spricht jedoch die hohe Aktivität der F3'H, die in diesem Falle nicht notwendig wäre.

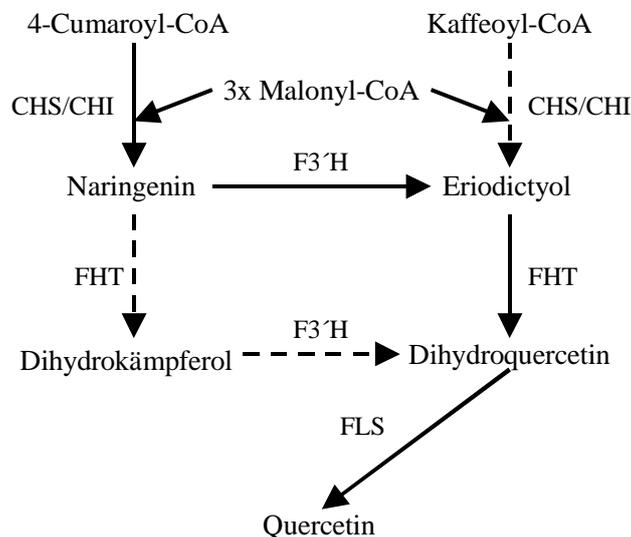


Abb. 54 : bevorzugter Flavonoidbiosyntheseweg in vollständig ausgebildeten Kartoffelblättern; durchgezogen : Hauptweg; gestrichelt : Nebenweg

In den jungen Blättern ist neben Quercetin auch Kämpferol vorhanden. Wie im Enzymextrakt aus den vollständig ausgebildeten Blättern setzt auch im Enzymextrakt aus den jungen Blättern die

FLS sowohl Dihydrokämpferol, als auch Dihydroquercetin um. In diesen Blättern stimmen also die nachgewiesenen Flavonole mit der beobachteten Substratspezifität der FLS überein. Da die FLS in den jungen wie in den vollständig ausgebildeten Blättern trotz unterschiedlichem Flavonolmuster die gleiche Substratspezifität zeigt, kann angenommen werden, daß in den jungen und in den vollständig ausgebildeten Blättern dasselbe FLS-Enzym exprimiert wird. Die Kartoffel besitzt auch nur ein einziges *Fls*-Gen, wie Untersuchungen mit Southern Blot ergaben (van Eldik et al., 1997).

IV.5 Die Flavonoidbiosynthese in den Laubblättern von Petunien

Die im Enzymextrakt aus den Laubblättern der Petunienlinien RL01 und V 33 nachgewiesenen Aktivitäten und Substratspezifitäten der Enzyme stimmen mit den in den Laubblättern nachgewiesenen Flavonoiden überein. Im Enzymextrakt aus den Laubblättern wurde die Aktivität der CHS, der CHI, der FHT und der FLS nachgewiesen. Die Laubblätter enthalten die Flavonole Kämpferol und Quercetin, zu deren Bildung die im Enzymextrakt nachgewiesenen Enzymaktivitäten und Substratspezifitäten führen. Die Aktivitäten der DFR und der F3'H konnten im Enzymextrakt aus den Laubblättern nicht nachgewiesen werden. Von einer Aktivität der DFR ist in den Laubblättern allerdings auch nicht auszugehen, da weder Anthocyane noch Flavan 3-ole in den Laubblättern der Petunie enthalten sind. Dagegen kann aus der Anwesenheit von Quercetinderivaten in den Laubblättern dort auf eine Aktivität der F3'H geschlossen werden. Eine vergleichbare Beobachtung wurde auch in den Laubblättern der Rose gemacht, wo fast ausschließlich 3'4'-hydroxylierte Flavonoide vorkommen. Im Enzymextrakt aus den Rosenlaubblättern konnte jedoch ebenfalls keine Aktivität der zu deren Bildung notwendigen F3'H nachgewiesen werden. Einerseits handelt es sich, wie schon erwähnt, bei der F3'H um ein membrangebundenes Cytochrom P450-Enzym (Forkmann, 1991), was den Nachweis ihrer Aktivität mit der in dieser Arbeit angewendeten Enzymaufarbeitungsmethode erschwert. Andererseits ist in den Laubblättern der Petunie eine schwächere Aktivität der F3'H zu erwarten als in den Laubblättern der Kartoffel, wo die Aktivität der F3'H mit derselben Aufarbeitungsmethode nachweisbar ist, da in den Petunienblättern bei den Flavonolen der Anteil an Kämpferolderivaten überwiegt, während bei der Kartoffel ausschließlich Quercetinderivate in den vollständig ausgebildeten Blättern vorliegen. Ebenfalls auf eine niedrige Aktivität der F3'H in den Laubblättern der Petunie deutet hin, daß sich bei der Behandlung mit Prohexadion-Ca in den Laubblättern der Petunie mehr Naringenin als Erio-

dictyol anreichert. In Rosenlaubblättern reichert sich dagegen nach der Behandlung mit Prohexadion-Ca nur Eriodictyol an.

Aus den Blütenblättern von Petunien wurde bereits ein *F3'H*-Gen kloniert und heterolog in Hefe exprimiert, wobei sich ein Umsatz von Naringenin zu Eriodictyol zeigte. Die Expression dieses Gens konnte nur in verschiedenen Blütenteilen, nicht aber in den Laubblättern nachgewiesen werden (Brugliera et al., 1999). In einer anderen Untersuchung zeigte sich, daß das *F3'H*-Gen in den Laubblättern der Petunie nur bei starker UV-B-Bestrahlung exprimiert wird (Ryan et al., 2002). Möglich ist daher, daß unter den normalen Lichtbedingungen, denen die Petunienpflanzen in der vorliegenden Arbeit ausgesetzt waren, das *F3'H*-Gen in den vollständig ausgebildeten Blättern nur sehr schwach exprimiert wird und daher auch die Aktivität der *F3'H* in den Laubblättern niedrig ist. In den vollständig ausgebildeten Petunienblättern dürfte also eine schwache Aktivität der *F3'H* vorhanden sein, die zur Bildung von Quercetin führt, sich aber mit der hier verwendeten Enzymaufarbeitungsmethode nicht nachweisen läßt.

Bisher wurde die Flavonoidbiosynthese bei der Petunie vor allem in der Blüte mit Augenmerk auf Auswirkungen auf die Blütenfarbe untersucht. In den Blütenblättern werden Flavonole und je nach Sorte verschiedene Anthocyane gebildet, während in den Laubblättern keine Anthocyane, sondern nur Flavonole auftreten. In den Blütenblättern liegt der Flavonolgehalt mit 10 % des Trockengewichts deutlich höher als in den Laubblättern mit nur 2 % des Trockengewichts (Bloor et al., 1998). In Enzymextrakten aus Blütenblättern konnten die Aktivitäten der FHT, der FLS (Froemel et al., 1985) und der *F3'H* nachgewiesen werden. Durch die *F3'H* wurde im Enzymextrakt aus den Blütenblättern Naringenin zu Eriodictyol und Dihydrokämpferol zu Dihydroquercetin umgesetzt (Stotz et al., 1985).

IV.6 Die Bildung von 3-Deoxyflavonoiden bei der Behandlung mit Prohexadion-Ca

Bei der Behandlung mit Prohexadion-Ca werden in den Apfelblättern die 3-Deoxyflavonoide Luteoforol und Luteoliflavan gebildet, während der Gehalt an Flavonolen und Anthocyanen zurückgeht. Gleichzeitig reichert sich in den Blättern das Flavanon Eriodictyol an (Römmelt et al., 1999). Die Ursache für den Rückgang des Flavonol- und Anthocyangehaltes, sowie für die Anreicherung von Eriodictyol ist die Hemmung der FHT durch Prohexadion-Ca. Das durch die Hemmung der FHT angereicherte Eriodictyol kann die durch die DFR des Apfels zum 3-Deoxy-

flavonoid Luteoforol umgesetzt werden (Fischer et al., 2003). Daraus wird durch die LAR Luteoliflavan gebildet.

IV.6.a DFR und FNR

Neben unterschiedlicher Substratspezifität für Dihydroflavonole mit verschiedenen Hydroxylierungsmustern am B-Ring weisen die DFR-Enzyme aus verschiedenen Pflanzen noch weitere Unterschiede in der Substratspezifität auf. Einige DFR-Enzyme sind in der Lage, außer bei Dihydroflavonolen auch bei Flavanonen die Carbonylgruppe an der 4-Position im C-Ring zu reduzieren. Das Enzym wird dann als Flavanon 4-Reduktase (FNR) bezeichnet. Diese FNR-Reaktion ist für die Bildung von 3-Deoxyflavonoiden notwendig. Beim Umsatz von Flavanonen durch die FNR entstehen Flavan 4-ole, zu welchen auch das Luteoforol zählt, das die Vorstufe zum Luteoliflavan darstellt. Luteoliflavan konnte in den Laubblättern von Apfel (Römmelt et al., 1999) und Rose bei der Behandlung mit Prohexadion-Ca nachgewiesen werden. Übereinstimmend mit dieser Beobachtung konnte sowohl bei der Rose, als auch beim Apfel (Fischer et al., 2003) in Enzymextrakten aus Laubblättern die Aktivität der FNR nachgewiesen werden.

In den Blütenblättern verschiedener Arten der *Gesneriaceae* wurden die 3-Deoxyanthocyanidine Luteolinidin und Apigenidin nachgewiesen (Stich und Forkmann, 1988). Die Vorstufen zu diesen 3-Deoxyanthocyanidinen stellen die Flavan 4-ole Luteoforol und Apiforol dar. In Enzymextrakten aus den Blütenblättern von *Sinningia cardinalis* und *Columnea hybrida*, die beide zu den *Gesneriaceae* zählen, konnte jeweils die Aktivität der FNR mit Umsatz von Flavanonen zu den Flavan 4-olen, und auch die Aktivität der DFR nachgewiesen werden (Stich und Forkmann, 1988). Die Aktivität der FNR konnte weiterhin in Enzymextrakten aus den Blütenblättern der Rose und aus den Laubblättern der Birne (Fischer et al., 2003) nachgewiesen werden. In den Enzymextrakten aus den Laubblättern und den Blütenblättern der Rose ist die Aktivität der FNR bei einem pH-Wert von 6,0 am höchsten. Bei diesem pH-Wert zeigt die FNR auch in Enzymextrakten aus den Blütenblättern von *Sinningia cardinalis* und *Columnea hybrida* hohe Aktivität (Stich und Forkmann, 1988).

Daß es sich bei DFR und FNR um das gleiche Enzym handelt, haben mehrere Versuche gezeigt, bei denen ein *Dfr*-Gen heterolog in Hefe exprimiert worden ist, und dabei neben der DFR- auch die FNR-Reaktion nachgewiesen werden konnte (Gosch, 2003; Fischer et al., 2003). Bei Kartoffeln, die mit dem *Dfr*-Gen aus dem Apfel transformiert worden waren, konnte im Enzymextrakt

aus vollständig ausgebildeten Blättern, in denen bei untransformierten Kartoffeln keine Aktivität der DFR vorhanden ist, neben dem durch die DFR katalysierten Umsatz von Dihydroquercetin zu Leukocyanidin auch der Umsatz von Eriodictyol zu Luteoforol, und damit die FNR-Reaktion, nachgewiesen werden. Auch daran zeigt sich, daß die FNR-Aktivität eine Nebenaktivität einiger DFR-Enzyme darstellt.

Im Enzymextrakt aus den anthocyanhaltigen jungen Kartoffelblättern, in denen die Aktivität der DFR vorhanden ist, konnte die Aktivität der FNR nicht nachgewiesen werden. Die DFR der Kartoffel zeigt also im Gegensatz zur DFR von Rose oder Apfel keine FNR-Aktivität. Ebenfalls keine FNR-Aktivität zeigt auch die DFR aus Enzymextrakten aus den Blütenblättern der Nelke oder der Levkoje (Stich et al., 1992). Nicht alle DFR-Enzyme weisen also die Fähigkeit auf, auch die FNR-Reaktion zu katalysieren. Ein Enzym, das nur die FNR-Reaktion, nicht aber die DFR-Reaktion katalysieren kann, ist bisher nicht entdeckt worden.

Tabelle 15 : DFR-Enzyme mit FNR-Aktivität

Pflanze	DFR-Aktivität Enzymextrakt	FNR-Aktivität Enzymextrakt	DFR-Aktivität het. Expression	FNR-Aktivität het. Expression
Apfel	+	+	+	+
Birne	+	+	+	+
<i>Camellia sinensis</i>	nicht untersucht	nicht untersucht	+	+
<i>Columnea hybrida</i>	+	+	nicht untersucht	nicht untersucht
Erdbeere	+	+	+	+
Kartoffel	+	-	nicht untersucht	nicht untersucht
Levkoje	+	-	nicht untersucht	nicht untersucht
Moosbeere	+	+	+	+
Nelke	+	-	nicht untersucht	nicht untersucht
Rose	+	+	+	+
<i>Sinningia cardinalis</i>	+	+	nicht untersucht	nicht untersucht
Wein	+	+	+	+
Weißdorn	nicht untersucht	nicht untersucht	+	+

Die Aktivität der FNR konnte bei der Rose nicht nur in Enzymextrakten aus Laub- oder Blütenblättern, sondern auch bei heterolog in Hefe exprimierter DFR nachgewiesen werden (Gosch, 2003). Die heterolog in Hefe exprimierten DFR-Enzyme von Apfel und Birne wiesen ebenfalls FNR-Aktivität auf (Fischer et al., 2003). Auch heterolog in Hefe exprimierte DFR-Enzyme von

Camellia sinensis, Erdbeere, Moosbeere, Wein und Weißdorn zeigen FNR-Aktivität (Gosch, 2003).

Im Enzymextrakt aus den Laubblättern der Rose wurde das 3´4´-hydroxylierte Eriodictyol durch die DFR/FNR in Verbindung mit der LAR zu Luteoliflavan umgesetzt. Das 4´-hydroxylierte Naringenin konnte dagegen nicht umgesetzt werden. Dies ist ähnlich zur beobachteten Substratspezifität der DFR der Rose auf der Ebene der Dihydroflavonole, wo nur das 3´4´-hydroxylierte Dihydroquercetin durch die DFR umgesetzt wird. Offenbar ist das Hydroxylierungsmuster am B-Ring für den Umsatz durch die DFR entscheidend, während die Substituenten am C-Ring eine geringere Rolle spielen. Einen Zusammenhang zwischen der Substratspezifität der DFR auf Ebene der Flavanone und der Substratspezifität auf Ebene der Dihydroflavonole zeigt sich auch bei *Sinningia cardinalis*. Durch die FNR werden hier Eriodictyol, Naringenin und Pentahydroxyflavanon zu den jeweiligen Flavan 4-olen umgesetzt, und entsprechend Dihydroquercetin, Dihydrokämpferol und Dihydromyricetin durch die DFR zu den entsprechenden Flavan 3,4-diolen (Stich und Forkmann, 1988). Die Substratspezifität der DFR für verschiedene Dihydroflavonole hängt von einem bestimmten Aminosäuresequenzabschnitt ab (Johnson et al., 2001). Daher wäre es denkbar, daß für die Fähigkeit von DFR-Enzymen, auch die FNR-Reaktion katalysieren zu können, ebenfalls ein bestimmter Aminosäuresequenzabschnitt verantwortlich sein könnte. Bisher liegen dazu allerdings keine Erkenntnisse vor. Jedoch dürfte der bereits bekannte, für die Substratspezifität bezüglich des Hydroxylierungsmusters am B-Ring der Dihydroflavonole verantwortliche Sequenzabschnitt der DFR auch für die Substratspezifität für die FNR-Reaktion bezüglich des Hydroxylierungsmusters am B-Ring der Flavanone verantwortlich sein.

IV.6.b Der Einfluß von Prohexadion-Ca

Bei der Behandlung von Laubblättern mit Prohexadion-Ca geht bei Petunie, Rose und in den jungen Kartoffelblättern der Gehalt an Flavonolen deutlich zurück, und in den Laubblättern der Rose und den jungen Kartoffelblättern wird zusätzlich die Bildung der Anthocyane unterbunden. In den Laubblättern von Rose und Petunie wurde bei der Behandlung mit Prohexadion-Ca die Anreicherung von Flavanonen nachgewiesen. Bei der Rose trat in den Laubblättern nach der Behandlung das normalerweise nicht in den Laubblättern vorkommende 3-Deoxyflavonoid Luteoliflavan auf. Ein Rückgang im Catechingehalt konnte in den mit Prohexadion-Ca behandelten Rosenlaubblättern dagegen nicht festgestellt werden. Bei der Behandlung von Apfelblättern mit Pro-

hexadion-Ca ergaben sich ähnliche Ergebnisse wie bei der Behandlung von Rosenlaubblättern. Auch die Apfelblätter verloren ihre rote Färbung, was mit einem deutlichen Rückgang des Anthocyangehaltes verbunden war. Der Gehalt an Flavonolen ging im Apfelblatt bei der Behandlung mit Prohexadion-Ca ebenfalls zurück. Wie bei der Rose wurde auch beim Apfel nach der Behandlung mit Prohexadion-Ca in den Laubblättern Luteoliflavan nachgewiesen (Römmelt et al., 1999).

Prohexadion-Ca hemmt kompetitiv α -ketoglutaratabhängige Dioxygenasen (Rademacher, 2000). Zu den α -ketoglutaratabhängigen Dioxygenasen zählen auch die FHT, die FLS und die ANS in der Flavonoidbiosynthese (Forkmann und Heller, 1999). Diese Enzyme können also auch durch Prohexadion-Ca gehemmt werden. Die vollständige Hemmung der Aktivität der FHT konnte im Enzymtest bei der Zugabe von Prohexadion-Ca in den Enzymtestansatz mit Enzymextrakten aus den Laubblättern von Rose, Kartoffel und Petunie festgestellt werden. Auch die Aktivität von heterolog in Hefe exprimierter FHT aus der Kartoffel konnte durch die Zugabe von Prohexadion-Ca in den Enzymtestansatz vollständig unterbunden werden (Betz, 2002). Ähnlich wie Prohexadion-Ca können auch Pyridin-2,4-dicarboxylat und Pyridin-2,5-dicarboxylat die Aktivität der FHT hemmen. Sie weisen ebenfalls eine Strukturähnlichkeit zum α -Ketoglutarat auf, so daß auch diese beiden Stoffe als kompetitive Inhibitoren wirken können (Britsch und Grisebach, 1986). Darüber hinaus wirken auch KCN, EDTA und Diethylthiocarbamat hemmend auf die Enzymaktivität der FHT (Froemel et al., 1985).

Weil die FHT im Flavonoidbiosyntheseweg vor der FLS und der ANS steht, lassen sich die beobachteten Veränderungen im Flavonoidgehalt des mit Prohexadion-Ca behandelten Gewebes vor allem auf die Hemmung der FHT zurückführen (Römmelt et al., 2003). Der Umsatz der Flavonone zu den Dihydroflavonolen wird durch die Hemmung der FHT verhindert, was zum Rückgang des Flavonol- und Anthocyangehaltes einerseits führt, und andererseits die Anreicherung von Flavanonen in den Laubblättern von Rose und Petunie erklärt. In den Laubblättern der Rose liegt die Aktivität der DFR vor. Durch die Hemmung der FHT bekommt die DFR keine Dihydroflavonole mehr als Substrat zur Verfügung gestellt. Die DFR kann nun als FNR das durch die Hemmung der FHT angereicherte Eriodictyol zu Luteoforol umsetzen, welches seinerseits durch die LAR zum in den Laubblättern nachweisbaren Luteoliflavan umgesetzt wird. Die FNR-Reaktion wurde nicht nur bei der Rose, sondern auch beim Apfel (Fischer et al., 2003) im Enzymextrakt aus Laubblättern nachgewiesen. 3-Deoxyflavonoide kommen normalerweise nicht in den Laubblättern von Rose und Apfel (Treutter, 2001) vor, dagegen natürlicherweise in den Blütenblättern verschiedener Arten der *Gesneriaceae* (Stich und Forkmann, 1988).

Rosenlaubblätter und Apfellaubblätter weisen sehr ähnliche Enzymaktivitäten auf und zeigen auch nach der Behandlung mit Prohexadion-Ca ein ähnliches Flavonoidmuster. In den vollständig ausgebildeten Blättern der Kartoffel, sowie in den Laubblättern der Petunie sind keine Aktivitäten von DFR und FNR vorhanden. Dort wird nach bei der Behandlung mit Prohexadion-Ca weder Luteoliflavan noch Luteoforol gebildet. In den jungen Kartoffelblättern ist zwar die Aktivität der DFR vorhanden, jedoch ist die DFR der Kartoffel nicht in der Lage Eriodictyol zu Luteoforol umzusetzen. Auch in diesen Blättern wird daher bei der Behandlung mit Prohexadion-Ca weder Luteoliflavan noch Luteoforol gebildet. Bei Kartoffel und Petunie kommt es also in den Laubblättern im Gegensatz zu Rose und Apfel bei der Behandlung mit Prohexadion-Ca zu keiner Bildung von neuen 3-Deoxyflavonoiden.

Werden vollständig ausgebildete Kartoffelblätter mit Prohexadion-Ca behandelt, so ist im Gegensatz zur Rose kein Rückgang im Flavonolgehalt zu beobachten. Im Enzymtest mit einem Enzymextrakt aus diesen Blättern ist die Aktivität der FHT durch die Zugabe von Prohexadion-Ca allerdings vollständig hemmbar. Jedoch befinden sich bereits vor der Behandlung mit Prohexadion-Ca Quercetinderivate in den Blättern, welche während des Zeitraumes der Behandlung nicht abgebaut werden. In den jungen Kartoffelblättern sind nach der Behandlung mit Prohexadion-Ca weder Flavonole noch Anthocyane vorhanden. Da die jungen Kartoffelblätter schon sehr kurz nach dem Beginn der Keimung mit Prohexadion-Ca behandelt werden, kann dort die Flavonoidbiosynthese schon von Beginn an unterbrochen werden, so daß es zu keiner Bildung von Flavonolen und Anthocyanen kommt. Ähnlich wie in den vollständig ausgebildeten Kartoffelblättern die Quercetinderivate in den Rosenlaubblättern schon vor der Behandlung mit Prohexadion-Ca Catechin enthalten. Daher ist kein Rückgang des Catechingehaltes durch die Behandlung mit Prohexadion-Ca feststellbar. Der Catechingehalt kann in den Laubblättern bei der Behandlung mit Prohexadion-Ca sogar noch leicht ansteigen. Restliches in den Laubblättern befindliches Dihydroquercetin kann nämlich nur noch durch die DFR und die LAR zum Catechin umgesetzt werden, weil die FLS und die ANS als α -ketoglutaratabhängige Dioxygenasen ebenfalls durch Prohexadion-Ca gehemmt werden.

Die Petunienlinie W 39 zeigt in den Laubblättern ohne Behandlung mit Prohexadion-Ca ein ähnliches Flavonoidmuster wie die Linie RL01 mit Behandlung. In den Laubblättern der Linie W 39 sind keine Flavonole enthalten, sondern Eriodictyol. Bei der Linie RL01 sind die Flavonole Kämpferol und Quercetin in den Laubblättern enthalten. Eriodictyol und Naringenin werden bei der Linie RL01 nach der Behandlung mit Prohexadion-Ca angereichert. Bei der Linie W 39 konnte im Enzymextrakt aus den Laubblättern keine Aktivität der FHT festgestellt werden, weshalb in

den Laubblättern keine Flavonole gebildet werden können und sich dort das Flavanon Eriodictyol anreichert. Bei der Linie RL01 ist die Aktivität der FHT im Enzymextrakt aus den Laubblättern eindeutig nachweisbar, so daß in deren Laubblättern Flavonole gebildet werden können. Die Linie W 39 ist homozygot rezessiv für das *an3*-Allel, was eine Mutation des *fht*-Gens darstellt. Daher fehlen auch bei der Linie W 39 in den Blütenblättern Flavonole und Anthocyane. Wie in den Laubblättern sind auch in den Blütenblättern der Linie W 39 Flavanone enthalten (Froemel et al., 1985), und die Aktivität der FHT konnte im Enzymextrakt aus den Blütenblättern ebenfalls nicht nachgewiesen werden (Froemel et al., 1985). Der Ausfall der Aktivität der FHT durch die Mutation erstreckt sich also auf die gesamte Pflanze.

Die Blätter und Früchte der Pampelmuse weisen ein ähnliches Flavonoidmuster auf wie die Laubblätter der Petunienlinie W 39. Wie in den Laubblättern der Petunienlinie W 39 sind in den Blättern und Früchten der Pampelmuse Flavanone enthalten, allerdings Naringenin-Glykoside (Jourdan et al., 1985), während Flavonole dort nur in sehr geringer Menge vorliegen (McIntosh und Mansell, 1990). Allerdings wird das *Fht*-Gen bei der Pampelmuse in verschiedenen Geweben exprimiert, die Enzymaktivität wurde jedoch noch nicht untersucht (Pelt et al., 2003).

IV.7 Phytopathologische Untersuchungen bei Rosen mit Sternrußtau

Wie beim Apfel werden in den Laubblättern der Rose bei der Behandlung mit Prohexadion-Ca Luteoforol und Luteoliflavan gebildet. Behandelte Apfelbäume zeigen eine erhöhte Resistenz gegen den Befall von Feuerbrand (Yoder et al., 1999). Bei Luteoforol konnte eine antibakterielle Wirkung festgestellt werden (Ramesh et al., 2001), so daß die bei den mit Prohexadion-Ca behandelten Apfelbäumen beobachtete Resistenz der Bildung von Luteoforol in den Blättern zugeschrieben wird. Auch in den Laubblättern der Rose werden wie beim Apfel bei der Behandlung mit Prohexadion-Ca Luteoforol und Luteoliflavan gebildet. Eine gesteigerte Resistenz gegen Rosenpathogene wie *Diplocarpon rosae*, den Erreger des Sternrußtaus, ist also auch bei mit Prohexadion-Ca behandelten Rosen denkbar.

Bei Infektionsversuchen mit Sternrußtau wurde bei der Rosensorte „Pariser Charme“ ein deutlicher Rückgang der Anzahl der Inokulationsstellen mit Acervulibildung nach Behandlung der Laubblätter mit Prohexadion-Ca festgestellt. In diesen behandelten Blättern wurde Eriodictyol nachgewiesen, jedoch kein Luteoliflavan. Wurde die Sorte „Pariser Charme“ jedoch bei Temperaturen über 28 °C mit Prohexadion-Ca behandelt, so war neben Eriodictyol auch Luteoliflavan

in den behandelten Blättern enthalten. In diesem Fall zeigte sich bei der Inokulation mit Sternrußtaukonidien nur ein sehr schwacher Rückgang in der Anzahl der Inokulationsstellen mit Acervulibildung gegenüber unbehandelten Blättern. Bei der Sorte „Heckenzauber“ wird nach der Behandlung mit Prohexadion-Ca in den Laubblättern bei allen getesteten Temperaturen zwischen 20 °C und 40 °C Luteoliflavan gebildet. Bei Infektionsversuchen bei der Sorte „Heckenzauber“ konnte bei Behandlung der Laubblätter mit Prohexadion-Ca ebenfalls kein Rückgang in der Anzahl der Inokulationsstellen mit Acervulibildung nachgewiesen werden.

Bei Luteoforol konnte eine antibakterielle Wirkung nachgewiesen werden, nicht jedoch bei Luteoliflavan. Neben verschiedenen anderen Bakterien (Ramesh et al., 2001) wirkt Luteoforol auch bakteriozidisch gegen den bakteriellen Erreger des Feuerbrandes *Erwinia amylovora*, sowie fungizidisch gegen *Venturia inaequalis* (Bazzi et al., 2003), den Erreger des Apfelschorfes. Bei *Venturia inaequalis* handelt es sich wie bei *Diplocarpon rosae*, den Erreger des Sternrußtaus, um einen pilzlichen Erreger. Inzwischen konnte auch eine fungizide Wirkung von Luteoforol auf *Diplocarpon rosae* nachgewiesen werden (Stefanek, nicht veröffentlicht). Die antimikrobielle Wirkung von Luteoforol ist also nicht nur auf Bakterien beschränkt und ist somit auch die Ursache für die gesteigerte Resistenz der Rose gegen den Befall mit Sternrußtau bei Behandlung mit Prohexadion-Ca.

In Enzymtests mit Enzymextrakten aus Laubblättern der Rose wird Eriodictyol durch die FNR und die LAR zu Luteoliflavan umgesetzt, ohne daß Luteoforol als Zwischenstufe nachweisbar ist. Die LAR kann also Luteoforol mit hoher Rate zu Luteoliflavan umsetzen. Bei der Behandlung der Laubblätter mit Prohexadion-Ca wird das durch die Hemmung der FHT angereicherte Eriodictyol durch die FNR zu Luteoforol umgesetzt. Die LAR setzt das Luteoforol mit hoher Rate zu Luteoliflavan um. Daher kommt es im Blatt zu keiner Anreicherung von Luteoforol. Das stattdessen im Laubblatt enthaltene Luteoliflavan weist keine antimikrobielle Wirkung auf. Deshalb ist kein Rückgang der Inokulationsstellen mit Acervulibildung bei Anwesenheit von Luteoliflavan nach Behandlung mit Prohexadion-Ca zu beobachten. Wenn nach der Behandlung mit Prohexadion-Ca kein Luteoliflavan in den Laubblättern gebildet wird, ist ein deutlicher Rückgang der Anzahl der Inokulationsstellen mit Acervulibildung zu beobachten. In diesem Falle ist anzunehmen, daß die LAR Luteoforol nicht zu Luteoliflavan umsetzen kann, was zu einer Anreicherung von Luteoforol im Blattgewebe führt. Da die Bildung von Luteoliflavan nur bei der Sorte „Pariser Charme“ einer Temperaturabhängigkeit unterliegt, ist anzunehmen, daß deren LAR eine Temperaturabhängigkeit ihrer Substratspezifität aufweist.

Der Befall mit *Erwinia amylovora* nimmt bei Behandlung mit Prohexadion-Ca bei Apfelbäumen deutlich ab (Momol et al., 1999; Fernando und Jones, 1999), obwohl in den Apfelblättern nach der Behandlung Luteoliflavan gebildet wird (Römmelt et al., 1999). Bei der Rose ging der Befall mit Sternrußtau nur dann zurück, wenn kein Luteoliflavan entsteht. Allerdings weist die LAR in den Apfelblättern eine niedrigere Aktivität auf als in den Rosenlaubblättern. Im Enzymtest mit einem Enzymextrakt aus Apfelblättern wird Dihydroquercetin zu Catechin umgesetzt, wobei jedoch Leukocyanidin als Zwischenprodukt nachweisbar ist (Fischer, persönliche Mitteilung). Ebenso kann im Enzymextrakt aus Apfelblättern Eriodictyol zu Luteoliflavan umgesetzt werden, wobei Luteoforol als Zwischenprodukt auftritt. Bei entsprechenden Enzymtests mit Enzymextrakten aus Rosenlaubblättern kann weder Leukocyanidin, noch Luteoforol als Zwischenprodukt nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, daß sich in den mit Prohexadion-Ca behandelten Apfelblättern Luteoforol eher anreichern kann als in behandelten Rosenlaubblättern.

Da Luteoforol weder in den behandelten Apfellaubblättern noch in den behandelten Rosenlaubblättern nachweisbar ist, kann nicht mit letzter Sicherheit gesagt werden, daß in den Rosenlaubblättern, in welchen nach der Behandlung mit Prohexadion-Ca Luteoliflavan gebildet wird, kein Luteoforol angereichert wird. Jedoch ist davon auszugehen, daß der Luteoforolgehalt in den Rosenlaubblättern, in welchen nach der Behandlung mit Prohexadion-Ca kein Luteoliflavan gebildet wird, höher ist. Der Luteoforolgehalt in luteoliflavanhaltigen Rosenlaubblättern könnte für eine Steigerung der Resistenz gegen *Diplocarpon rosae* zu niedrig sein. In luteoliflavanhaltigen Apfellaubblättern müßte der Luteoforolgehalt auf Grund der niedrigeren Aktivität der LAR höher sein als in den luteoliflavanhaltigen Rosenlaubblättern. Auch wäre denkbar, daß die fungizide Wirkung von Luteoforol gegen *Diplocarpon rosae* erst bei einer höheren Konzentration eintritt als die antibakterielle Wirkung gegen *Erwinia amylovora*.

Bei den Infektionsversuchen mit Sternrußtau betrug die Anzahl an Inokulationsstellen mit Acervulibildung nach Behandlung der Rosenlaubblätter mit Prohexadion-Ca ohne Bildung von Luteoliflavan nur 30 % bis 40 % der Anzahl der Inokulationsstellen mit Acervulibildung auf Laubblättern ohne Behandlung. Etwas niedrigere Werte traten bei Apfelbäumen auf, die mit Prohexadion-Ca behandelt und mit dem Feuerbrand-Erreger *Erwinia amylovora* infiziert worden sind. Allerdings wurde hier der infizierte Längenanteil der Sprosse gemessen (Momol et al., 1999). In einer anderen Untersuchung wurde ein Rückgang der Anzahl der mit Feuerbrand infizierten Stellen an Apfelsprossen bei Behandlung mit Prohexadion-Ca um über die Hälfte gegenüber unbehandelten Sprossen beobachtet (Yoder et al., 1999). Der festgestellte Rückgang der Anzahl der Inokulationsstellen mit Acervulibildung bei behandelten Rosenlaubblättern auf 40 % der Anzahl bei un-

behandelten Laubblättern kommt dem in der Untersuchung von Yoder et al., 1999, ermittelten Wert also recht nahe. In einer weiteren Untersuchung wurde nachgewiesen, daß der Bakterienbesatz mit *Erwinia amylovora* auf behandelten Apfelblättern deutlich niedriger ist, als der auf unbehandelten Blättern (Fernando und Jones, 1999). Damit stimmt die Beobachtung überein, daß auf behandelten Rosenlaubblättern weniger Sternrußtauacervuli gebildet werden als auf unbehandelten.

IV.8 Die Transformation von Kartoffeln mit der *Dfr* des Apfels

In den vollständig ausgebildeten Blättern der Kartoffelpflanze ist keine Aktivität der DFR nachweisbar, und die in den jungen Blättern 11 Tage nach der Keimung aktive DFR der Kartoffel weist keine FNR-Aktivität auf. Weder in den jungen, noch in den vollständig ausgebildeten Blättern kann daher Luteoforol gebildet werden. Um die Möglichkeit zu schaffen, daß die Kartoffel nach einer Behandlung mit Prohexadion-Ca in den Blättern Luteoforol bilden kann, wurden Kartoffelpflanzen der Sorte „Walli“ mit dem *Dfr*-Gen des Apfels transformiert. Bei der DFR des Apfels wurde sowohl im Enzymextrakt aus Laubblättern, als auch bei heterologer Expression in Hefe neben der DFR- auch die FNR-Aktivität nachgewiesen (Fischer et al., 2003). Die Bildung von Luteoforol in den Kartoffelblättern bei der Behandlung mit Prohexadion-Ca könnte ähnlich wie bei Apfel und Rose eine Steigerung der Resistenz gegen verschiedene Kartoffelpathogene mit sich bringen.

In den vollständig ausgebildeten Blättern der transformierten Kartoffelpflanzen konnte die Expression des *Dfr*-Gens mit PCR aus cDNA aus diesem Gewebe nachgewiesen werden. Ebenso konnte im Enzymextrakt aus vollständig ausgebildeten Blättern der transformierten Kartoffelpflanzen sowohl die Aktivität der DFR, als auch die der FNR nachgewiesen werden. Dihydroquercetin wurde durch die DFR zu Leukocyanidin und Eriodictyol durch die FNR zu Luteoforol umgesetzt. Im Enzymextrakt aus Apfelblättern wurde durch die DFR neben Dihydroquercetin allerdings auch Dihydrokämpferol umgesetzt (Fischer et al., 2003). Die FNR setzte im Enzymextrakt aus den Apfelblättern wie auch im Enzymextrakt aus den vollständig ausgebildeten Blättern der transgenen Kartoffel nur Eriodictyol um, nicht jedoch Naringenin (Fischer et al., 2003). Im Enzymextrakt aus den Laubblättern der Rose wird Dihydroquercetin von der DFR und der LAR zu Catechin und Eriodictyol von der FNR und der LAR zu Luteoliflavan umgesetzt. Im Enzymextrakt aus den Laubblättern der transgenen Kartoffel liegt dagegen nur die Aktivität der DFR/FNR vor.

Eine Veränderung im Flavonoidmuster konnte in den vollständig ausgebildeten Blättern der transgenen Kartoffeln nicht nachgewiesen werden. Die transgenen Kartoffelpflanzen wurden im normalen Gewächshaus kultiviert, und demzufolge wurden, wie bei untransformierten Kartoffelpflanzen auch, kaum Flavonoide in den Laubblättern gebildet. Im Enzymextrakt aus den vollständig ausgebildeten Blättern transgener Pflanzen waren die Enzymaktivitäten von CHS, FHT, F3'H und FLS nur sehr schwach nachweisbar. Dies war auch im Enzymextrakt aus den vollständig ausgebildeten Blättern untransformierter, im Gewächshaus wachsender Kartoffeln bei der CHS und der FHT der Fall. Die Aktivität der DFR ist dagegen im Enzymextrakt aus den vollständig ausgebildeten Blättern transgener Kartoffelpflanzen eindeutig nachweisbar, weil das transformierte *Dfr*-Gen über einen CaMV 35 S-Promotor verfügt, welcher das Gen bei normalen physiologischen Bedingungen im Normalfall in jedem Gewebe aktiviert. Durch das Fehlen der Aktivitäten der anderen Enzyme der Flavonoidbiosynthese bekommt die DFR aber kein Substrat zur Verfügung gestellt.

IV.9 Ausblick

Bei der Rose konnte bei der Behandlung mit Prohexadion-Ca eine gesteigerte Resistenz gegen den Befall mit Sternrußtau festgestellt werden. Diese gesteigerte Resistenz ist auf die Bildung von Luteoforol in den mit Prohexadion-Ca behandelten Laubblättern zurückzuführen. Luteoforol wird von der FNR aus dem auf Grund der durch das Prohexadion-Ca verursachten Hemmung der FHT angereicherten Eriodictyol gebildet. Allerdings reichert sich Luteoforol nur dann in den Laubblättern an, wenn es von der LAR nicht zu Luteoliflavan umgesetzt wird. Es sollte also untersucht werden, unter welchen Bedingungen und bei welchen Rosensorten bei der Behandlung mit Prohexadion-Ca kein Luteoliflavan, sondern Luteoforol in den Laubblättern gebildet wird. Bei der Sorte „Pariser Charme“ fand die Bildung von Luteoliflavan nur bei Temperaturen oberhalb etwa 28 °C statt. Es sollte weiterhin untersucht werden, ob die Behandlung von Rosen mit Prohexadion-Ca auch eine gesteigerte Resistenz gegen weitere Rosenkrankheiten, wie zum Beispiel den Mehltau, verursachen kann. Durch die Transformation des Antisense *Fht*-Gens der Rose könnte die Aktivität der FHT ebenfalls unterbunden werden. In solchen transgenen Rosen würde sich in den Laubblättern auch ohne Behandlung mit Prohexadion-Ca Eriodictyol anreichern, welches von der FNR zu Luteoforol umgesetzt werden könnte. Die transgenen Rosen sollten

dann auch ohne Behandlung mit Prohexadion-Ca eine erhöhte Resistenz gegen Sternrußtau und möglicherweise auch andere Krankheiten zeigen.

Die Kartoffel bildet bei der Behandlung mit Prohexadion-Ca kein Luteoforol. In den vollständig ausgebildeten Kartoffelblättern ist keine Aktivität der DFR vorhanden. Die DFR der Kartoffel weist zudem keine FNR-Aktivität auf. Die Kartoffel wurde mit dem *Dfr*-Gen des Apfels transformiert, so daß in den vollständig ausgebildeten Blättern der transgenen Kartoffeln sowohl die Aktivität der DFR, als auch die Aktivität der FNR vorliegt. Da in den vollständig ausgebildeten Blättern der transgenen Kartoffelpflanzen, die im Gewächshaus kultiviert werden, die CHS keine Aktivität zeigt, steht der FNR kein Eriodictyol als Substrat zur Verfügung, so daß bei der Behandlung mit Prohexadion-Ca kein Luteoforol gebildet werden kann. Die transgenen Kartoffelpflanzen sollten daher bei Bedingungen kultiviert werden, unter denen die Enzyme der Flavonoidbiosynthese in den vollständig ausgebildeten Blättern Aktivität zeigen. Die transgenen Kartoffeln mit dem Apfel-*Dfr*-Gen könnten aber auch mit einem *Chs*-Gen transformiert werden, das mit einem CaMV 35 S-Promotor auch bei den Bedingungen im Gewächshaus exprimiert wird und somit CHS-Aktivität vorliegt. Damit wäre die Bildung von Luteoforol möglich und es könnte untersucht werden, ob bei der Kartoffel eine Resistenzsteigerung gegen Pathogene wie *Phytophthora infestans* oder *Erwinia carotovora* durch die Bildung von Luteoforol möglich ist.

Bei der Petunienlinie W 39 wird auch ohne Behandlung mit Prohexadion-Ca aufgrund fehlender Aktivität der FHT in den Laubblättern Eriodictyol angereichert. In den Laubblättern liegt keine FNR-Aktivität vor. Durch die Transformation von Petunien der Linie W 39 mit einem *Dfr*-Gen, dessen zugehöriges DFR-Enzym FNR-Aktivität aufweist, könnte in den Laubblättern Luteoforol gebildet werden. Für eine solche Transformation könnten zum Beispiel die *Dfr*-Gene von Apfel oder Rose verwendet werden.

V. Zusammenfassung

Apfelbäume, die mit dem Wachstumsregulator Prohexadion-Ca behandelt worden sind, zeigen eine erhöhte Resistenz gegen den Befall von Feuerbrand. Diese gesteigerte Resistenz wird dem bei der Behandlung mit Prohexadion-Ca im Apfelblatt neu gebildeten 3-Deoxyflavonoid Luteoforol zugeschrieben, bei dem antimikrobielle Wirkungen nachgewiesen werden konnten. Neben der Bildung von 3-Deoxyflavonoiden wurde im behandelten Apfelblatt auch ein Rückgang des Flavonol- und Anthocyangehaltes festgestellt. Die Behandlung mit Prohexadion-Ca bewirkt im Apfelblatt eine Hemmung des Enzyms FHT in der Flavonoidbiosynthese, wodurch diese Veränderungen im Flavonoidmuster verursacht werden.

Bei Rosen der Sorte „Pariser Charme“ konnten in den Laubblättern die Flavonoidaglyka Quercetin, Catechin, Cyanidin und Päonidin nachgewiesen werden. Die meisten der untersuchten Rosensorten zeigten in den Laubblättern ein sehr ähnliches Flavonoidmuster. Bei der Behandlung der Laubblätter der Sorte „Pariser Charme“ mit Prohexadion-Ca ging der Gehalt an Flavonolen und Anthocyanen deutlich zurück. Andererseits reicherte sich dort Eriodictyol an, und das 3-Deoxyflavonoid Luteoliflavan wurde gebildet.

Im Enzymextrakt aus den Laubblättern der Rosensorte „Pariser Charme“ konnten die Aktivitäten der Enzyme CHS, CHI, FHT, DFR, LAR und FNR nachgewiesen werden, nicht jedoch die Aktivitäten der Enzyme F3'H, FLS und ANS. CHS und CHI setzten zusammen 4-Cumaroyl-CoA oder Kaffeoil-CoA zu Naringenin oder Eriodictyol um. Die FHT setzte Naringenin oder Eriodictyol zu Dihydrokämpferol oder Dihydroquercetin um. Durch die Zugabe von Prohexadion-Ca in den Enzymtestansatz konnte der Umsatz der FHT vollständig gehemmt werden. Von der DFR wurde zusammen mit der LAR Dihydroquercetin zu Catechin umgesetzt. Eriodictyol wurde von der FNR zusammen mit der LAR zu Luteoliflavan umgesetzt.

In jungen Blütenblättern der Rosensorte „Pariser Charme“ waren die Flavonoidaglyka Kämpferol, Quercetin, Cyanidin, Päonidin und Pelargonidin enthalten, in älteren Blütenblättern auch Catechin. Bei der Behandlung mit Prohexadion-Ca ging der Gehalt an Flavonolen und Anthocyanen in den Blütenblättern deutlich zurück und es wurde Eriodictyol angereichert.

Im Enzymextrakt aus den Blütenblättern konnten bei den Enzymen die gleichen Aktivitäten und Substratspezifitäten nachgewiesen werden wie im Enzymextrakt aus den Laubblättern. Der einzige Unterschied war, daß im Enzymextrakt aus den Blütenblättern die DFR auch Dihydrokämpferol zu Leukopelargonidin umsetzen konnte.

Bei Inokulationsversuchen mit Sternrußtau zeigte sich bei Laubblättern der Sorte „Pariser Charme“, die mit Prohexadion-Ca behandelt worden waren, nur auf 40 % der Inokulationsstellen eine Bildung von Acervuli im Vergleich mit unbehandelten Blättern. Dieser Rückgang in der Acervulibildung war jedoch nur zu beobachten, wenn in den behandelten Blättern Luteoforol und kein Luteoliflavan gebildet wurde. Die Bildung von Luteoliflavan bei Behandlung mit Prohexadion-Ca fand bei der Sorte „Pariser Charme“ nur bei Temperaturen oberhalb von etwa 28 °C statt.

Bei der Kartoffelsorte „Walli“ konnten in den jungen Blättern 11 Tage nach der Keimung die Flavonoidaglyka Kämpferol, Quercetin und Päonidin nachgewiesen werden. Vollständig ausgebildete Blätter enthielten nur noch Quercetin. Andere Kartoffelsorten wiesen in den jungen wie vollständig ausgebildeten Blättern ein sehr ähnliches Flavonoidmuster auf. Kartoffelpflanzen, die im Gewächshaus kultiviert wurden, enthielten in den vollständig ausgebildeten Blättern nur sehr wenig Quercetin. Bei der Behandlung mit Prohexadion-Ca ging in den jungen Blättern der Gehalt an Flavonolen und Anthocyanen deutlich zurück, bei vollständig ausgebildeten Blättern war kein Rückgang im Flavonolgehalt nachzuweisen.

Im Enzymextrakt aus den jungen Blättern konnten die Aktivitäten der Enzyme CHS, CHI, FHT, F3'H, FLS und DFR nachgewiesen werden, nicht jedoch die Aktivitäten der Enzyme FNR, LAR und ANS. CHS und CHI setzten zusammen 4-Cumaroyl-CoA oder Kaffeoil-CoA zu Naringenin oder Eriodictyol um. Die FHT setzte Naringenin oder Eriodictyol zu Dihydrokämpferol oder Dihydroquercetin um. Durch die Zugabe von Prohexadion-Ca in den Enzymtestansatz konnte der Umsatz der FHT vollständig gehemmt werden. Die F3'H setzte Naringenin zu Eriodictyol und Dihydrokämpferol zu Dihydroquercetin um. Von der FLS wurden Dihydrokämpferol oder Dihydroquercetin zu Kämpferol oder Quercetin umgesetzt. Die DFR setzte Dihydroquercetin zu Leukocyanidin um. Im Enzymextrakt aus den vollständig ausgebildeten Blättern konnten die gleichen Enzymaktivitäten und Substratspezifitäten nachgewiesen werden wie im Enzymextrakt aus den jungen Blättern, jedoch war die Aktivität der DFR im Enzymextrakt aus den vollständig ausgebildeten Blättern nicht nachweisbar.

Kartoffelpflanzen der Sorte „Walli“ wurden mit dem *Dfr*-Gen des Apfels transformiert. Im Enzymextrakt aus den vollständig ausgebildeten Blättern der transgenen Pflanzen konnten die Aktivitäten von DFR und FNR nachgewiesen werden. Dabei wurde von der DFR Dihydroquercetin zu Leukocyanidin und von der FNR Eriodictyol zu Luteoforol umgesetzt.

In den Laubblättern der Petunienlinien RL01 und V 33 wurden die Flavonoidaglyka Kämpferol und Quercetin nachgewiesen, während die Laubblätter der Petunienlinie W 39 Eriodictyol ent-

hielten. Bei der Behandlung mit Prohexadion-Ca ging in den Laubblättern der Linien RL01 und V 33 der Flavonolgehalt deutlich zurück und es reicherten sich Naringenin und Eriodictyol an.

Im Enzymextrakt aus den Laubblättern der Petunienlinien RL01 und V 33 konnten die Aktivitäten der Enzyme CHS, CHI, FHT und FLS nachgewiesen werden, nicht jedoch die Aktivitäten der Enzyme F3'H und DFR. Im Enzymextrakt aus den Laubblättern der Linie W 39 waren lediglich die Aktivitäten der CHS und der CHI vorhanden. CHS und CHI setzten zusammen 4-Cumaroyl-CoA oder Kaffeoyl-CoA zu Naringenin oder Eriodictyol um. Die FHT setzte Naringenin oder Eriodictyol zu Dihydrokämpferol oder Dihydroquercetin um. Durch die Zugabe von Prohexadion-Ca in den Enzymtestansatz konnte der Umsatz der FHT vollständig gehemmt werden. Von der FLS wurden Dihydrokämpferol oder Dihydroquercetin zu Kämpferol oder Quercetin umgesetzt.

VI. Summary

Appletrees pretreated with prohexadione-Ca show an enhanced resistance against fireblight. This enhanced resistance is accredited to the 3-deoxyflavonoid Luteoforol, which is synthesized in the apple leaf when treated with prohexadione-Ca. Luteoforol shows an antibacterial effect. When the appletree is treated with prohexadione-Ca not only 3-Deoxyflavonoids are synthesized in the leaf. There is also a reduction of the content of flavonols and anthocyanins. The treatment with prohexadione-Ca effects an inhibition of the enzyme FHT from the flavonoid biosynthesis, which causes the changes in the flavonoid pattern.

In the leaves of the rose cultivar "Pariser Charme" the flavonoid aglycones Quercetin, Catechin, Cyanidin and Päonidin were found. Most of the analysed rose cultivars showd the same flavonoid pattern in their leaves. On treatment with Prohexadione-Ca the content of flavonoles and anthocyanins was significantly reduced. On the other hand Eriodictyol and the 3-deoxyflavonoid Luteoliflavan were formed.

In an enzyme extract from the leaves of the rose cultivar "Pariser Charme" the activities of the enzymes CHS, CHI, FHT, DFR, LAR and FNR could be found, but not the activities of the enzymes F3'H, FLS and ANS. CHS and CHI transferred together 4-Coumaroyl-CoA or Caffeoyle-CoA to Naringenin or Eriodictyol. The FHT transferred Naringenin or Eriodictyol to Dihydrokaempferol or Dihydroquercetin. By addition of Prohexadione-Ca to the enzyme assay the activity of the FHT was inhibited. The DFR transferred together with the LAR Dihydroquercetin to Catechin. Eriodictyol was transferred to Luteoliflavan by the FNR and the LAR together.

In young flowers of the rose cultivar "Pariser Charme" the flavonoid aglycones Kaempferol, Quercetin, Cyanidin, Päonidin and Pelargonidin were contented, in older flowers even Catechin. On treatment with Prohexadione-Ca the content of Flavonoles and anthocyanins in the flowers was reduced significantly and Eriodictyol was formed.

In an enzyme extract from the flowers the same activities and substrate specificities of the enzymes were found like in the enzyme extract from the leaves. The only difference was, that in the enzyme extract from the flowers the DFR could transfere Dihydrokaempferol to Leucopelargonidin.

In inoculation experiments with Black Spot acervuli appeared only at 40 % of the inoculation-points on leaves pretreated with Prohexadione-Ca in comparison to untreated leaves. This

VI. Summary

reduction was only observed, if Luteoforol was formed in the leaves instead of Luteoliflavan. In the rose cultivar “Pariser Charme” Luteoliflavan only was formed by temperatures over 28 °C.

In the young leaves 11 days after germination of the potato cultivar “Walli” the flavonoid aglycones Kaempferol, Quercetin and Päonidin were found. Full developed leaves only contained Quercetin. Other analysed potato cultivars showed a very similar flavonoid pattern in the young and full developed leaves. Potato plants grown in the greenhouse had a very low content of Quercetin in their full developed leaves. On treatment with Prohexadione-Ca the content of Flavonoles and anthocyanins in the young was reduced significantly. In the full developed leaves the treatment with Prohexadione-Ca showed no effect to the Flavonole-content.

In an enzyme extract from the young potato leaves the activities of the enzymes CHS, CHI, FHT, F3'H, FLS and DFR could be found, but not the activities of the enzymes FNR, LAR and ANS. CHS and CHI transferred together 4-Coumaroyl-CoA or Caffeoyl-CoA to Naringenin or Eriodictyol. The FHT transferred Naringenin or Eriodictyol to Dihydrokaempferol or Dihydroquercetin. By addition of Prohexadione-Ca to the enzyme assay the activity of the FHT was inhibited. The F3'H transferred Naringenin to Eriodictyol or Dihydrokaempferol to Dihydroquercetin. From the FLS Dihydrokaempferol or Dihydroquercetin were transferred to Kaempferol or Quercetin. The DFR transferred Dihydroquercetin to Leucocyanidin. In the enzyme extract from full developed leaves the same activities and substrate specificities were found like in the enzyme extract from young leaves, but there was no activity of the DFR.

Potatoes from the cultivar “Walli” were transformed with the *Dfr*-Gene from apple. In the enzyme extract from full developed leaves from transgenic plants the activities of the DFR and of the FNR were found. The DFR transferred Dihydroquercetin to Leucocyanidin and the FNR transferred Eriodictyol to Luteoforol.

In the leaves of the petunia lines RL01 and V 33 the Flavonoid aglycones Kaempferol and Quercetin were found, while the leaves of the line W 39 contained Eriodictyol. On treatment with Prohexadione-Ca the content of Flavonoles in the leaves of the lines RL01 and V 33 decreased significantly and Naringenin and Eriodictyol were formed.

In an enzyme extract from the leaves of the lines RL01 and V 33 the activities of the enzymes CHS, CHI, FHT and FLS could be found, but not the activities of the enzymes F3'H and DFR. In the enzyme extract from the leaves of the line W 39 only the activity of CHS and CHI were found. CHS and CHI transferred together 4-Coumaroyl-CoA or Caffeoyl-CoA to Naringenin or Eriodictyol. The FHT transferred Naringenin or Eriodictyol to Dihydrokaempferol or Dihydroquercetin. By addition of Prohexadione-Ca to the enzyme assay the activity of the FHT

VI. Summary

was inhibited. From the FLS Dihydrokaempferol or Dihydroquercetin were transferred to Kaempferol or Quercetin.

VII. Literaturverzeichnis

Bazzi C., Messina C., Tortoreto L., Stefani E., Bini F., Brunelli A., Andreotti C., Sabatini E., Spinelli F., Costa G., Hauptmann S., Stammler G., Dörr S., Marr J., Rademacher W., 2003 : Control of pathogen incidence in pome fruits and other horticultural crop plants with prohexadione-Ca; *Europ. J. Hort. Sci.* 68 (3) : 108-114

Beld M., Martin C., Huits H., Stuitje A. R., Gerats A. G. M., 1989 : Flavonoid synthesis in *Petunia hybrida* : partial characterization of dihydroflavonol 4-reductase; *Plant. Mol. Biol.* 13 : 491-502

Betz, G, 2002 : Gentechnische Modifikation der Flavonoid-Biosynthese bei *Solanum tuberosum* zur Steigerung der Resistenz gegen pilzliche und bakterielle Infektionen; Diplomarbeit, Lehrstuhl für Zierpflanzenbau der Technischen Universität München

Bloor S. J., Bradley J. M., Lewist D. H., Davies K. M., 1998 : Identification of flavonol and anthocyanin metabolites in leaves of *Petunia* "Mitchell" and its *Lc* transgenic; *Phytochemistry* 49 (5) : 1427-1430

Bogenrieder A., Klein R., 1978 : Die Abhängigkeit der UV-Empfindlichkeit von der Lichtqualität bei der Aufzucht (*Lactuca sativa*); *Angew. Bot.* 52 : 283-293

Bohm B., 1998 : Introduction to flavonoids; in : *Chemistry and biochemistry of organic natural products*; Harward Academic Publishers

Böhm H., Boeing H., Hempel J., Raab B., Kroke A., 1998 : Flavonols, flavones and anthocyanins as native antioxidants of food and their possible role in the prevention of chronic diseases; *Zeitschrift für Ernährungswissenschaften* 37 : 147-163

Boss P. K., Davies C., Robinson S. P., 1996 : Expression of anthocyanin biosynthesis pathway genes in red and white grapes; *Plant Mol. Biol.* 32 : 565-569

Bowen K. L., 2001 : Improved control of blackspot disease on roses with winter fungicide treatments; *SNA Research Conference* 46 : 276-279

Bradford M. M., 1976 : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding; *Anal. Biochem.* 72 : 248-254

Britsch L., Grisebach H., 1985 : Improved preparation and assay of chalcone synthase; *Phytochemistry* 24 : 1975-1976

Britsch L., Grisebach H., 1986 : Purification and characterization of (2S)-flavanone 3-hydroxylase from *Petunia hybrida*; *Eur. J. Biochem.* 156 : 569-577

Britsch L., Heller, W., Grisebach H., 1981 : Conversion of Flavanone to Flavone, Dihydroflavonol and flavonol with an enzyme system from cell cultures of parsley; *Z. Naturforsch.* 36c : 742-750

Britsch L., Ruhnau-Brich B., Forkmann G., 1992 : Molecular cloning, sequence analysis, and in vitro expression of flavanone 3 β -hydroxylase from *Petunia hybrida*; J. Biol. Chem. 267 (8) : 5380-5387

Brugliera F., Barri-Rewell G., Holton T. A., Mason J. G., 1999 : Isolation and characterization of a flavonoid 3'-hydroxylase cDNA clone corresponding to the *Ht1* locus of *Petunia hybrida*; The Plant Journal 19 (4) : 441-451

Byers R. E., Yoder K. S., Smith A. H., 1997 : The effect of BAS-125W on apple tree growth, fruit quality and fire blight suppression; Hortscience 32 (3) : 557

Carlsson-Nilsson B. U., Davidson C. G., 2000 : Research on blackspot pathogen *Diplocarpon rosae* (*Marssonina rosae*) and resistance in *Rosa*; Acta Hort. 508 : 141-148

Cheers G., 1999 : Rosen-Enzyklopädie; Könemann Verlagsgesellschaft mbH, Köln

Claudot A. C., Drouet A., 1992 : Preparation and assay of chalcone synthase from walnut tree tissue; Phytochemistry 31; 3377-3380

Cornu A., Paynot M., Touvin H., 1974 : Pelargonidin in the flowers of a mutant of *Petunia hybrida*; Phytochemistry 13 : 2022

Dedio J., 1993 : Molekulare Charakterisierung pflanzlicher Flavanon-3 β -Hydroxylase-Gene und strukturelle Klassifizierung 2-Oxoglutarat-abhängiger und verwandter Dioxygenasen; Doktorarbeit, Universität Köln

Dellus V., Heller W., Sandermann H., Scalber A., 1997 : Dihydroflavonol 4-reductase activity in lignocellulosic tissues; Phytochem. 45 : 1415-1418

van Eldik G. J., Reijnen W. H., Ruiter R. K., van Herpen M. M. A., Schrauwen J. A. M., Wullems G. J., 1997 : Regulation of flavonol biosynthesis during anther and pistil development, and during pollen tube growth in *Solanum tuberosum*; Plant J. 11 (1) : 105-113

Elshef T., 2000 : Genetik und Enzymologie der Bildung außergewöhnlicher Anthocyanidin-Muster in Blüten höherer Pflanzen; Doktorarbeit, Lehrstuhl für Zierpflanzenbau der Technischen Universität München

Evans J. R., Evans R. R., Regusci C. L., Rademacher W., 1999 : Mode of action, metabolism and uptake of BAS 125 W, prohexadione-Ca; Hort. Science 34 (7) : 1200-1201

Fernando W. G. D., Jones A. L., 1999 : Prohexadione-Ca - a tool for reducing secondary fire blight infection; Acta Horticulturae 489 : 597-600

Feucht W., Treutter D., Christ E., 1996 : Shot hole disease in sour cherry: defensive flavanol barriers; J. Plant. Dis. Prot. 103 : 279-287

Fischer D., Stich K., Britsch K., Grisebach H., 1988 : Purification and characterization of (+)dihydroflavonol (3-hydroxyflavanone) 4-reductase from flowers of *Dahlia variabilis*; Arch. Biochem. Biophys. 264 : 40

- Fischer T. C., Halbwirth, H., Meisel B., Stich K., Forkmann G., 2003** : Molecular cloning, substrate specificity of the functionally expressed dihydroflavonol 4-reductase from *Malus domestica* and *Pyrus communis* cultivars and the consequences for flavonoid metabolism; Arch. Biochem. Biophys. 412 : 223-230
- Forkmann G., Ruhnau B., 1987** : Distinct substrate specificity of dihydroflavonol 4-reductase from flowers of *Petunia hybrida*; Z. Naturforsch. 42c : 1146-1148
- Forkmann G., 1991** : Flavonoids as flower pigments : the formation of the natural spectrum and its extension by genetic engineering; Plant Breed. 106 : 1-26
- Forkmann G., Heller W., 1999** : Biosynthesis of flavonoids; in : Comprehensive natural products chemistry, Vol. 1; Elsevier, Amsterdam : 713-748
- Froemel S., de Vlaming P., Stotz G., Wiering H., Forkmann G., Schram A. W., 1985** : Genetic and biochemical studies on the conversion of flavanones to dihydroflavonols in flowers of *Petunia hybrida*; Theor. Appl. Genet. 70 : 561-568
- Goldsbrough A., Belzile F., Yoder J. I., 1994** : Complementation of the tomato *anthocyanin without* (*aw*) mutant using the dihydroflavonol 4-reductase gene; Plant Physiol. 105 : 491-496
- Gosch, C., 2003** : Dihydroflavonol 4-reductases from various crop plants : Molecular cloning, heterologous expression, and consequences of the substrate specificity for induced disease resistance; Diplomarbeit, Lehrstuhl für Zierpflanzenbau der Technischen Universität München
- Gräbe J. E., 1987** : Gibberellin biosynthesis and control; Annu. Rev. Plant. Physiol. 38 : 419-465
- Griggs D. L., Hedden P., Temple-Smith K. E., Rademacher W., 1991** : Inhibition of Gibberellin 2 β -Hydroxylases by acylcyclohexanedione derivatives; Phytochemistry 30 (8) : 2513-2517
- Hahlbrock K., Scheel, D., 1989** : Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism; Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol. 40 : 347-369
- Harborne J. B., Grayer R. J., 1994** : Flavonoids and Insects; in : The Flavonoids - Advances in research since 1986; Chapman & Hall, London : 589-618
- Harborne, J. B., Williams C. A., 2000** : Advances in flavonoid research since 1992; Phytochem 55 : 481-504
- Helariutta Y., Elomaa P., Kotilainen M., Seppänen P., Teeri T. H., 1993** : Cloning of cDNA coding for dihydroflavonol-4-reductase (DFR) and characterization of *dfr*-expression in the corollas of *Gerbera hybrida* var. Regina (Compositae); Plant Mol. Biol. 22 : 183-193
- Höger-Orthner I., 1994** : Vom Zauber alter Rosen; BLV-Verlag, München
- Hradzina G., 1982** : Anthocyanins; in : The flavonoids - advances in research; Chapman & Hall, London : 135-188

Hradzina G., 1992 : Compartmentation in aromatic metabolism; in : Recent advances in phytochemistry; Stafford H. A. Ibrahim R. K.; Vol. 26 Plenum Press, New York : 1-23

Jeon J. H., Joung H., Byun S. M., 1996 : Characterization of two members of the *chalcone synthase* Gene family from *Solanum tuberosum*; Plant Physiol. 111 : 348

Johnson E. T., Yi H., Shin B., Oh B. J., Cheong H., Choi G., 1999 : *Cymbidium hybrida* dihydroflavonol 4-reductase does not efficiently reduce dihydrokaempferol to produce orange pelargonidin-type anthocyanins; The Plant Journal 19 (1) : 81-85

Johnson E. T., Ryu S., Yi H., Shin B., Cheong H., Choi G., 2001 : Alteration of a single amino acid changes the substrate specificity of dihydroflavonol 4-reductase; The Plant Journal 25 (3) : 325-333

Jourdan P. S., McIntosh C. A., Mansell R. L., 1985 : Naringin levels in Citrus tissues; Plant Physiol. 77 : 903-908

Knekt P., Jarvinen R., Reunanen A., Maatela J., 1996 : Flavonoid intake and coronary mortality in Finland : a cohort study; BMJ 312 : 478-481

Knekt P., Jarvinen R., Seppanen R., Hellovaara M., Teppo L., Pukkala E., Aromaa A., 1997 : Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms; Amer. J. Epidemiol. 146 (3) : 223-230

Kootstra A., 1994 : Protection from UV-B-induced DNA damage by flavonoids; Plant Mol. Biol 26 : 771-774

van der Krol A. R., Mur L. A., Beld M., Mol J. N. M., Stuitje A. R., 1990 : Flavonoid genes in Petunia : Addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression; The Plant Cell 2 : 291-299

Kubasek W. L., Shirley B. W., McKillop A., Goodman H. M., Briggs W., 1992 : Regulation of flavonoid biosynthetic genes in germinating Arabidopsis seedlings; The Plant Cell 4 : 1229-1236

Li J., Ou-Lee T. M., Raba R., Amundson R. G., Last R. L., 1993 : Arabidopsis flavonoid mutants are hypersensitive to UV-B irradiation; The Plant Cell 5 : 171-179

Liesveld J. L., Abboud C. N., Lu C., McNair C., Menon A., Smith A., Rosell K., Rapoport A. P., 2003 : Flavonoid effects on normal and leukemic cells; Leuk. Research 27 (6) : 471-473

Martens S., 2000 : Genetische, biochemische und molekularbiologische Untersuchungen der Flavonbiosynthese bei *Gerbera* Hybriden; Doktorarbeit, Lehrstuhl für Zierpflanzenbau der Technischen Universität München

Mayr U., Treutter D., Santos-Buelga C., Bauer H., Feucht W., 1995 : Developmental changes in the phenol concentrations of "Golden Delicious" apple fruits and leaves; Phytochemistry 38 : 1151-1155

Mayr U., Michalek S., Treutter D., Feucht W., 1997 : Phenolic compounds of apple and their relationship to scab resistance; J. Phytopathology 145 : 69-75

McIntosh C. A., Mansell R. L., 1990 : Biosynthesis of naringin in *Citrus paradisi* : UDP-Glucosyl-transferase activity in grapefruit seedlings; Phytochemistry 29 : 1533-1538

van der Meer I., Spelt C. E., Mol J. N. M., Stuitje A. R., 1990 : Promoter analysis of the chalcone synthase (*chsA*) gene of *Petunia hybrida*: a 67 bp promoter region directs flower-specific expression; Plant Mol. Biol. 15 : 95-109

Meyer P., Heidmann I., Forkmann G., Sädler H., 1987 : A new *Petunia* flower colour generated by the transformation of a mutant with a maize gene; Nature 330 : 677-678

Mikanagi Y., Saito N., Yokoi M., Tatsuzawa F., 2000 : Anthocyanins in flowers of genus *Rosa*, sections *Cinnamomeae* (= *Rosa*), *Chinenses*, *Gallicanae*, and some modern garden roses; Biochemical Systematics and Ecology 28 : 887-902

Min B. W., 1994 : Klonierung flavonoidspezifischer Gene aus cDNA-Bibliotheken verschiedener Blütenpflanzen und die Charakterisierung ihrer Expression in einem genetisch definierten Pflanzenmaterial; Doktorarbeit, Lehrstuhl für Zierpflanzenbau der Technischen Universität München

Mohr H., Drumm-Herrel H., 1981 : Interaction between blue/UV light and light operating through phytochrome in higher plants; in : Smith, H : Plants and the Daylight Spectrum, Academic Press London : 423-441

Mohr H., Drumm-Herrel H., 1983 : Coaction between phytochrome and blue/UV light in anthocyanin synthesis in seedlings; Physiol. Plant. 58 : 408-414

Momol M. T., Ugine J. D., Norelli J. L., Aldwinckle H. S., 1999 : The effect of prohexadione calcium, SAR inducers and calcium on the control of shoot blight caused by *Erwinia amylovora* on apple; Acta Horticulturae 489 : 601-605

Montesinos M. C., Ubeda A., Terencio M. C., Paya M., Alcaraz M. J., 1995 : Antioxidant profile of mono- and dihydroxylated flavone derivatives in free radical generating systems; Z. Naturforsch. 50c : 552-560

Moyano E., Portero-Robles I., Medina-Escobar N., Valpuesta V., Munoz-Blanco J., Caballero J. L., 1998 : A fruit specific putative dihydroflavonol 4-reductase gene is differentially expressed in strawberry during the ripening process; Plant Physiology 117; 711-716

Pelt J. L., Downes W. A., Schoborg R. V., McIntosh C. A., 2003 : Flavanone 3-hydroxylase expression in *Citrus paradisi* and *Petunia hybrida* seedlings; Phytochemistry 64 : 435-444

Peters N. K., Frost J. W., Long S. R., 1986 : A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes; Science 23 : 977-980

Phillips R., Rix M., 1988 : Rosen; Droemersche Verlagsanstalt Th. Knaur Nachf., München

Rademacher W., 1991 : Biochemical effects of plant growth retardants; in : Plant Biochemical Regulators, Gausman H. W.; Marcel Dekker, Inc. New York, USA

Rademacher W., Temple-Smith K. E., Griggs D. L., Hedden P., 1992 : The mode of action of acclcylohexanediones - A new type of growth regulant; Progress in plant growth regulation, Kluwer Academic, Dordrecht Niederlande : 571-577

Rademacher W., 1993 : On the mode of acylcyclohexanediones - a new type of plant growth retardant with possible relationships to daminozide; Acta Horticulturae 329 : 31-34

Rademacher W., 2000 : Prohexadione-Ca - a new plant growth regulator for pome fruits with interesting biochemical features; Polyphenols Communicationes 2000, 11.-15. September 2000 in Freising-Weihenstephan : 617-618

Ramesh N., Viswanathan M. B., Saraswathy A., Brindha P., Balakrishna K., Lakshmanaperumalsamy P., 2001 : Antibacterial activity of luteoforol from *Bridelia crenulata*; Fitotherapia 72 : 409-411

Rauha J. P., Remes S., Heinonen M., Hopia A., Kähkönen M., Kujala T., Pihlaja K., Vuorela H., Vuorela P., 2000 : Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds; Int. J. Food Microbiol. 56 : 3-12

Robberecht R., Caldwell M. M., 1978 : Leaf epidermal transmittance of ultraviolet radiation and its implication for plant sensitivity to ultraviolet-radiation induced injury; Oecologia 32 : 277-287

Römmelt S., Treutter D., Speakman J. B., Rademacher W., 1999 : Effects of prohexadione-Ca on the flavonoid metabolism of apple with respect to plant resistance against fire blight; Acta Horticulturae 489 : 359-363

Römmelt S., Fischer T. C., Halbwirth H., Peterek S., Schlangen K., Speakman J. B., Treutter D., Forkmann G., Stich K., 2003 : Effect of dioxygenase inhibitors on the resistance-related flavonoid metabolism of apple and pears: chemical, biochemical and molecular biological aspects; Europ. J. Hort. Sci. 68 (3) : 129-136

Roshchina V. V., Roshchina V. D., 1993 : Excretory function of higher plants; Springer Verlag, Berlin

Ryan K. G., Swinny E. E., Markham K. R., Winefield C., 2002 : Flavonoid gene expression in transgenic and mutant *Petunia* leaves; Phytochemistry 59 : 23-32

Schlangen K., Gosch C., Römmelt S., Knott J., Fischer T. C., Treutter D., Forkmann G., Stich K., Halbwirth H., 2003 : Can prohexadione-Ca induce antimicrobial flavonoids in rose ?; Eurpo. J. Hort. Sci. 68 (3) : 137-143

Schnitzler J. P., Jungblut T. P., Heller W., Köfferlein M., Hutzler P., Heinzmann U., Schmelzer E., Ernst D., Langebartels C., Sandermann H., 1996 : Tissue localization of UV-B-screening pigments and of chalcone synthase mRNA in needles of Scots pine seedlings; New Phyl. 132 : 247-258

Stafford H. A., 1991 : Flavonoid evolution : An enzymic approach; *Plant Physiol.* 96 : 680-685

Staiger D., Kaulen H., Schell J., 1989 : A CACGTG motif of the *Antirrhinum majus* chalcone synthase promoter is recognized by an evolutionarily conserved nuclear protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 : 6930-6934

Stich K., Forkmann G., 1988 : Biosynthesis of 3-Deoxyanthocyanins with flower extractes from *Sinningia cardinalis*; *Phytochemistry* 27 : 785-789

Stich K., Forkmann, G., 1988 : Studies on Columnidin biosynthesis with flower extractes from *Columnnea hybrida*; *Z. Naturforsch* 43c : 311-314

Stich K., Eidenberger T., Wurst F., Forkmann G., 1992 : Enzymatic conversion of dihydroflavonols to flavan-3,4-diols using flower extrxyctes of *Dianthus caryophyllus* (carnation); *Planta* 187 : 103-108

Stobiecki M., Matysiak-Kata I., Franski R., Skala J., Szopa J., 2003 : Monitoring changes in anthocyanin and steroid alkaloid glycoside content in lines of transgenic potato plants using liquid chromatography/mass spectrometry; *Phytochemistry* 62 : 959-969

Stotz G., Forkmann, G., 1981 : Oxidation of Flavanones to Flavones with flower extractes of *Antirrhinum majus* (Snapdragon); *Z. Naturforsch.* 36c : 737-741

Stotz G., de Vlaming P., Wiering H., Schram A. W., Forkmann G., 1985 : Genetic and biochemical studies on flavonoid 3'-hydroxylation in flowers of *Petunia hybrida*; *Theor. Appl. Genet.* 70 : 300-305

Suzuki K. I., Tsuda S., Fukui Y., Fukuchi-Mizutani M., Yonekura-Sakakibara K., Tanaka Y., Kusumi T., 2000 : Molecular characterization of rose flavonoid biosynthesis genes and their application in petunia; *Biotech. & Biotech. Eq.* 14 (2) : 56-62

Taiz L., Zeiger E., 2000 : *Physiologie der Pflanzen*; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

Tanaka Y., Fukui Y., Fukuchi-Mizutani M., Holton T. A., Higgins E., Kusumi T., 1995 : Molecular cloning and characterization of *Rosa hybrida dihydroflavonol 4-reductase* gene; *Plant Cell Physiol.* 36 (6) : 1023-1031

Taylor L. P., Jorgensen R., 1992 : Conditional male fertility in chalcone synthase deficient *Petunia*; *Journal of Heredity* 83 : 11-17

Tevini M., Iwanzik W., Thoma U., 1981 : Some effects of enhanced UV-B irradiation on the growth and composition of plants; *Planta* 153 : 388-394

Tevini M., Braun J., Fieser G., 1991 : The protective function of the epidermal layer of rye seedlings against ultraviolet-B radiation; *Photochem. Photobiol.* 53 : 329-333

Thompson W. R., Meinwald J., Aneshansley D., Eisner T., 1972 : Flavonols : pigments responsible for ultraviolet absorption in nectar guide of flower; *Science* 177 : 528-530

VII. Literaturverzeichnis

Treutter D., Feucht W., 1990 : The pattern of flavan 3-ols in relation to scab-resistance of apple cultivars; *J. Hort. Science* 65 (5) : 511-517

Treutter D., 2001 : Biosynthesis of phenolic compounds and its regulation in apple; *Plant Growth Regulation* 34 : 71-89

Walker S., Mandegaran Z., Roberts A. M., 1996 : Screening roses for resistance to *Diplocarpon rosae*; *Acta Hort.* 424 : 195-201

Wellmann E., 1975 : UV dose-dependent induction of enzymes related to flavonoid biosynthesis in cell suspension cultures of parsley; *FEBS Lett.* 51 : 105-107

Winkel-Shirley B., 1999 : Evidence for enzyme complexes in the phenylpropanoid and flavonoid pathways; *Physiologia Plantarum* 107 : 142-149

Winkel-Shirley B., 2001 : Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology; *Plant Physiol.* 126 : 486-493

Xie D., Sharma S. B., Paiva N. L., Ferreira D., Dixon R. A., 2003 : Role of anthocyanidin reductase, encoded by *BANYULS* in plant flavonoid biosynthesis; *Science* 299 : 396-399

Yoder K. S., Miller S. S., Byers R. E., 1999 : Suppression of fireblight in apple shoots by prohexadione-calcium following experimental and natural inoculation; *Hort. Science* 34 (7) : 1202-1204

VIII. Abkürzungen

ANR	Anthocyanidinreduktase
ANS	Anthocyanidinsynthase
Ap	Apfel (bei Genen oder Enzymen)
AS	Antisense
bp	Basenpaare
C4H	Zimtsäure 4-Hydroxylase
Cat	Catechin
CHI	Chalkonisomerase
CHS	Chalkonsynthase
CTAB	N-Cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid
Cum3H	4-Cumarsäure 3-Hydroxylase
CumCoA3H	4-Cumaroyl-CoA 3-Hydroxylase
Cy	Cyanidin
d	Dalton
DFR	Dihydroflavonol 4-Reduktase
DHK	Dihydrokämpferol
DHM	Dihydromyricetin
DHQ	Dihydroquercetin
DMAZA	4-Dimethylaminozimtaldehyd
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dp	Delphinidin
dpm	decays per minute / Zerfälle je Minute
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Eri	Eriodictyol
F3'H	Flavonoid 3'-Hydroxylase
F3'5'H	Flavonoid 3'5'-Hydroxylase
FGT	UDP-Glukose : Flavonoid 3-O-Glucosyltransferase
FHT	Flavanon 3 β -Hydroxylase
FLS	Flavonolsynthase
FMT	Flavonoid 3'-Methyltransferase
FNR	Flavanon 4-Reduktase

VIII. Abkürzungen

FNS	Flavonsynthase
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethansulfonsäure
Ka	Kartoffel (bei Genen oder Enzymen)
Km	Kämpferol
LAR	Leucoanthocyanidinreduktase
LCy	Leucocyanidin
Lufo	Luteoforol
Luli	Luteoliflavan
Mv	Malvidin
NADPH	Dihyronicotinamidadenindinucleotidphosphat
Nar	Naringenin
OD	optische Dichte
PAL	Phenylalanin-Ammoniak-Lyase
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
Pg	Pelargonidin
PHF	Pentahydroxyflavanon
Pn	Päonidin
ProCy	Procyanidin
Pt	Petunidin
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidon
Qu	Quercetin
RNA	Ribonukleinsäure
UV	Ultraviolett

Gratiam debeo :

Herrn Prof. Gert Forkmann für die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Institut anfertigen zu können.

Michael Reichmann von der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft in Freising-Weihenstephan für die gute Zusammenarbeit bei der Kartoffeltransformation und die anregenden Gespräche.

Andrea Dohm und Thomas Debener von der Bundesanstalt für Züchtungsforschung in Ahrensburg für die gute Zusammenarbeit bei den phytopathologischen Untersuchungen bei der Rose sowie für die Bereitstellung der Sternrußtaukulturen.

Richard Dinkel und seiner Gärtnermannschaft in Dürnst für die Betreuung der Pflanzen, dabei besonders Sabine Parsy für die liebevolle Pflege der Kartoffeln.

Thilo Fischer für wertvolle Tips.

Florian Steinbacher und Martin Wehrenfennig für angenehme Begleitung durch kulinarische Höhen und Tiefen in der Mensa (Käsespätzle mit Kiwi-Bananen-Creme..).

meinen Büronachbarn Said und Mahmoud für drei Jahre angenehmes Arbeitsklima.

allen weiteren Mitarbeitern des Lehrstuhls für Zierpflanzenbau.

und natürlich meiner Frau Irina sowie meinen Eltern Bärbel und Karl Knott.

Curriculum vitae

Name : Jürgen Manfred Knott
Geburtstag : 14.10.1973
Geburtsort : Bruckmühl/Mangfall
Familienstand : verheiratet
Staatsangehörigkeit : Deutsch

1980-1984 : Grundschule in Kolbermoor
1984-1993 : Gymnasium in Bad Aibling, Abitur

1993-1994 : Zivildienst in der Sozialhilfeverwaltung des Landratsamts Rosenheim

1994-2000 : Biologiestudium an der Technischen Universität München, Diplom
1999-2000 : Diplomarbeit am Lehrstuhl für Genetik der TU München bei Prof. Gierl
Thema : Charakterisierung von Cytochrom P450-Enzymen der Unterfamilie
CYP71C aus Mais und Gerste

2000-2003 : Doktorarbeit am Lehrstuhl für Zierpflanzenbau der TU München in Frei-
sing-Weihenstephan bei Prof. Forkmann
Thema : Biochemische Untersuchungen zur Flavonoidbiosynthese bei Rose
und Kartoffel

Teile dieser Dissertation wurden veröffentlicht :

Martens S., Knott J., Seitz C., Janvari L., Yu S. N., Forkmann G., 2003 : Impact of biochemical pre-studies on specific metabolic engineering strategies of flavonoid biosynthesis in plant tissues; Biochemical Engineering Journal 14 (3) : 227-235;

Schlangen K., Gosch C., Römmelt S., Knott J., Fischer T. C., Treutter D., Forkmann G., Stich K., Halbwirth H., 2003 : Can prohexadione-Ca induce antimicrobial flavonoids in Rose ?; European Journal of Horticultural Science 68 (3) : 137-143