

Technische Universität München

Wissenschaftszentrum Weihenstephan

Fachgebiet Obstbau

Beteiligung von Phenylpropanoiden der Apfelrinde an der
Wirt-Parasit-Interaktion von *Malus domestica* (Borkh.) und
Phytophthora cactorum (Lebert & Cohn) Schröter unter
veränderter Ressourcenverfügbarkeit

Max Mornau

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. J. Schnyder

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. D. Treutter

2. Univ.-Prof. Dr. W. Oßwald

Die Dissertation wurde am 03.05.2004 bei der Technischen Universität München eingereicht und
durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt
am 05.07.2004 angenommen.

Gewidmet meinen Geschwistern
Ruth und Franz

„Man gebrauche gewöhnliche Worte
und sage ungewöhnliche Dinge.“

aus unbekannter Quelle

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Nomenklatur und Bedeutung von <i>Phytophthora</i> -Rindenfäulen an Apfel	1
1.2	Biologie von <i>Phytophthora cactorum</i>	2
1.3	Resistenzpotential der Unterlagen M9 und MM106 und der Sorten `Golden Delicious`, `Rewena` und `Topaz` gegenüber <i>Phytophthora cactorum</i>	3
1.4	Verschiedene Bereiche der Wirt-Parasit-Interaktion	5
1.4.1	PR-Proteine (pathogenesis related proteins)	5
1.4.2	Elicidine	7
1.4.3	Phenylpropanoide	9
1.4.3.1	Bedeutung	9
1.4.3.2	Stoffwechsel	10
1.4.3.3	Phenylpropanoide in der Rinde des Apfels	13
1.4.3.4	Einfluss von Ressourcenveränderungen auf den Phenylpropanoidstoffwechsel	15
1.5	Ziele der Arbeit	18
2	Material und Methoden	19
2.1	Chemikalienliste	19
2.2	Geräte und Laborartikel	21
2.3	Pilzmedien	22
2.3.1	V8-Medium	22
2.3.2	Synthetisches MK- Medium für <i>Phytophthora cactorum</i>	22
2.4	Isolierung und Identifizierung eines <i>Phytophthora cactorum</i> -Stammes	23
2.5	Verwendete <i>Phytophthora</i> -Isolate	24

2.6	Reinigung und Nachweis des Elicitins Cactorein	25
2.7	Pflanzenmaterial und Pflanzenernährung	26
2.7.1	Sorten und Unterlagen	26
2.7.2	Stickstoffstufen und Kultursubstrat	26
2.8	Inokulationsmethodik	27
2.9	Elicitinbehandlung	28
2.10	Probenvorbereitung der analysierten Rindenzonen	28
2.11	Analyse von Phenylpropanoiden	30
2.11.1	Extraktion	30
2.11.2	HPLC-Analytik (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)	30
2.11.3	Identifizierung	34
2.11.3.1	Vergleich der UV-Spektren	34
2.11.3.2	Co-Chromatographie	34
2.11.3.3	Dünnschichtchromatographie (DC)	35
2.12	Bestimmung des Proteingehalts	35
2.12.1	Extraktion der Proben	35
2.12.2	Durchführung des Protein-Assay	36
2.13	Untersuchung von PR-Proteinen	37
2.13.1	Chitinase-Aktivität	37
2.13.2	β -1,3-Glucanaseaktivität	38
3	Ergebnisse	41
3.1	Isolierung und Identifizierung eines <i>Phytophthora cactorum</i>-Stammes	41
3.2	Phenolische Inhaltsstoffe der Apfelrinde	42
3.2.1	Identifizierung phenolischer Inhaltsstoffe	42
3.2.2	Diskussion der Substanzidentifizierung	48

3.2.3	Gehalte an Phenylpropanoiden	51
3.2.3.1	Vergleich der Genotypen anhand des Phenylpropanoidgehalts	51
3.2.3.2	Wirkung von Verwundung auf den Gehalt an Phenylpropanoiden	54
3.2.3.2.1	MM106 und `Topaz`	54
3.2.3.2.2	`Rewena`, `Golden Delicious` und M9 unter dem Einfluss unterschiedlicher Stickstoffdüngung	56
3.3	Wirt-Parasit-Interaktion	62
3.3.1	Veränderung des Gesamtproteingehalts durch Stickstoffdüngung bei `Rewena` und `Golden Delicious`	62
3.3.2	Veränderungen der Chitinase- und β -1,3-Glucanaseaktivität durch Stickstoffdüngung bei den Genotypen `Rewena` und `Golden Delicious`	64
3.3.2.1	Chitinaseaktivität	64
3.3.2.2	β -1,3-Glucanaseaktivität	65
3.3.3	Wirkungen des gereinigten Kulturfiltrats	66
3.3.3.1	Wirkung auf Tabak	67
3.3.3.2	Wirkung auf den Phenylpropanoidstoffwechsel in der Rinde von <i>Malus domestica</i> `Topaz`	68
3.3.3.3	Resistenzveränderung durch das gereinigte Kulturfiltrat	69
3.3.4	Einfluss der Position der Infektion am Stamm	70
3.3.4.1	Anfälligkeit der Apfelerinde gegen <i>Phytophthora cactorum</i> in Abhängigkeit von der Position der Verwundung am Stamm	70
3.3.4.2	Einfluss der Position am Stamm auf den Gehalt an Phenylpropanoiden	75
3.3.4.2.1	`Rewena` und `Golden Delicious` unter Stickstoffeinfluss	75
3.3.4.2.2	MM106	80
3.3.5	Veränderte Gehalte an Phenylpropanoiden nach Infektion	81
3.3.5.1	MM106	81
3.3.5.2	`Topaz`	83
3.3.5.3	Modifikationen durch N-Versorgung	85
3.3.5.3.1	`Rewena`	86
3.3.5.3.2	`Golden Delicious`	89
3.3.5.3.3	M9	93
3.3.5.3.4	Substanzen 2, 7 und 11	96

3.3.5.4	Veränderungen im Phenylpropanoidstoffwechsel beim Genotyp M9 durch erhöhte Kohlendioxid-Konzentrationen in der Luft	98
4	Diskussion	101
4.1	Phenylpropanoidgehalte im intakten Rindengewebe unterschiedlicher Genotypen	101
4.2	Reaktion des Rindengewebes auf Verwundung	103
4.3	Wirt-Parasit-Interaktionen	106
4.3.1	Chitinaseaktivität in der Rinde von Apfel	106
4.3.2	β -1,3-Glucanaseaktivität in der Rinde von Apfel	107
4.3.3	Wirkung des gereinigten Kulturfiltrats	107
4.3.4	Bedeutung der Position der Infektion am Stamm für die Pathogenese	110
4.3.5	Phenolgehalt nach Infektion	112
4.3.6	Effekte durch Veränderungen der Ressource Stickstoff auf Gehalte an Phenylpropanoiden in der Rinde	115
4.3.7	Einfluss der Stickstoffdüngung und der Kohlendioxid-Gehaltsveränderungen auf die Pathogenabwehr	117
4.3.8	Einordnung der Ergebnisse nach Veränderung der Ressourcen Stickstoff und Kohlendioxid in bestehende Wachstumshypothesen	120
5	Zusammenfassung	123
	Literaturverzeichnis	125
	Danksagung	142

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Verschiedene Befallsbereiche von <i>Phytophthora</i> : Kragen-, Wurzelhals- und Wurzelfäule; nach BOLEY (1992).....	1
Abb. 2: Allgemeiner Phenylpropanoidstoffwechsel mit beteiligten Enzymen; verändert nach FORKMANN und HELLER (1999) und XIE et al. (2004).....	12
Abb. 3: Flavan-Grundgerüst.....	12
Abb. 4: Schematische Darstellung eines Apfelbaumstammes mit Lokalisation der untersuchten Gewebepartien.....	29
Abb. 5: Unterschiedliche Gewebe der Rinde im Längsschnitt (schematische Darstellung).....	29
Abb. 6: <i>Phytophthora cactorum</i> -Befall an `Topaz`.....	41
Abb. 7: Ergebnis einer PCR zum Nachweis von <i>Phytophthora cactorum</i> und <i>Phytophthora citricola</i> (von Dr. F. Fleischmann zur Verfügung gestellt).....	41
Abb. 8: Chromatogramm von `Golden Delicious` mit UV-Spektren (Teil 1).....	44
Abb. 9: Chromatogramm von `Golden Delicious` mit UV-Spektren (Teil 2).....	45
Abb. 10: Chromatogramm von `Topaz` bei 280 nm, Substanzen nach Tab. 10 bezeichnet.....	46
Abb. 11: Chromatogramm von `Topaz` bei 640 nm nach Nachsäulenderivatisierung mit DMAZA; mit * bezeichneten Substanzen nicht identifizierte Proanthocyanidine.....	46
Abb. 12: Schema der Flavonoidbiosynthese bei <i>Malus domestica</i> bezogen auf die Rinde; modifiziert nach TREUTTER (2001) und XIE et al. (2004).....	49
Abb. 13: Gehalt an verschiedenen Phenylpropanoidklassen in der unverwundeten Phloemkambialschicht von `Golden Delicious` (GD), `Rewena` (RE), `Topaz` (TO), MM106 und M9.....	53
Abb. 14: Gehalte an Phenylpropanoiden in der Phloemkambialschicht 4 Wochen nach Verwundung bei den Genotypen MM106 und `Topaz`; U= Umgebungszone, R= Reaktionszone.....	54
Abb. 15: Gehalte an Phenylpropanoiden in der Phloemkambialschicht nach Verwundung, Genotypen `Rewena`, `Golden Delicious` und M9 bei unterschiedlicher N-Düngung; N1: moderate Stickstoffversorgung, N3: hohe Stickstoffversorgung; U = Umgebungszone, R = Reaktionszone; Teil 1.....	57

Abb. 16: Gehalte an Phenylpropanoiden in der Phloemkambialschicht nach Verwundung, Genotypen 'Rewena', 'Golden Delicious' und M9 bei unterschiedlicher N-Düngung; N1: moderate Stickstoffversorgung, N3: hohe Stickstoffversorgung; U = Umgebungszone, R = Reaktionszone; Teil 2.....	58
Abb. 17: Proteingehalt der Phloemkambialschicht der beiden Genotypen 'Golden Delicious' und 'Rewena'.....	63
Abb. 18: Chitinaseaktivität in der Phloemkambialschicht der Genotypen 'Golden Delicious' und 'Rewena'.....	64
Abb. 19: β -1,3-Glucanaseaktivität in der Phloemkambialschicht der Genotypen 'Golden Delicious' und 'Rewena'.....	65
Abb. 20: Schema zu den Untersuchungen zur Wirkung des Elicitins.....	67
Abb. 21: Veränderte Lichtdurchlässigkeit eines Tabakblattes nach Infiltration.....	68
Abb. 22: Tabakblatt 21 h nach Einleitung des aufgereinigten Kulturfiltrats von <i>Phytophthora cactorum</i> Iso 2.....	68
Abb. 23: Tabakblatt 45 h nach Einleitung des Kulturfiltrats.....	68
Abb. 24: Veränderungen im Phenylpropanoidgehalt in der Reaktionszone bei 'Topaz' nach Infiltration mit aufgereinigtem Kulturfiltrat von <i>Phytophthora cactorum</i> Iso 2.....	69
Abb. 25: Nekrosenfläche bei 'Topaz' nach vorheriger Behandlung mit aufgereinigtem Kulturfiltrat von <i>Phytophthora cactorum</i> Iso 2.....	70
Abb. 26: Versuchsanordnung zur Untersuchung der systemischen Resistenz an 'Topaz'.....	70
Abb. 27: Nekrotische Abgrenzung nach Infektion bei 'Golden Delicious'; oben: N3, unten: N1...	71
Abb. 28: Nekrosenflächen 4 Wochen nach Infektion mit <i>Phytophthora</i> -Stamm Pt8 an den Genotypen 'Rewena', 'Golden Delicious' und M9.....	72
Abb. 29: Nekrosenfläche in Abhängigkeit von der Entfernung zur Stammbasis bei 'Golden Delicious'.....	73
Abb. 30: Nekrosenfläche in Abhängigkeit von der Entfernung zur Stammbasis bei M9.....	73
Abb. 31: Nekrosenfläche in Abhängigkeit von der Entfernung zur Stammbasis bei 'Rewena'.....	73
Abb. 32: Nekrosenfläche in Abhängigkeit vom Abstand von der Stammbasis bei der Stickstoffstufe N1 ('Rewena', 'Golden Delicious', M9; unter 25 cm).....	74

Abb. 33: Nekrosenfläche in Abhängigkeit vom Abstand von der Stammbasis bei der Stickstoffstufe N3 ('Rewena', 'Golden Delicious', M9; unter 25 cm).....	74
Abb. 34: Phenylpropanoidgehalte der Genotypen 'Rewena' und 'Golden Delicious' in der Rinde in Abhängigkeit vom Abstand von der Veredlungsstelle; Teil 1 – Gesamtsumme, Summe ohne Phloridzin, Phloridzin und Flavonole.....	76
Abb. 35: Phenylpropanoidgehalte der Genotypen 'Rewena' und 'Golden Delicious' in der Rinde in Abhängigkeit vom Abstand von der Veredlungsstelle; Teil 2 - Flavanone, acylierte Flavonoide, monomere Flavanole, Proanthocyanidine.....	77
Abb. 36: Gesamtgehalt, Gehalt an Phloridzin und acylierten Flavonoiden in Abhängigkeit vom Abstand zur Stammbasis beim Genotyp MM106.....	80
Abb. 37: Gehalt an Phenylpropanoiden ohne Phloridzin und Flavanolgehalt in Abhängigkeit vom Abstand zur Stammbasis beim Genotyp MM106.....	80
Abb. 38: Gehalte an Flavanonen, monomeren Flavanolen und Proanthocyanidinen in Abhängigkeit vom Abstand zur Stammbasis beim Genotyp MM106.....	80
Abb. 39: MM106; Prozentualer Gehalt an Phenylpropanoiden nach Infektion; Bezugsgröße (100%) sind die einzelnen Gehalte nach Behandlung mit dem Kontrollmedium V8 (siehe Tab. 15); Bezeichnung ebenfalls nach Tab. 15.....	82
Abb. 40: 'Topaz'; Prozentualer Gehalt an Phenylpropanoiden nach Infektion; Bezugsgröße (100%) sind die einzelnen Gehalte nach Behandlung mit dem Kontrollmedium V8 (siehe Tab. 16); Bezeichnung ebenfalls nach Tab. 16.....	84
Abb. 41: Gehalt an den Substanzen 2, 7 und 11 in der Phloemkambialschicht von 'Topaz' nach Infektion (P.c.) und nach Medienkontrollbehandlung (V8); U= Umgebungszone, R= Reaktionszone.....	85
Abb. 42: Veränderung in der Stickstoffstufe N1 von 'Rewena' durch Infektion in Bezug auf die V8-Kontrolle in % ; Bezugsgröße (100%) sind die einzelnen Gehalte nach Behandlung mit dem Kontrollmedium V8 (siehe Tab. 17).....	87
Abb. 43: Veränderung in der Stickstoffstufe N3 von 'Rewena' durch Infektion in Bezug auf die V8-Kontrolle in % ; Bezugsgröße (100%) sind die einzelnen Gehalte nach Behandlung mit dem Kontrollmedium V8 (siehe Tab. 17).....	87

Abb. 44: Veränderung in der Stickstoffstufe N1 von `Golden Delicious` durch Infektion in Bezug auf die V8-Kontrolle in % ; Bezugsgröße (100%) sind die einzelnen Gehalte nach Behandlung mit dem Kontrollmedium V8 (siehe Tab. 18).....	90
Abb. 45: Veränderung in der Stickstoffstufe N3 von `Golden Delicious` durch Infektion in Bezug auf die V8-Kontrolle in % ; Bezugsgröße (100%) sind die einzelnen Gehalte nach Behandlung mit dem Kontrollmedium V8 (siehe Tab.18).....	90
Abb. 46: Veränderung in der Stickstoffstufe N1 von M9 durch Infektion in Bezug auf die V8-Kontrolle in %; Bezugsgröße (100%) sind die einzelnen Gehalte nach Behandlung mit dem Kontrollmedium V8 (siehe Tab. 19).....	94
Abb. 47: Veränderung in der Stickstoffstufe N3 von M9 durch Infektion in Bezug auf die V8-Kontrolle in %; Bezugsgröße (100%) sind die einzelnen Gehalte nach Behandlung mit dem Kontrollmedium V8 (siehe Tab. 19).....	94
Abb. 48: Gehalte in `Rewena` (N1) der Substanzen 2, 7 und 11.....	96
Abb. 49: Gehalte in `Rewena` (N3) der Substanzen 2, 7 und 11.....	96
Abb. 50: Gehalte in `Golden Delicious` (N1) der Substanzen 2, 7 und 11.....	96
Abb. 51: Gehalte in `Golden Delicious` (N3) der Substanzen 2, 7 und 11.....	96
Abb. 52: Gehalte in M9 (N1) der Substanzen 2, 7 und 11.....	96
Abb. 53: Gehalte in M9 (N3) der Substanzen 2, 7 und 11.....	96
Abb. 54: Gehalte an Flavonolen, acylierten Flavonoiden, Flavanonen und der Gesamtsumme ohne Phloridzin in der Rinde von M9 nach Kohlendioxidbehandlung; MK: Kontrolle mit Medium MK; P.c.: mit <i>Phytophthora cactorum</i> inokulierte Variante; amb.: 400 ppm Kohlendioxid; erh.: 700 ppm Kohlendioxid.....	99
Abb. 55: Bildung von Chinonen aus Phloridzin nach HUNTER (1975) und RAA und OVEREEM (1968).....	102
Abb. 56: Graphischer Vergleich der Gehalte an Phenylpropanoiden der Bastkambialschicht der Stickstoffstufen N1 und N3 von `Rewena`; Umgebungszone nach Infektion mit <i>Phytophthora cactorum</i>	114

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Phloridzingehalt in der Rinde von Apfel.....	13
Tab. 2: Verwendete Pilzstämme.....	24
Tab. 3: Kulturschema der Versuchsbäume.....	26
Tab. 4: Charakterisierung des HPLC-Analysenlaufs.....	31
Tab. 5: Methanol-Ameisensäure-Gradient für HPLC-Analytik.....	32
Tab. 6: Responsefaktoren zur Gehaltsbestimmung.....	33
Tab. 7: Reaktionsansatz für die Proteinbestimmung.....	36
Tab. 8: Reaktionsschema der Chitinasebestimmung.....	38
Tab. 9: Reaktionsschema der β -1,3-Glucanasebestimmung.....	39
Tab. 10: Einteilung in Substanzklassen mit charakteristischen Absorptionsmaxima mit Retentionszeiten.....	43
Tab. 11: Liste der identifizierten Flavanole und Proanthocyanidine.....	47
Tab. 12: Prozentualer Gehalt der Phenylpropanoidklassen bezogen auf die Gesamtsumme; Genotypen MM106 und `Topaz`	55
Tab. 13: Prozentualer Anteil verschiedener Phenylpropanoidklassen bezogen auf die Gesamtsumme der Genotypen `Rewena`, `Golden Delicious` und M9 in unterschiedlichen N-Stufen nach Verwundung.....	59
Tab. 14: Prozentualer Phenylpropanoidgehalt in der Reaktionszone nach Verwundung bezogen auf die jeweiligen Werte der Umgebungszone (100%); `Rewena`, `Golden Delicious` und M9; s=Standardabweichung.....	60
Tab. 15: MM106, Gehalte an unterschiedlichen Phenylpropanoiden nach Behandlung mit dem Kontrollmedium V8; Werte stellen 100%-Bezugsgröße für Abb. 39 dar.....	82
Tab. 16: `Topaz`, Gehalte an unterschiedlichen Phenylpropanoiden nach Behandlung mit dem Kontrollmedium V8; Werte stellen 100%-Bezugsgröße für Abb. 40 dar.....	84
Tab. 17: `Rewena`, Gehalte an unterschiedlichen Phenylpropanoidklassen nach Behandlung mit dem Kontrollmedium V8; Werte stellen 100%-Bezugsgröße für die Abb. 42 und Abb. 43 dar.....	87

Tab. 18: `Golden Delicious`, Gehalte an unterschiedlichen Phenylpropanoidklassen nach Behandlung mit dem Kontrollmedium V8; Werte stellen 100%-Bezugsgröße für die Abb. 44 und Abb. 45 dar.....	90
Tab. 19: M9, Gehalte an unterschiedlichen Phenylpropanoidklassen nach Behandlung mit dem Kon- trollmedium V8; Werte stellen 100%-Bezugsgröße für die Abb. 46 und Abb. 47 dar.....	94
Tab. 20: Akkumulation von Phenylpropanoiden nach Verwundung, Vergleich unverwundete und verwundete Phloemkambialschicht (nach Abb. 13, 14 und 15) ; „+++“= starke Akkumulation, „++“= Akkumulation, „+“= leichte Akkumulation, „0“=kein Effekt, „-“=Gehaltsrückgang, „--“=starker Gehaltsrückgang.....	104

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
DC	Dünnschichtchromatographie, -graphisch
DMAZA	p-Dimethylaminozimtaldehyd
GD	<i>Malus domestica</i> Sorte `Golden Delicious`
M11	<i>Malus domestica</i> Unterlage M11
M9	<i>Malus domestica</i> Unterlage M9
MK	MK-Medium, synthetisches Medium modifiziert nach Koehl
MM106	<i>Malus domestica</i> Unterlage MM106
MM111	<i>Malus domestica</i> Unterlage MM111
N1	Stickstoffstufe N1; entspricht moderater N-Düngung
N3	Stickstoffstufe N3; entspricht luxuriöser N-Düngung
P.c.	<i>Phytophthora cactorum</i>
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidon
R	Reaktionszone
RE	<i>Malus domestica</i> Sorte `Rewena`
Tab.	Tabelle
TO	<i>Malus domestica</i> Sorte `Topaz`
TS	Trockensubstanz
U	Umgebungszone
V8	Gemüsesaftagar

1 Einleitung

1.1 Nomenklatur und Bedeutung von *Phytophthora*-Rindenfäulen an Apfel

Nomenklatur

Phytophthora cactorum ist der Verursacher unterschiedlicher Schadbilder. Die als Kragenfäule (collar rot) bezeichneten Symptome an der Edelsorte und die Symptome der Wurzelhalsfäule (crown rot) an der Unterlage direkt unter der Veredlungsstelle sind die wichtigsten Schadbilder (Abb. 1). Neben diesen Fäulen werden auch Wurzelfäulen (root rot) an Wurzeln durch *Phytophthora* ausgelöst (Abb. 1). Zusätzlich sind Infektionen an Früchten möglich, die zu Fruchtfäulen führen (HARRIS 1991).

HARRIS (1991) bezeichnet die unterschiedlichen Schadbilder im Rindenbereich ohne Unterteilung in Kragenfäule und Wurzelhalsfäule als Rindenfäule (bark rot).

Die Terminologie der Rindenfäule wird für diese Arbeit übernommen, weil sowohl die Edelsorte über der Veredlungsstelle als auch Rindenbereiche von Apfelunterlagen untersucht und mit dem Pathogen infiziert wurden.

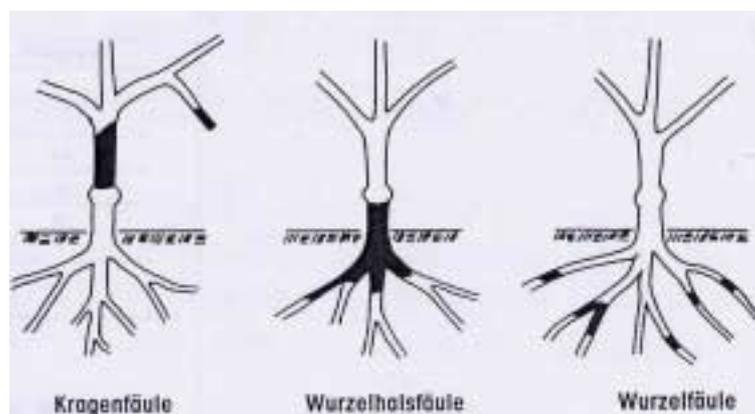


Abb. 1: Verschiedene Befallsbereiche von *Phytophthora*: Kragen-, Wurzelhals- und Wurzelfäule; nach BOLEY (1992)

Bedeutung

Die von Pathogenen der Gattung *Phytophthora* verursachte Rindenfäule ist in Apfelanlagen weltweit anzutreffen (ERWIN und RIBEIRO 1996; HARRIS 1991; JEFFERS und WILCOX 1990). Eine Vielzahl an Arten von *Phytophthora* wurden mit diesem Krankheitsbild in den Anlagen in Verbindung gebracht: *Phytophthora cactorum*, *Phytophthora cambivora*, *Phytophthora*

megasperma und *Phytophthora syringae* (JEFFERS und ALDWINCKLE 1988; JEFFERS et al. 1982; MATHERON et al. 1988; SUZUI und HOSHINO 1979). Auch die Art *Phytophthora citricola* wurde in Apfelanlagen nachgewiesen (JEFFERS und ALDWINCKLE 1988; JONES und ALDWINCKLE 1990; MACCRACKEN 1985). LATORRE et al. (2001) konnten zusätzlich die beiden Arten *Phytophthora cryptogea* und *Phytophthora gonapodyides* von Apfelbäumen in Chile isolieren.

Die einzelnen *Phytophthora*-Arten wurden meist in einem Komplex mit mehreren unterschiedlichen Arten nachgewiesen. Bei den Isolationen wurde die Beteiligung von *Phytophthora cactorum* bei nahezu allen Befallsherden gezeigt. Das Pathogen *Phytophthora cactorum* ist als der Haupterreger der Rindenfäule bei Apfel zu betrachten (HARRIS 1991).

Phytophthora cactorum stellt nach ERWIN und RIBEIRO (1996) ein bedeutendes Problem in allen Apfelanbaugebieten der Erde dar. Die Infektion mit *Phytophthora cactorum* kann zu einer allgemeinen Schwächung der Apfelbäume und im schlimmsten Falle zum Tod der Bäume führen. Normalerweise verursacht *Phytophthora cactorum* keine spektakulären Epidemien, sondern führt eher zur nachhaltigen Schwächung der Bestände, zu einer Verkürzung der Lebensdauer und zu einer Reduktion in der Erntemenge, was ernsthafte ökonomische Probleme für den Obstkultivateur auslösen kann (ALEXANDER und STEWART 2001).

Bei besonders guten Bedingungen für das Pathogen kann es zum Absterben von bis zu 20 % der Bäume einer Apfelanlage kommen, wie von ALEXANDER und STEWART (2001) für ein Anbaugebiet in Neuseeland berichtet wird. In Südtirol fielen im Herbst 2001 bis zu 7,5 % der Bäume in Beständen mit der wegen der vorhandenen Schorfresistenz im ökologischen Anbau wichtigen Sorte 'Topaz' aus (LARDSCHNEIDER et al. 2002; MORNAU et al. 2002). Die Befallsstärke unterscheidet sich von Jahr zu Jahr und ist regional stark abhängig von den Umweltbedingungen, wobei besonders die Feuchtigkeit und die Temperatur bedeutende Einflussfaktoren darstellen (ALT 1983; HARRIS 1991).

1.2 Biologie von *Phytophthora cactorum*

Die Gattung *Phytophthora* gehört zur Familie der Phytiaceae, Ordnung Pythiales und zur Klasse der Oomyceten. Die Oomyceten werden aufgrund ihrer im Wasser aktiv bewegungsfähigen Zoosporen und ihrer besonderen Zellwandbeschaffenheit nicht länger zu den echten Pilzen gezählt. Die Zellwände der Vertreter der Gattung *Phytophthora* bestehen im Gegensatz zu den Zellwänden der echten Pilze nicht hauptsächlich aus Chitin sondern aus Zellulose und β -1,3-Glucanen. Wegen der engen Verwandtschaft zu heterokonten Algen wird

die Klasse der Oomyceten dem Reich der Chromista zugeordnet (CAVALIER-SMITH 1998; DICK 1990; ERWIN und RIBEIRO 1996; KIRK et al. 2001; KUMAR und RZHETSKY 1996).

Das Pathogen kann im Boden vor der Pflanzung vorhanden sein oder über Pflanzmaterial, Gießwasser, Tiere oder andere Art und Weise eingeschleppt werden (JEFFERS und ALDWINKLE 1988; MCINTOSH und MACSWAN 1966). Einmal in einer Apfelanlage vorhanden regeneriert sich *Phytophthora cactorum* durch Besiedlung von lebenden, abgeworfenen Pflanzenteilen wie Blättern und Früchten und ist so in der Lage, die Inokulumdichte zu erhöhen (BRAUN und NIENHAUS 1959). Die Infektion erfolgt an dünnen Abgrenzungsgeweben oder über Stomata und Lentizellen. Speziell die Rinde kann direkt über Wunden, Wachstumsrisse oder Lentizellen befallen werden (BRAUN und NIENHAUS 1959; HARRIS 1989). Auch aufgeweichtes und intaktes Rindengewebe kann direkt penetriert werden (SCHWINN 1965; SEWELL et al. 1976).

Phytophthora cactorum ist ein bodenbürtiges Pathogen, dessen prinzipielles Überdauerungsorgan die Oospore darstellt. Bedeutender für Infektionen sind aber überdauerndes Mycel und asexuell entstandene Chlamydosporen (KÖRBER 1980). Aus den Sporen keimende Sporangien setzen Zoosporen frei, die als Hauptinfektionsquelle gelten (HARRIS 1986). Durch Wind verbreitete Sporangien stellen eine weitere Ausbreitungsmöglichkeit des Pathogens dar. Die Infektionsstärke und Entwicklung des Pathogens ist besonders von der Wasserverfügbarkeit im und über dem Boden abhängig. Die in freies Wasser entlassenen Zoosporen können über Spritzwasser vom Boden an den Stamm gelangen oder mit Wind verbreitet werden. Nach Encystierung infiziert die Zoospore mittels eines Keimschlauchs.

1.3 Resistenzpotential der Unterlagen M9 und MM106 und der Sorten `Golden Delicious`, `Rewena` und `Topaz` gegenüber *Phytophthora cactorum*

Die Unterlagen M9 und MM106 unterscheiden sich nach ALT (1978) stark in ihrer Anfälligkeit gegenüber *Phytophthora cactorum*. ALT stellte in seinen Arbeiten fest, dass die Wahl der Unterlage einen Einfluss auf die Nekrosenbildung nach Infektion bei verschiedenen Edelsorten hatte. Für Edelsorten auf der Unterlage M9 konnte ALT in allen Untersuchungen kleinere Nekrosenflächen nachweisen als auf der Unterlage MM106. Dies deckt sich mit Aussagen aus der obstbaulichen Praxis, nach denen bei Bäumen mit der Unterlage MM106 häufig Probleme mit dem Erreger der Rindenfäule *Phytophthora cactorum* auftreten. Mündlich wurde dies im Jahre 2001 von L. PLATZGUMMER für Südtirol bestätigt und wird in einer Arbeit von JEFFERS und ALDWINKLE (1986) für Apfelanlagen im Raum New York belegt.

Interessanterweise konnte die vorhandene Feldresistenz für die Unterlage MM111 beim Vergleich mit der Unterlage MM106 in der Arbeit von JEFFERS und ALDWINCKLE (1986) mittels eines *in-vitro*-Testverfahrens nicht bestätigt werden. Die Autoren merkten aber auch an, dass das verwendete *in-vitro*-Testverfahren nicht die Resistenz in der Anlage beschreiben kann, sondern nur die Anfälligkeit des Phloem-Kambium-Gewebes gegen das Pathogen.

Die mittelschwachwüchsige Unterlage MM106 wurde aber auch von anderen als besonders anfällig gegen *Phytophthora*-Infektion beschrieben (BROWN und HENDRIX 1980; JEFFERS und ALDWINCKLE 1988; JULIS et al. 1978; McINTOSH 1975; UTKEHDE 1986). In Übereinstimmung mit einer Arbeit von TIDBALL (1990) diente die Unterlage MM106 wegen ihrer Anfälligkeit zur Untersuchung der Pathogenese von *Phytophthora cactorum* und deckte in der vorliegenden Arbeit den Bereich der als anfällig einzustufenden Unterlage ab.

Im Rahmen einer anderen Arbeit konnte ALT (1983) nachweisen, dass die Unterlage M9 im Gegensatz zur Unterlage M11 bei der Edelsorte 'Cox Orange' zu deutlich besseren Resistenzeigenschaften führt. Auf der Unterlage M11 kam es nach künstlicher Infektion des Edelreises sogar zum Befall der Unterlage über das Edelreis, wohingegen eine Infektion der Unterlage M9 über das Edelreis zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen wurde. Während es in 'Cox Orange' auf M11 bei verbesserten Wuchsbedingungen für das Pathogen durch Temperaturveränderung zu einer starken Vergrößerung der Nekrosenflächen kam, wurde auf M9 eine minimale Veränderung der Nekrosenflächen durch die veränderten Wuchsbedingungen festgestellt. ALT (1978) hatte die Unterlage M9 bereits als resistent gegen *Phytophthora cactorum* bezeichnet. Bei ALEXANDER und STEWART (2001) wird M9 erstmalig als tolerant bezeichnet.

Sie wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit als Vertreter der als gegen *Phytophthora cactorum* hochgradig tolerant einzustufenden Unterlage verwendet.

Die Edelsorte 'Golden Delicious' wurde nach einer großangelegten Sortentestung mit 79 Edelsorten von KRÖBER und KARATZ (1979) als gering anfällig bezeichnet, was im Widerspruch zu Arbeiten von TEN HOUTEN (1958) und BEHR (1961) steht, die 'Golden Delicious' als hoch anfällig gegen den Erreger der Kragenfäule einstufen. Im Rahmen dieser Arbeiten wurde mit derselben Inokulationsmethodik, der Korkbohrermethode gearbeitet, auf die auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zurückgehen. Bei Untersuchungen mittels des „excised twig tests“ (BORECKI und MILLIKAN 1969), bei dem Triebstücke vom Baum entfernt, von der Borke befreit und dann auf Nährmedium mit dem Pathogen gebracht werden, um nach 5 bis 10 Tagen die Nekrosenlänge zur Resistenzeinschätzung heranzuziehen, wurde die Sorte

‘Golden Delicious’ als eher weniger anfällig eingestuft (ALDWINCKLE et al. 1975). Wie aber weiter oben bereits ausgeführt ist das *in-vitro*-Testverfahren nicht mit den nativen Infektionsbedingungen zu vergleichen und stellt eher ein Verfahren zur Testung des Abwehrverhaltens der Phloem-Kambium-Schicht dar (JEFFERS und ALDWINCKLE 1986).

Die Sorten ‘Rewena’ und ‘Topaz’, die eine Schorffresistenz aufgrund des eingekreuzten Vf-Gens aufweisen, sind erst seit Mitte der 90-er Jahre im Anbau. ‘Topaz’ war bei der Einführung ‘Rewena’ wegen der geschmacklichen und visuellen Fruchteigenschaften überlegen und ist heute die meistgepflanzte Sorte im ökologischen Anbau (RUESS 2004). Über die Anfälligkeit der beiden Genotypen gegen *Phytophthora cactorum* waren zum Zeitpunkt der Markteinführung keine Daten vorhanden. Heute aber ist für die Sorte ‘Topaz’ ab dem 3. Standjahr von einer deutlichen Anfälligkeit gegen *Phytophthora cactorum* zu berichten (LARDSCHNEIDER et al. 2002; MORNAU et al. 2002; RUESS 2004). Im Gegensatz dazu liegen derzeit keine Berichte über natürliche Infektionen durch *Phytophthora cactorum* an ‘Rewena’ vor.

1.4 Verschiedene Bereiche der Wirt-Parasit-Interaktion

1.4.1 PR-Proteine (pathogenesis related proteins)

PR-Proteine sind pflanzeigene Proteine, deren Bildung durch Stresssituationen und Pathogenbefall induziert werden kann. Viele PR-Proteine werden mit systemisch induzierter Resistenz (SAR) in Verbindung gebracht und besitzen antimikrobielle Aktivitäten. In nicht-infizierten Pflanzen werden sie nicht oder nur in sehr geringen Konzentrationen nachgewiesen (VAN LOON und VAN STRIEN 1999). Erstmals wurden PR-Proteine in Tabak nach Infektion mit dem Tabak-Mosaic-Virus als neue Proteinkomponenten entdeckt (VAN LOON und VAN KAMMEN 1970). 14 Familien von PR-Proteinen werden nach VAN LOON und VAN STRIEN (1999) unterschieden, wobei innerhalb der Familien nochmals nach dem isoelektrischen Punkt der PR-Proteine klassifiziert wird.

In neueren Arbeiten wurden PR-Proteine als Allergene identifiziert (HOFFMANN-SOMMERGRUBER 2002; SOMAN et al. 2000). Die verhältnismäßig kleinen Proteine sind auch bei niedrigem pH-Wert stabil und gegenüber Proteolyse weitgehend resistent, was dazu führen kann, dass sie bei prädisponierten Personen eine schnelle Immunantwort auslösen können (HOFFMANN-SOMMER-

GRUBER 2002). Wie die molekularen Interaktionen der von der Pflanze stammenden PR-Proteine mit dem Immunsystem des Menschen so wurden auch die molekularen Abwehrmechanismen durch PR-Proteine gegen Pathogene intensiv untersucht. GRUNWALD et al. (2003) wiesen eine Vielzahl unterschiedlicher PR-Proteine im Guttationswasser von Gerste ohne Infektion nach und diskutierten dies als Schutz vor möglichen Eindringlingen, speziell Bakterien. Dass PR-Proteine in der Interaktion zwischen Pathogenen und Pflanzen eine wichtige Rolle spielen, zeigten eine Vielzahl von Untersuchungen, bei denen unterschiedliche Resistenzreaktionen einhergehend mit Akkumulationen an PR-Proteinen nachgewiesen wurden (AVILA et al. 2003; ANAND et al. 2003; KELLY und BERNARD 2002; PRACHI et al. 2002; REP et al. 2002; RAMAMOORTHY et al. 2002; SRIVASTAVA et al. 2001).

An Tomatenpflanzen, bei denen systemische Resistenz induziert wurde, zeigte sich eine veränderte Morphologie der Haustorien von *Phytophthora infestans*, so dass es zu einer Unterdrückung der Haustorienbildung und des Hyphenwachstums kam. Das für die Abwehr wichtige PR-Protein AP24 wurde in den Zellwänden des Pathogens nachgewiesen, was die direkte Interaktion verdeutlicht (JEUN und BUCHENAUER 2001). Die PR-Proteine wurden im Zusammenhang mit *Phytophthora* an unterschiedlichen Wirtspflanzen untersucht: *Nicotiana tabacum* (Tabak) (COVENTRY und DUBERY 2001; ROTH et al. 2000), *Lycopersicon lycopersicum* (Tomate) (JEUN 2000; JEUN und BUCHENAUER 2001; ROTH et al. 2000), *Solanum tuberosum* (Kartoffel) (FLEISCHMANN 2000; PLESSL 2002), *Capiscum annum* (Paprika) (EGEA et al. 2001; GARCIA et al. 1998), *Glycine max* (Sojabohne) (GROTEN und BARZ 2000), *Citrus sinensis* (Orange) (FAGOAGA et al. 2001), *Hevea brasiliensis* (Gummibaum) (NARASIMHAN et al. 2000). Ob PR-Proteine in der Interaktion zwischen *Phytophthora cactorum* und *Malus domestica* von Bedeutung sind, wurde bisher nicht erforscht.

Bei der Apfelsorte 'Golden Delicious' wurde durch den Wirkstoff Acibenzolar-S-methyl (auch Benzo(1,2,3)thiadiazole-7-carbothionsäure S-methylester; Handelspräparat: Bion) eine Induktion von SAR festgestellt, die gegen eine Infektion mit der Bakteriose Feuerbrand, *Erwinia amylovora*, schützte. Peroxidasen und β -1,3-Glucanasen, zwei mit der Abwehr in Verbindung stehende Enzyme, wurden in den behandelten Blättern sowohl lokal als auch systemisch stark akkumuliert (BRISSET et al. 2000). Ebenfalls mit Acibenzolar-S-methyl behandelte Blätter von Apfelsämlingen dienten ZIADI et al. (2001) zur Identifizierung von Transkripten für PR-Proteine, die zur Gruppe PR-10 gehören. Es wird diskutiert, dass die PR-10-Proteine für funktionelle Abwehrmechanismen wie für Pflanzenentwicklungsprozesse von Bedeutung sein können. Ihre biologische Funktion ist aber noch ungeklärt (ZIADI et al. 2001).

Im Apfelblatt der Unterlage MM106 konnte nach künstlicher Infektion mit *Erwinia amylovora* innerhalb von 6 bis 72 Stunden nachgewiesen werden, dass es zum einen zur Aktivitätssteigerung der Chitinasen, β -1,3-Glucanasen, Peroxidasen und der Glutathionreduktase kam, zum anderen konnte gezeigt werden, dass die Genexpression für Chitinasen, β -1,3-Glucanasen und PR-5-Proteine hochreguliert wurde. Auch die Gene für die Enzyme des Phenylpropanoidstoffwechsels, Phenylalaninammoniumlyase, Chalkonsynthese, Chalkonisomerase, Dihydroflavonolreduktase und Flavonolsynthase wurden nach Infektion unterschiedlich reguliert (VENISSE et al. 2002).

1.4.2 Elicitine

Verschiedene Pathogene der Gattung *Phytophthora* geben Elicitoren an ihr Kulturmedium ab. Dabei konnten RICCI et al. (1992; 1989) Proteine mit einem Molekulargewicht von 10 kDa nachweisen. Diese Proteine lösten in Tabakblättern eine hypersensitive Reaktion aus, die mit einer in Folge der Behandlung einhergehenden systemischen Resistenz verbunden war. RICCI et al. (1989) prägten den Begriff des Elicitins für diese Proteine. Neben *Phytophthora*-Arten wurden Elicitine auch bei *Pythium vexans* nachgewiesen (HUET et al. 1995). Elicitine werden nach ihrem isoelektrischen Punkt in basische β - oder saure α -Elicitine eingeteilt. Die α -Elicitine sind eher für die Induktion von systemisch induzierten Resistenzen verantwortlich, wohingegen die β -Elicitine als Induktoren von hypersensitiven Reaktionen angesehen werden (HUET et al. 1994; NESPOULOUS et al. 1992). In Arbeiten von NESPOULOUS et al. 1992 wurden unterschiedliche Elicitine in einem Bioassay mit Tabakblättern verglichen. Die basischen β -Elicitine Cryptogein, Cinnamomin und β -Drechslerin zeigten höhere Toxizität. Die sauren α -Elicitine Capsicein, Parasiticein und α -Drechslerin waren erst in höheren Konzentrationen toxisch. Für alle *Phytophthora*-Arten wurde die Existenz von α -Elicitinen, gleichzeitig aber nur für wenige die Existenz von basischen β -Elicitinen gezeigt (PANABIERES et al. 1997; PONCHET et al. 1999).

Speziell für *Phytophthora cactorum* wurde das α -Elicitin Cactorein nachgewiesen (DUBERY et al. 1994; HUET et al. 1993; MEZZETTI et al. 1994; PLICH und RUDNICKI 1979; PONCHET et al. 1999). Erst mit der Arbeit von DUBERY et al. (1994) wurde im Bereich *Phytophthora cactorum* der Begriff Toxin vom Begriff Elicitin abgelöst. Nach PLICH und RUDNICKI (1979) könnte die Produktion des Toxins eine wichtige Rolle in der Pathogenese spielen. Sie stellten die Hypothese auf, dass das als Toxin wirkende Elicitin für das Abtöten des Wirtsgewebes

verantwortlich sein könnte. BLEIN et al. (1991) zeigten, dass es zu einer spezifischen Bindung von Elicitinen an hochaffine Stellen der Plasmamembran kommt. Bei der Wirkung der Elicitine in Tabak sind vor allem der Turgorverlust, der Abbau der Chloroplastenmembranen und die völlige Dekompartimentierung der Zellen zu beobachten (BRUMMER et al. 2002; HEISER et al. 1999; MILAT et al. 1991). BRUCE et al. (1996) gehen davon aus, dass Elicitine keine Bedeutung für die Pathogenität haben. Als Ausnahmen führen sie *Nicotiana tabacum* (Tabak) und *Raphanus sativus* (Rettich) an, bei denen sie eine mögliche Mutation für Veränderungen im Bereich der Zellmembran und damit die veränderte Reaktion auf Elicitine verantwortlich machten. Von MEZZETTI et al. (1994) wurden die Veränderungen der Plasmamembran von Apfelzellen der Genotypen MM106 und MM111 untersucht. Zellmembranen des anfälligen Genotyps MM106 wurden im Gegensatz zu den Zellmembranen des Genotyps MM111 von dem Elicitin Cactorein nicht in ihrem elektrochemischen Potential verändert.

Veränderungen des Membranpotentials bei Apfelzellen durch das Elicitin Cactorein (MEZZETTI et al. (1992; 1994) sprechen allerdings gegen die Theorie von BRUCE (1996), dass Elicitine nur für Interaktionen mit *Nicotiana tabacum* und *Raphanus sativus* von Bedeutung seien.

In Tabakzellkulturen wurde durch Behandlung mit Cactorein eine Akkumulation von Phytoalexinen der Sesquiterpenoid-Klasse nachgewiesen. Rishitin, Phytuberol und Capsidiol akkumulierten sich im Medium. Auch konnte ein Anstieg von PR-Proteinen nach Elicitinbehandlung gezeigt werden (DUBERY et al. 1994). Bei Untersuchungen zur Wirkung der Elicitine Cryptogein, Capsicein und Cinnamomin auf Zellsuspensionskulturen von Tabak wurde ebenfalls eine Akkumulation von Capsidiol und anderen Sesquiterpenoiden nachgewiesen (MILAT et al. 1991). BECKER et al. (2000) isolierten aus *Phytophthora sojae* vier verschiedene Isoformen des Elicictins Sojein. Sojein ist ein saures α -Elicitin wie Cactorein. Auch mit Sojein konnten Nekrosen bei Tabak verursacht werden. Alle Sojein-Isoformen induzierten in Tabak- und Sojabohnenpflanzen und Tabakzellkulturen die Abwehrgene, die für die Enzyme Phenylalaninammoniumlyase, Glutathion-S-Transferase und Chalkonsynthase kodieren (BECKER et al. 2000). Ebenfalls in Tabakzellkulturen konnten SASABE et al. (2000) die Aktivierung des Gens für die Phenylalaninammoniumlyase nach Behandlung mit dem Elicitin von *Phytophthora infestans*, dem Infestin zeigen. Diese Aktivierung war auf die ersten sechs Stunden nach Behandlung begrenzt. CHURNGCHOW und RATTARASARN (2000) identifizierten Palmivorein aus *P. palmivora*. Es wurde als saures Elicitin beschrieben. Palmivorein verursachte sowohl an Tabak als auch an der Pflanze, von der der Erreger isoliert wurde, Nekrosen. Der gegenüber dem Pathogen anfällige Klon des Gummibaumes (*Hevea*

brasiliensis) reagierte erheblich stärker auf das Elicitin mit Welke und Nekrosenbildung als der Genotyp, der als resistent bezeichnet wird.

Dies widerspricht der Hypothese von BRUCE et al (1996), nach der Anfälligkeit mit einer Insensitivität gegenüber dem Elicitin einhergeht, und umgekehrt sich eine fehlende Anfälligkeit aus einer Sensitivität gegenüber dem Elicitin ergibt.

Für das Pathogen selbst wurde lange über die Funktion des Elicitins spekuliert. Inzwischen konnte für das Elicitin Cryptogein nachgewiesen werden, dass es als Sterolcarrier dienen kann (MIKES et al. 1997).

1.4.3 Phenylpropanoide

1.4.3.1 Bedeutung

Phenylpropanoide sind eine wichtige Gruppe von Naturstoffen in Pflanzen. In einzelnen Arten können Dutzende verschiedener Phenylpropanoide vorkommen (FORKMANN und HELLER 1999). Über 4000 verschiedene Verbindungen dieses Stoffwechselbereichs waren schon im Jahre 1993 bekannt (HARBORNE 1993). Phenylpropanoide spielen in einer Reihe von biochemischen und physiologischen Prozessen eine Rolle. Sie sind für die Färbung von Blütenblättern verantwortlich (BROUILLARD und DANGLES 1993). Gleichzeitig sind sie auch wichtig für die Keimung und Fruchtbarkeit von Pollen und die Aktivierung von Nodulationsgenen von Rhizobien, die in Stickstofffixierungsprozessen bei Leguminose von Bedeutung sind (BOHM 1993). Sie sind an physiologischen Prozessen in der Zelle beteiligt und dienen als Signalmoleküle (WINK 1997). Für den Auxinstoffwechsel konnte eine Regulation durch Phenylpropanoide nachgewiesen werden (CHALLICE und WILLIAMS 1970). Zahlreiche Schutzfunktionen, wie die Abwehr von Mikroorganismen durch Phytoalexine (SMITH 1996) und der Schutz gegen ultraviolette Strahlung (SCHNITZLER et al. 1996; TEVINI 1993), machen diese Substanzen zu überlebenswichtigen Bestandteilen für die Pflanze.

In der Pathogenabwehr spielen Phenylpropanoide eine besonders bedeutende Rolle. Die Bildung von instabilen *o*-Chinonen aus Phenylpropanoiden mittels Polyphenoloxidasen bzw. Peroxidasen ermöglicht der Pflanze die Inaktivierung von Enzymen eindringender Pathogene und kann damit zur Schädigung oder zum Abtöten des Pathogens führen (ELSTNER et al. 1996; HUNTER 1975; NOVEROSKE et al. 1964a; RAA und OVEREEM 1968). Die Reaktion vom Phloridzin,

eines in großen Mengen im Apfel vorhandenen Phenylpropanoids, durch β -Glucosidase und Polyphenoloxidase ist bei RAA und OVEREEM (1968) dargestellt. Dass Phenylpropanoide einen Einfluss auf die Enzyme, die von Pathogenen synthetisiert werden, haben, wiesen REDDY und MAHADEVAN (1967) und SALUNKHE (1990) nach. Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Phenylpropanoidgehalt und der Abwehrreaktion des Apfels gegen den Erreger des Apfelschorfs, *Venturia inaequalis*, konnten MAYR (1995) und MAYR et al. (1997) nachweisen. Bei Blättern Vf-resistenter Sorten lag der Gehalt an präinfektionell vorhandenen Flavan 3-olen im Durchschnitt um das 6,5-fache höher als bei anfälligen Sorten. Durch die Hemmung des Schlüsselenzyms des Phenylpropanoidstoffwechsels, der Phenylalaninammoniumlyase (PAL), konnte im Feldversuch die Resistenz der Sorte `Sir Prize` gegenüber *Venturia inaequalis* gebrochen werden, was auf die fehlende Synthese von Flavan 3-olen zurückgeführt werden kann (MAYR et al. 1997; MICHALEK 1997). Der Gehalt an Substanzen aus der Klasse der Phenylpropanoide in Cacao korrelierte mit der Wachstumsinhibierung des Pathogens und verringerter Zoosporenkeimung von *Phytophthora palmivora* (OKEY et al. 1997). ALT und SCHMIDLE (1980) schlagen Phenylpropanoide als die Schlüsselsubstanzen in der Abwehr von Apfel gegen *Phytophthora cactorum* vor. Sie belegten, dass der Gehalt an Phloridzin in der Rinde der nicht anfälligen Sorte `Maunzen` um 45 % höher war als in der anfälligen Sorte `Cox Orange`. Desweiteren wiesen sie eine starke fungitoxische Wirkung des Phloridzins und seines Aglykons Phloretin gegen *Phytophthora cactorum* nach.

1.4.3.2 Stoffwechsel

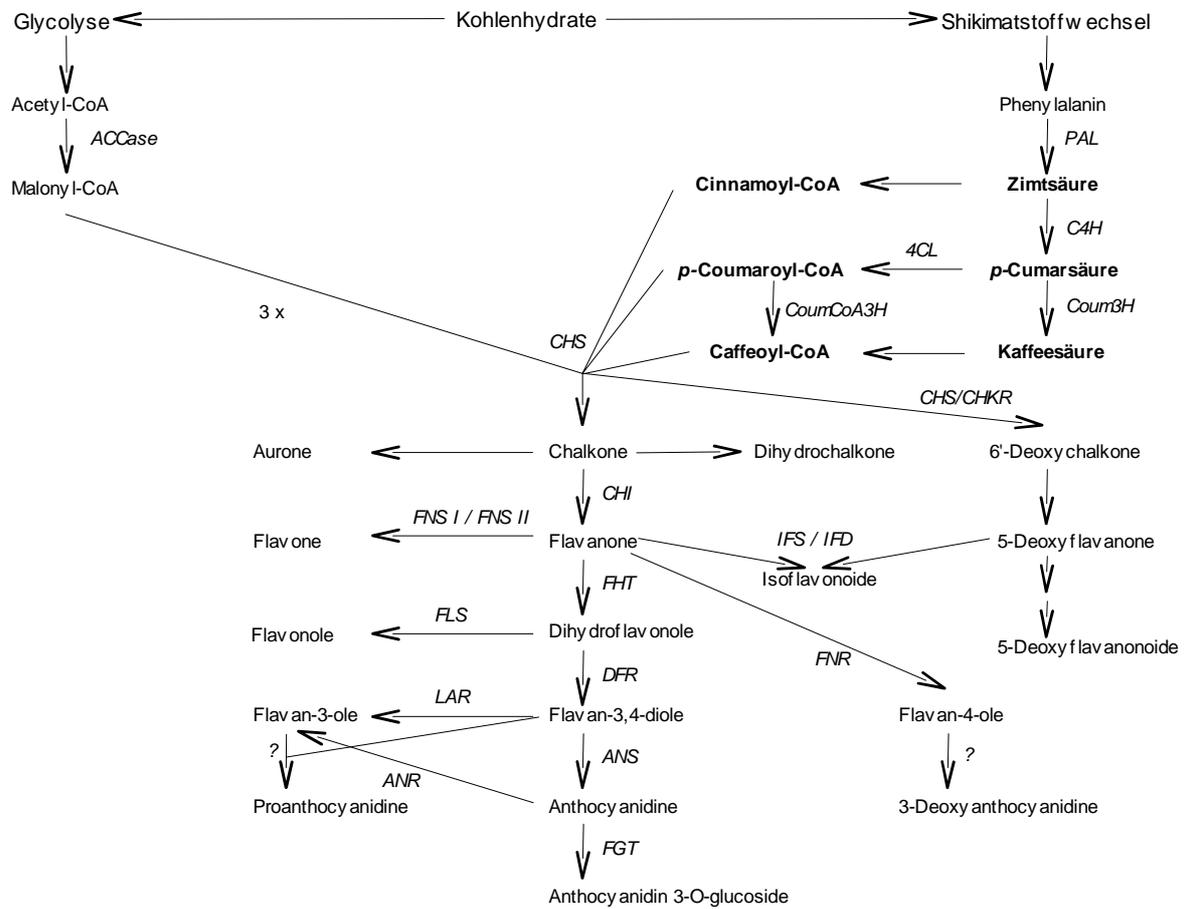
Um zu einer solchen Vielzahl unterschiedlicher Verbindungen zu gelangen, sind eine Reihe unterschiedlicher Stoffwechselprozesse notwendig. In Abbildung 2 ist der Phenylpropanoidstoffwechsel nach FORKMANN und HELLER (1999) in seiner allgemeinen Form dargestellt.

Die Ausgangssubstanzen des Phenylpropanoidmetabolismus gehen auf den Primärstoffwechsel zurück. Aus der Photosynthese stammende Kohlenhydrate werden über viele Stoffwechselschritte in der Glykolyse abgebaut. Erythrose 4-Phosphat und Phosphoenolpyruvat bilden die Ausgangssubstanzen für den Shikimatweg. Dabei stammt das Erythrose 4-Phosphat aus dem Pentosephosphat-Stoffwechsel. Das Phosphoenolpyruvat stellt ein Stoffwechselintermediat der Glykolyse dar, wohingegen das Acetyl-CoA (C₂-Körper) das Endprodukt der Glykolyse ist und zur Energiegewinnung vor allem im Zitronensäurezyklus verstoffwechselt wird.

Die Schlüsselreaktion bei der Phenylpropanoidbiosynthese ist der durch die Phenylalaninammoniumlyase (PAL) katalysierte Schritt von der Aminosäure Phenylalanin zur Zimtsäure (FORKMANN und HELLER 1999). Die Zimtsäure ist in der Abfolge der Biosynthese der erste stickstofffreie Phenylpropankörper (C₆C₃). Durch diese Reaktion trennt sich der Stoffwechsel der Phenylpropanoidabkömmlinge von der Biosynthese der Proteine, für die das Phenylalanin ein wichtiges Substrat darstellt.

Ausgehend von der Zimtsäure entstehen über Hydroxylierungen die *p*-Cumarsäure und die Kaffeesäure, welche ihrerseits neben den Vorstufen für die Biosynthese von Flavonoiden auch Ausgangssubstanzen der Biosynthese von Lignin sind.

Mit Hilfe des Enzyms Chalkonsynthase kommt es zur schrittweisen Kondensation von drei Molekülen Malonyl-CoA mit einem Hydroxyzimtsäure-CoA-Ester unter Bildung eines Chalkons (Abb. 2). Aus den selben Ausgangsstoffen können auch die 6'-Deoxychalkone und damit die 5-Deoxyflavonoide abgeleitet werden. Von den Chalkonen ausgehend besteht die Möglichkeit, dass sich entweder ein fünfgliedriger Heterocyclus C bildet und damit Aurone entstehen, oder dass mittels des Enzyms Chalkonisomerase ein sechsgliedriger Heterocyclus C gebildet wird.



- | | | | |
|------------|--------------------------------|------|-----------------------------------|
| PAL: | Phenylalaninammoniumlyase | FHT: | Flavanon 3-Hydroxylyase |
| C4H: | Cinnamate-4-Hydroxylyase | FLS: | Flavonolsynthase |
| 4CL: | 4-Coumarate-CoA-Ligase | DFR: | Dihydroflavonol 4-Reduktase |
| CoumCoA3H: | 4-Coumarate-CoA 3-Hydroxylyase | LAR: | Leucoanthocyanidin 4-Reduktase |
| Coum4H: | 4-Coumarate 3-Hydroxylyase | ANS: | Anthocyanidinsynthase |
| CHS: | Chalkonsynthase | ANR: | Anthocyanidinreduktase |
| ACCcase: | Acetyl-CoA Carboxylase | FGT: | Flavonoid 3-O-Glucosyltransferase |
| CHI: | Chalkonisomerase | IFS: | 2-Hydroxyisoflavonon Synthase |
| FNS I: | Flavon synthase I | IFD: | 2-Hydroxyisoflavonon Dehydratase |
| FNS II: | Flavon synthase II | FNR: | Flavanon 4-Reduktase |

Abb. 2: Allgemeiner Phenylpropanoidstoffwechsel mit beteiligten Enzymen; verändert nach FORKMANN und HELLER (1999) und XIE et al. (2004)

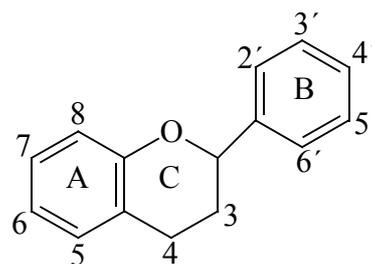


Abb. 3: Flavan-Grundgerüst

Damit entstehen die ersten echten Abkömmlinge des Flavans (Abb. 3), die Flavanone. Mittels der Flavonsynthesen I und II können aus den Flavanonen Flavone entstehen (Abb. 2). Zweite Möglichkeit stellt die Hydroxylierung des Heterocyclus C der Flavanone mittels der Flavanon 3-Hydroxylase dar. Dabei entstehen die Dihydroflavonole, die ihrerseits wiederum die Vorstufe von Flavonolen und Flavan 3,4-diolen sind. Die Flavan 3,4-diole sind Vorstufen der Flavan 3-ole und Proanthocyanidine. Gleichzeitig können von den Flavan 3,4-diolen Anthocyanidine und deren Glykoside abgeleitet werden. Der Stoffwechsel der 3-Deoxyanthocyanidine und ihrer Vorstufen Flavan 4-ole geht nach FORKMANN und HELLER (1999) auf die Flavanone zurück (Abb. 2).

1.4.3.3 Phenylpropanoide in der Rinde des Apfels

Die Phenylpropanoide in der Rinde des Apfels waren in der Vergangenheit aus zwei Gründen im Fokus der Forschung. Zum einen interessierte die Abwehr von Pathogenen durch Stoffwechselprodukte des Phenylpropanoidmetabolismus (ALT und SCHMIDLE 1980), zum anderen wurde im Rahmen von Untersuchungen zur Unverträglichkeit nach Veredlung der Phenylpropanoidmetabolismus untersucht (LOCKARD und SCHNEIDER 1981).

Das in Apfelblättern als wichtige Leitsubstanz identifizierte Phloridzin (BÖRNER 1961; WILLIAMS 1960) wurde auch in der Rinde von Apfel nachgewiesen. In Tabelle 1 sind die Gehalte an Phloridzin in der Rinde des Apfels dargestellt.

Tab. 1: Phloridzingehalt in der Rinde von Apfel

Phloridzingehalt in % TS	Genotyp	Quelle
12		Williams (1966)
9,5	M16	Martin und Williams (1967)
9,2	MM111	Lockard und Schneider (1982)
7,7	M26	Lockard und Schneider (1982)
8,5	`Maunzen`	Alt und Schmidle (1980)
5,8	`Cox Orange`	Alt und Schmidle (1980)

ALT und SCHMIDLE (1980) diskutieren den höheren Gehalt bei der gegen *Phytophthora cactorum* hochresistenten Sorte `Maunzen` als Ursache der Resistenz. Nach LOCKARD et al. (1982) stellt das Phloridzin etwa 90 % des Gesamtphenolgehalts in der Rinde der Unterlagen MM111 und M26. Besonders dem aus dem Phloridzin durch eine β -Glucosidase entstehenden

Aglykon Phloretin konnte eine fungizide Wirkung gegen *Phytophthora infestans* nachgewiesen werden (ALT und SCHMIDLE 1980; S. RÖMMELT persönliche Mitteilung), die aber in höheren Konzentrationen auch für das Phloridzin zu ermitteln waren. Die Wirkung beruht nach RAA und OVEREEM (1968) und HUNTER (1975) vor allem auf der Oxidation des Phloridzins zu Chinonen, die durch die Bildung von Melaninen für die Pathogenabwehr von besonderer Bedeutung sind (ELSTNER et al. 1996).

Die Flavonolglykoside Quercetin 3-arabinosid (Avicularin), Quercetin 3-rhamnosid (Quercitrin), Quercetin 3-gucosid (Isoquercitrin), Quercetin 3-galactosid (Hyperin) und Quercetin 3-xylosid (Reynoutrin) wurden erstmals von WILLIAMS (1960) in der Rinde nachgewiesen. Dieselben Glycoside sollen sich nach dieser Arbeit auch als Abkömmlinge des Aglykons Kämpferol in der Rinde des Apfels nachweisen lassen. Auch ALT und SCHMIDLE (1980) wiesen neben Quercetinglycosiden Kämpferolglycoside nach. Der Kämpferolnachweis wurde nach saurer Hydrolyse mittels Dünnschichtchromatographie erbracht. Die einzelnen Glycoside wurden von ALT und SCHMIDLE (1980) nicht unterschieden. Nach saurer Hydrolyse wurde auch das Aglykon des Phloridzins, das Phloretin identifiziert. Freies Phloretin in sehr geringen Konzentrationen wurde von LOCKARD et al. (1982) in der Apfelrinde nachgewiesen.

Nach saurer Hydrolyse wiesen LOCKARD et al. (1982) die phenolischen Säuren *p*-Hydroxybenzoesäure, Phloretinsäure, *p*-Cumarsäure, Kaffeesäure, Ferulasäure, Protocatechusäure und Chlorogensäure in der Apfelrinde nach. Für die Triebspitzen wurde diese Reihe an phenolischen Säuren von NACHIT und FEUCHT (1976) nach saurer Hydrolyse um Syringasäure, Vanillinsäure und Sinapinsäure erweitert. Andere Untersuchungen über phenolische Säuren der Rinde sind nicht vorhanden.

1.4.3.4 Einfluss von Ressourcenveränderungen auf den Phenylpropanoidstoffwechsel

Eine hohe Ressourcenverfügbarkeit stellt wie in allen Systemen eine wichtige Grundlage für Wachstum dar. Besonders im Pflanzenreich zeigen sich unterschiedliche Strategien, wie sich Pflanzen an die jeweils verfügbaren Ressourcen anpassen. COLEY et al. (1985) schlugen folgendes System für unterschiedliche Wachstums- und Verteidigungsverhalten von Pflanzen vor: Die natürliche Selektion bevorteilt Pflanzen mit langsamem Wachstum und einer hohen Investition in Abwehr in Umgebungen mit geringer Ressourcenverfügbarkeit und Pflanzen mit stärkerem Wachstum und einer geringeren Investition in Abwehr in Umgebungen mit hoher Ressourcenverfügbarkeit.

Als wichtigste Ressourcen für eine Pflanze sind neben den Nährstoffen aus dem Boden auch Wasser, Kohlendioxid und Licht zu betrachten. Die Sonnenenergie wird über Photosynthese zur Produktion von energiereichen Kohlenhydraten benötigt. Für diese Prozesse sind eine Vielzahl verschiedener Enzyme von Nöten, die aus Aminosäuren bestehen. Dies macht die herausragende Rolle des Nährelements Stickstoff deutlich.

Gleichzeitig sind besonders die Verteidigungsstrategien für das Überleben im Kampf gegen Pathogene und Herbivore von zentraler Bedeutung. Hier spielen die Substanzen des Phenylpropanoidstoffwechsels eine wichtige Rolle (WATERMAN und MOLE 1989; Kap. 1.7.1) Die Pflanze steht also in einem Spannungsfeld bei der Verwendung der Ressourcen für Wachstum oder Parasitenabwehr.

Über diese Verteilung der möglichen Investitionen in Wachstums- oder Abwehrprozesse, der sich die Pflanze stellen muss (MATYSSEK et al. 2002), wurden mehrere Theorien entwickelt.

Die „carbon/nutrient balance hypothesis“ (CNBH) (BRYANT et al. 1983) erklärt Veränderungen in den Konzentrationen von löslichen Kohlenhydraten und Sekundärmetaboliten als Antwort auf veränderte Verfügbarkeit von Ressourcen im Habitat. Nach dieser Hypothese würde eine bessere Verfügbarkeit von Kohlenstoff oder Licht bei sonstigen identischen Bedingungen zu einer erhöhten Photosynthese mit daraus folgender Akkumulation an Kohlenhydraten führen, die für Wachstumsprozesse nicht benötigt werden. Dieser Pool an Kohlenhydraten könnte somit für die Produktion von Sekundärmetaboliten, für die vor allem Kohlenstoffreserven von Nöten sind, verwendet werden. Im Gegensatz dazu würde eine Düngung mit wachstumslimitierenden Nährstoffen (z.B. Stickstoff) zu vermehrtem Wachstum führen und damit die Kohlenhydratreserven verringern, was zu einer Reduktion im Gehalt an Sekundärmetaboliten

führen würde (LAVOLA und JULKUNEN-TIITTO 1994). Eine erhöhte Kohlendioxidkonzentration müsste bei sonst gleichen Bedingungen nach der CNBH zu einem erhöhten Gehalt an Phenylpropanoiden führen.

In der „growth-differentiation balance hypothesis“ (GDBH) wurde die CNBH durch die Einbeziehung von Differenzierungsprozessen in Pflanzen erweitert (HERMS und MATTSON 1992). Diese Theorie geht davon aus, dass das Wachstum bei guten Ressourcenbedingungen über andere Differenzierungsprozesse dominiert. Erst bei suboptimalen Wachstumsbedingungen werden Differenzierungsprozesse wie die Bildung von Sekundärmetaboliten favorisiert. Im „protein competition model“ (PCM) nach JONES und HARTLEY (1999) wurde die direkte Konkurrenz um die limitierende Aminosäure Phenylalanin, die sowohl in der Proteinbiosynthese als auch für den Phenylpropanoidstoffwechsel als wichtige Ausgangssubstanz gilt (MARGNA 1977), als Regulationsstelle zwischen Wachstum und der Produktion von Phenylpropanoiden postuliert.

In zahlreichen Arbeiten ist der Einfluss von Ressourcenveränderungen auf den Phenylpropanoidstoffwechsel untersucht worden. Dabei bildeten vor allem Untersuchungen bei unterschiedlicher Kohlendioxid- und unterschiedlichen Stickstoffverfügbarkeit den Schwerpunkt. An Birke wiesen LAVOLA und JULKUNEN-TIITTO (1994) eine Abnahme an Proanthocyanidinen und Flavonoiden in Blättern nach erhöhter Versorgung mit Nährstoffen nach. Gleichzeitig führte eine Erhöhung der Kohlendioxidkonzentration zu einer Zunahme der Gehalte. Ihre Ergebnisse nach Kohlendioxidbehandlung konnten sie auch in einem Vergleich des Einflusses der Kohlendioxidbehandlung und UV-B Strahlung auf den Sekundärmetabolismus an Birke bestätigen (LAVOLA et al. 2000). Der Gehalt an Polyphenolen und kondensierten Tanninen in den Nadeln von *Pinus palustris* nahm nach Behandlung mit erhöhter Kohlendioxidkonzentration wie in mit wenig Stickstoff versorgten Pflanzen zu (PRITCHARD et al. 1997). Diese drei Arbeiten stützen mit ihren Ergebnissen die CNBH.

In Untersuchungen zum Einfluss der Stickstoffdüngung auf das Wachstum und den Phenolgehalt von Sämlingen von Birke stellten KESKI-SAARI und JULKUNEN-TIITTO (2003) eine Zunahme im Phenolgehalt mit sinkender Stickstoffdüngung in den ersten echten Blättern fest. Dagegen stieg die Trockenmasse mit steigender Stickstoffdüngung bei allen Pflanzenteilen außer den Wurzeln an. Einen höheren Gehalt an Phenylpropanoiden in Blättern von Weide (*Salix myrsinifolia*) konnte HAKULINEN (1998) in den Varianten zeigen, die mit wenig Stickstoff versorgt waren. Gleichzeitig wurde in dieser Arbeit kein Effekt durch die unterschiedlichen Phenylpropanoidgehalte auf die Pathogenese des Rostpilzes *Melampsora*

sp. festgestellt. An Fichte ist durch Stickstoffdüngung eine Reduktion der Gehalte an vier verschiedenen Terpenen nachgewiesen worden (MUZIKA et al. 1989). Bei Untersuchung der Phenolgehalte konnte auch für Fichte ein geringerer Phenolgehalt nach Stickstoffdüngung bei 4 von 5 unterschiedlichen Herkünften gefunden werden (MUZIKA und PREGITZER 1992). Auch für Buche ist dieser Stickstoffeffekt belegt (BALSBERG PAHLSSON 1992).

Im *in-vitro*-System konnte die CNBH bei Apfel bestätigt werden. Ein erhöhter Zuckergehalt des Nährmediums führte wie eine verringerte Konzentration an Makronährstoffen zu einem erhöhten Gehalt an phenolischen Inhaltsstoffen (LUX-ENDRICH et al. 2000). Auch Untersuchungen des Einflusses der Stickstoffernährung auf Veränderungen des Phenylpropanoidstoffwechsels nach Behandlung mit dem Wachstumsregulator Prohexadion-Ca (Regalis®) bestätigten, dass ganz allgemein beim *in-vitro*-Testsystem eine hohe Stickstoffversorgung die Konzentration an phenolischen Verbindungen reduzierte, wohingegen eine maßvolle Stickstoffernährung die Akkumulation von Flavonoiden begünstigte (RÜHMANN und TREUTTER 2003). Weiter konnten sie Verschiebungen im Phenylpropanoidmetabolismus durch Stickstoffdüngung feststellen, womit sie Theorien, die die Konkurrenz zwischen Wachstum und Sekundärstoffwechsel durch die Konkurrenz um Kohlenstoff erklären (HERMS and MATTSON 1992 (GDBH)), nicht unterstützen. Die Übertragbarkeit der Stickstoffeffekte aus dem *in-vitro*-System auf *in-vivo*-Bäume wurde ebenfalls von RÜHMANN et al. (2002) gezeigt. Der Gehalt an Phenylpropanoiden in jungen Blättern von Bäumen der Unterlage M9 korrelierte negativ mit der Stickstoffdüngung. Zusätzlich wurde eine negative Korrelation zwischen der Wachstumsrate junger Sprosse und dem Gehalt an Phenylpropanoiden an jungen Blättern der Sorten `Rewena` und `Golden Delicious` nachgewiesen. Dieses Ergebnis stützt die Bedeutung der Differenzierungsprozesse und damit die GDBH von HERMS und MATTSON (1992). Dass Phenylpropanoide für die Abwehr des Apfels gegen den Erreger des Apfelschorfs, *Venturia inaequalis*, verantwortlich sind, zeigte bereits MAYR et al. (1997). Durch die Arbeit von RÜHMANN et al. (2002) konnte auch der Zusammenhang zwischen der Stickstoffdüngung, dem Gehalt an Phenylpropanoiden und der veränderten Anfälligkeit gegenüber *Venturia inaequalis* nachgewiesen werden.

1.5 Ziele der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Interaktionen der Wirt-Parasit-Beziehung zwischen dem Apfel, *Malus domestica* Borkh., und dem Erreger von Rindenfäule, *Phytophthora cactorum* (Lebert & Cohn) Schröter, unter veränderten Ressourcenbedingungen zu untersuchen.

Externe Ressourcenveränderungen können einen Einfluss auf die pflanzeninterne Allokation der zur Verfügung stehenden Metabolite zwischen Wachstums- und Abwehrprozessen ausüben. Deshalb wurde der Phenylpropanoidmetabolismus unter verschiedenen externen Ressourcenverfügbarkeiten und jeweils nach Infektion mit *Phytophthora cactorum* untersucht.

Als Ressourcenvariablen wurde neben dem das Wachstum von Apfelbäumen stark beeinflussenden Hauptnährstoff Stickstoff auch unterschiedliche Konzentrationen von Kohlendioxid verwendet.

Außerdem sollte die Interaktion des vom Pathogen abgegebenen Elicitins Cactorein mit dem Phenylpropanoidstoffwechsel der Apfelrinde untersucht werden.

Die Aktivierung von PR-Proteinen spielt in der Abwehr vieler Pathogene eine wichtige Rolle. Deshalb sollte die Frage beantwortet werden, ob eine Aktivierung der PR-Proteine Chitinasen und β -1,3-Glucanasen in der Abwehr gegen *Phytophthora cactorum* in der Rinde von Bedeutung sind.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalienliste

Substanz	Firma
6-Methoxyflavon	Extrasynthese
Aceton	Merck
Agar	Roth
Agarose	Biozym
Ameisensäure	Merck
Ammoniak	Merck
Avicularin	Roth
Bovines Rinderserumalbumin(BSA)	Sigma
Butanol	Merck
Calciumcarbonat, gefällt	Merck
Calciumchlorid-Dihydrat	Roth
Carboxymethyl-Chitin-Remazol Brilliant Violett	LOEWE Biotech
Catechin	Roth
Chlorogensäure	Roth
Coomassie Brilliant Blue Färbereagenz G250	Merck
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck
dNTPs	Roth
Eisensulfat-Heptahydrat	Merck
Eisessig	Merck
Epicatechin	Roth
Eriodictyol	Roth
Eriodictyol 7-glucosid	Roth
Ethanol	Merck
Ethidium-bromid	Merck
Gemüsesaft	Albi
Glucose	Merck
Hyperin	Roth
Isoquercitrin	Roth

Substanz	Firma
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kämpferol	Roth
Kieselgel-Dünnschichtchromatographieplatten	Merck
Kupfersulfat-Pentahydrat	Merck
L-Asparagin	Sigma
Laminarin	Sigma
Magnesiumchlorid	Merck
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Sigma
Manganchlorid-Tetrahydrat	Merck
Methanol gradient grade	Merck
Methanol p.a.	Merck
Naringenin	Roth
Naringenin 7-glucosid	Roth
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriummolybdat-Dihydrat	Merck
Natronlauge	Merck
Natustoffreagenz A	Roth
p-Cumarsäure	Roth
p-Dimethylaminozimtaldehyd	Merck
p-Hydroxybenzoesäurehydrazin	Sigma
Phloretin	Roth
Phloridzin	Roth
Polyethylenglycol	Roth
Polyvinylpolypyrrolidon	Fluka
Quercetin	Roth
Quercitrin	Roth
Quiagen DNeasy Plant Mini Kit	Qiagen
Rutin	Roth
Salzsäure	Merck
Sephadex G50	Amersham Bioscience
Taq-Polymerase (Hot Star)	Qiagen

Substanz	Firma
Thiamindichlorid	Sigma
Toluol	Merck
Zinksulfat-Heptahydrat	Merck

2.2 Geräte und Laborartikel

Artikel oder Gerät	Firma
Autoklav	Webeca
Cellulose DC-Platten	Machery-Nagel
Dialyseschlauch; MWCO 4-6kDa; Zellulose	Roth
Elektrophoreseapparatur	Pharmacia
Fraktionensammler	Pharmacia
gekühltes Ultraschallwasserbad	Bandelin-Elektronik (Ultraschall), mgw-Landa (Kühlung)
Hamiltonspritze	Hamilton
Inhaliergerät	Mondial
Korkbohrer	
Kugelmühle	Retsch
Lyophile P10K-L	Piatkowski Forschungsgeräte
Mikrotiterplatten (96-Well Assay Plates)	Costar
Mikrotiterplatten-Photometer	Titertek Plus NT 212 ICN
pH-Meter	Orion
Säule für Gelfiltration (150 cm)	Zefa
Schüttler	Wilten
Sterilfilter	Sartorius
Thermocycler T-Gradient	Biometra
UV-Lampe	CAMAC
Vakuumzentrifuge	Uniequip Laborgeräte
Verbandsmaterial: Binden, Wundauflagen	Hartmann
Zentrifuge Mikr 22 R	Hettich

2.3 Pilzmedien

2.3.1 V8-Medium

nach ERWIN und RIBEIRO (1996):

200 ml	Gemüsesaft
2 g	CaCO ₃ , gefällt
16 g	Agar
pH ca.	6,2
ad	1 l H ₂ O _{dest} , bei 120°C und 1,2 atü 20 Minuten autoklavieren.

2.3.2 Synthetisches MK- Medium für *Phytophthora cactorum*

modifiziert nach KOEHL (2002):

Glucose	10	g (30 g nach KOEHL)
L-Asparagin	0,2	g (2,0 g nach KOEHL)
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	1,0	mg (10 mg in 10 ml H ₂ O lösen, davon 1 ml/l)
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	10,0	mg
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0,1	mg (10 mg in 10 ml H ₂ O lösen, davon 100 µl/l)
KH ₂ PO ₄	0,47	g
K ₂ HPO ₄	0,26	g
Thiamindichlorid	1,0	mg (Thiaminhydrochlorid nach KOEHL)
ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	1,0	mg (10 mg in 10 ml H ₂ O lösen, davon 1 ml/l)
CuSO ₄ * 5 H ₂ O	0,02	mg (4 mg in 100 ml H ₂ O lösen, davon 0,5 ml/l)
Na ₂ MoO ₄ * 2 H ₂ O	0,02	mg (4 mg in 100 ml H ₂ O lösen, davon 0,5 ml/l)
MnCl ₂ * 4 H ₂ O	0,02	mg (4 mg in 100 ml H ₂ O lösen, davon 0,5 ml/l)
		(nach KOEHL MnCl ₄ * 4 H ₂ O)
		ad 1 l H ₂ O _{dest}
pH ca.	6,2	

Die Glucose wurde in autoklaviertem Wasser gelöst und nach Sterilfiltration zum autoklavierten Medium gegeben.

Für M1-Agarplatten wurden 16 g Agar hinzugefügt und die Glucoselösung vor dem Gießen steril dem Medium beigegeben.

2.4 Isolierung und Identifizierung eines *Phytophthora cactorum*-Stammes

Isolierung

Rindenstückchen aus befallenen Stammteilen wurden auf PARPNH-Agar (TSAO und GUY 1977), ein Selektivmedium für die Gattung *Phytophthora*, gesetzt. Dieses Medium enthält einige Antibiotika und Fungizide. Arten der Gattung *Pythium* können auf dem Selektivmedium wachsen, werden aber durch den Wirkstoff Hymexazol, ein Fungizid der Oxazolklasse, weitgehend unterdrückt. Nach jeweils 3 Tagen wurden die Isolate 3-mal auf das Selektivmedium umgesetzt, bevor sie auf V8-Medium erhalten wurden.

Identifizierung

Die Wuchsstruktur des Myzels wurde mit den Wachstumsbildern und -daten von ERWIN und RIBEIRO (1996) verglichen. Zusätzlich war zur Identifikation die typische Größe und Form der Sporangien von *Phytophthora cactorum* ausschlaggebend. Diese mikroskopischen Untersuchungen konnten durch molekularbiologische Analysen mittels der Polymerase-Kettenreaktion mit für *Phytophthora cactorum* und *Phytophthora citricola* spezifischen Primern von Dr. Frank Fleischmann, Fachgebiet für Krankheiten der Waldbäume - Phytopathologie, überprüft werden.

Die DNA wurde mittels des Qiagen DNeasy Plant Mini Kit direkt aus der Agarkultur nach dem Protokoll des Herstellers extrahiert.

Die PCR wurde in einem Volumen von 25 µl angesetzt, wobei folgende Zusammensetzung zu Grunde gelegt wurde: TaqPolymerase 1,25 U; mitgelieferter Puffer der TaqPolymerase; 1,5 mM MgCl₂; 1 mg/ml BSA; je 100 µM dNTP; je 0,2 µl Primer (forward, reverse).

Die verwendeten Primer waren für *Phytophthora cactorum*:

Pcac Forward 5'-TAC TGT GGG GAC GAA AGT CCT-3'

Pcac Reverse 5'-CCG ATT CAA AAG CCA AGC AAC T-3'

Für *Phytophthora citricola* (SCHUBERT et al. 1999):

Pcit Forward (Citr1) 5'-TCT TGC TTT TTT TGC GAG CC-3'

Pcit Reverse (Citr2) 5'-TTT GTG TGC ACC TCG GTG CG-3'

Bedingungen für die PCR (Thermocycler Protokoll):

15 min Hot-Start bei 95°C

30 sec Annealing bei 60°C für *Phytophthora cactorum*-Primer;

bei 62°C für *Phytophthora citricola*-Primer

60 sec Extension bei 72°C

30 sec Denaturierung bei 94°C.

Insgesamt wurden 35 Zyklen für die PCR vorgenommen.

Zum PCR-Abschluss wurden zur Endelongation 5 min bei 72°C gehalten.

Nach Färbung mit Ethidium-Bromid wurde das PCR-Resultat auf ein 1 %-iges Agarosegel aufgetragen und nach gelelektrophoretischer Auftrennung im UV-Licht (366 nm) fotografiert.

2.5 Verwendete *Phytophthora*-Isolate

Zur Inokulation der Versuchspflanzen wurden 4 unterschiedliche Isolate der Gattung *Phytophthora* verwendet.

Tab. 2: Verwendete Pilzstämmen

Stamm	Art	Herkunft
Iso 2	<i>P. cactorum</i>	Südtirol, eigenes Isolat von <i>Malus domestica</i> 'Topaz', Südtirol
62644	<i>P. cactorum</i>	BBA Berlin, Isolat von Äpfeln von <i>Malus sylvestris</i> , Deutschland
64197	<i>P. cactorum</i>	BBA Berlin, Isolat <i>Malus domestica</i> , Portugal
Pt 8	Fälschlicherweise als <i>P. cactorum</i> bezeichnet, im Rahmen der Arbeit als <i>P. citricola</i> identifiziert (siehe 3.1)	BBA Dossenheim

2.6 Reinigung und Nachweis des Elicitins Cactorein

Von Pilzen der Gattung *Phytophthora* ist bekannt, dass sie an ihr Medium Elicitine abgeben. Zur Reinigung des Cactoreins wurde der *Phytophthora cactorum*-Stamm Iso 2 im MK-Flüssigmedium gezogen. Nach KOEHL (2002) ist die Elicitinausbeute bei *Phytophthora infestans* bis zum 8. Wachstumstag zunehmend. Die Kulturdauer von 8 Tagen wurde übernommen. 10 Erlenmeyerkolben mit 75 ml Nährmedium (Ausgangsvolumen insgesamt 750 ml) wurden jeweils mit 6 einzelnen Pilzkolonien auf Agar (1 cm x 1 cm) beimpft.

Das Medium wurde über eine Nitrocellulosemembran mit einer Porengröße von 0,2 µm abfiltriert, lyophilisiert und in einem Zehntel des Ausgangsvolumens aufgenommen. Anschließend wurde gegen 20 mM Phosphatpuffer über Nacht (ca. 15 h) bei 8°C dialysiert. Für die Dialyse wurde ein Dialyseschlauch mit einem molekularen Ausschlussgewicht von 4 bis 6 kDa aus Cellulose verwendet. Das Dialysat wurde erneut lyophilisiert und in 1/100 des Ausgangsvolumens aufgenommen.

Zur weiteren Reinigung wurde eine Gelfiltration mit Sephadex G50 auf einer 150 cm langen Säule mit 50 mM NaCl-Lösung und einer Flussrate von 1 ml/min vorgenommen. Das Eluat wurde in 5-ml-Fractionen aufgefangen und bei 210, 254 und 280 nm photometrisch kontrolliert. Die Säule wurde zuvor mit Proteinen unterschiedlicher Molekulargewichte geeicht.

Bei ca. 9 kDa zeigt sich ein Peak bei 210 nm, der nach CAPASSO et al. (1999) dem Elicitin entspricht. Die Fractionen des Peaks wurden gepoolt und lyophilisiert, danach in Wasser aufgenommen und gegen Wasser erneut 2-mal 15 h bei 8°C dialysiert. Nach einem erneuten Einengungsschritt wurde die Probe in 4 ml Wasser aufgenommen und für den Nachweis in Tabak (Kap. 3.3.3.1) und die Versuche in der Apfelrinde verwendet (Kap. 3.3.3.2 und 3.3.3.3).

2.7 Pflanzenmaterial und Pflanzenernährung

2.7.1 Sorten und Unterlagen

Für die Untersuchungen wurden die Sorten `Rewena`, `Golden Delicious` und `Topaz` sowie die Apfelunterlagen M9 und MM106 verwendet. Den Wurzelstock für die Genotypen `Rewena`, `Golden Delicious` und `Topaz` bildete die Unterlage M9.

Die Bäume wurden nach dem Kulturschema in folgender Tabelle kultiviert.

Tab. 3: Kulturschema der Versuchsbäume

Genotyp	Verdelung/ Okulation	Topfvolumen	Umgetopft	Neues Topfvolumen	Verwendet für Versuch beschrieben unter:
`Rewena`	Okulation Sommer 1997	18 l-Container	-	-	3.2 ; 3.3.1.3 ; 3.3.3.1 ; 3.5 ; 3.6
`Golden Delicious`	Okulation Sommer 1997	18 l-Container	-	-	3.2 ; 3.3.1.3 ; 3.3.3.1 ; 3.5 ; 3.6
M9	Wurzelecht	4,2 l-Container	06.2001	20 l-Container	3.2 ; 3.3.1.3 ; 3.3.2 ; 3.3.4
MM106	Wurzelecht	1,5 l-Container	Winter 1998/1999	4,2 l-Container	3.2 ; 3.3.1.1 ; 3.3.3.2
`Topaz`	Kopulation Winter 2000/2001	1,1 l-Container	Winter 2001/2002	4,2 l-Container	3.2 ; 3.3.1.2 ; 3.3.7.2 ; 3.3.7.3

2.7.2 Stickstoffstufen und Kultursubstrat

Zur Untersuchung des Stickstoffeinflusses wurden die Pflanzen der Genotypen `Rewena`, `Golden Delicious` und M9 während der gesamten Wachstumsdauer mit 3 unterschiedlichen Stickstoffniveaus versorgt. Dabei entspricht die Stickstoffstufe N1 einer moderaten Versorgung, N2 einer im Anbau zur Zeit praxisüblichen und N3 einer luxuriösen Versorgung mit Stickstoff. Nach einer einmaligen und einheitlichen Volldungergabe wurden die Stickstoffstufen über 6-malige Kalkammonsalpetergaben eingestellt. Die Stickstoffgaben pro Baum

beliefen sich pro Jahr auf 3,6 g (N1), 8,2 g (N2) und 13,0 g (N3) bei den Genotypen `Rewena` und `Golden Delicious`.

Bei den 1-jährigen Abrissen des Genotyps M9 wurden die drei unterschiedlichen N-Stufen mit 1,2 g N/Baum (N1), 5,1 g N/Baum (N2) und 9,1 g N/Baum (N3) eingestellt.

Zu Beginn der Vegetationszeit wurde die Versorgung mit Spurenelementen über einmal jährliche Gaben von Radigen (0,1 g/l Substrat), Eisenchelat (0,15 g/l Substrat) und Na-Molybdat (0,03 g/l Substrat) sichergestellt. Zusätzlich wurde zur Verbesserung der Calciumversorgung mit 2 g Branntkalk/l Substrat pro Jahr gedüngt.

Bei 2000 Bäumen pro ha entsprechen die Stickstoffstufen N1 etwa 60 kg N/ha, N2 etwa 120 kg N/ha und N3 etwa 200 kg N/ha .

Die Pflanzen der Genotypen `Topaz` und MM106 wurden mit Wuxal-Flüssigdünger versorgt. Bei diesen Genotypen wurde nicht mit unterschiedlichen Stickstoffdüngegaben gearbeitet. Hier entsprach die Düngung der Düngestufe N2.

Ausschließlich für den Versuch zur Resistenzveränderung durch das gereinigte Kulturfiltrat von *Phytophthora cactorum* (Kap. 3.3.3.3) wurden Bäume des Genotyps `Topaz` über 2 Jahre vor Versuchsanstellung wie oben für `Rewena` und `Golden Delicious` beschrieben mit unterschiedlichen Stickstoffgaben versorgt.

Als Kultursubstrat diente eine strukturstabile Nullerde der Firma Palzer (Sinntal-Jossa) mit folgender Zusammensetzung:

- 40 % (Vol) grobfasriger Weißtorf
- 30 % (Vol) Blähton
- 30 % (Vol) granulierter Ton
- pH-Wert zwischen 4 und 5

2.8 Inokulationsmethodik

Als Inokulationsverfahren diente die Korkbohrermethode in Anlehnung an ALT und SCHMIDLE (1980), KÖRBER und KARNATZ (1979) und SEWELL und WILSON (1973).

Die Inokulation wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

- Pflanzen mit 70 %-igem Ethanol am Stamm desinfizieren
- mit sterilem Korkbohrer Loch in die Rinde stanzen (Korkbohrerdurchmesser 6 mm)
- Rindenpartie entfernen

- Pilz auf Agar (vorher ausgestanzt) in Wunde geben
- Wunde steril mit Mull verbinden
- mit sterilem Wasser anfeuchten
- mit Frischhaltefolie und Alufolie umwickeln

2.9 Elicitinbehandlung

Die Wunden wurden wie bei der Inokulationsmethodik (Kap. 2.8) beschrieben vorbereitet. Anstatt des Agarplättchens mit dem Pilz wurde ein steriles mit dem gereinigten und konzentrierten Kulturfiltrat (Kap. 2.6) getränktes Filterpapier eingesetzt. Die vorher ausgestanzten Filterpapierstücke nehmen ein Volumen von 25 µl Flüssigkeit auf. Zur Kontrolle dienten hierbei Wunden, die mit in sterilem Wasser getränktem Filterpapierstücken behandelt wurden und unbehandelte Kontrollwunden.

2.10 Probenvorbereitung der analysierten Rindenzonen

Die Stammstücke wurden bei -20°C tiefgefroren, anschließend lyophilisiert und bis zur Probenaufarbeitung im Exsikkator gelagert. Das Stammperiderm, botanisch die äußere Epidermis der Rinde oder Borke, um die Wunden wurde mit einem Skalpell abgekratzt und verworfen. Durch das geringe Alter der Bäume war noch keine Ausbildung von mehrschichtigem sekundärem Abschlussgewebe bestehend aus Phelloderm, Phellogen und Phellem feststellbar (Abb. 5). Für die Analysen des Rindenbereichs zwischen dem Stammperiderm und dem Holzkörper wurde zwischen den unterschiedlichen Geweben primäre Rinde, sekundärer Bast, bestehend aus Hart-, Weichbast und Kambium nicht weiter differenziert.

Dieser in der weiteren Arbeit als Phloemkambialschicht (entspricht der analysierten Rindenschicht in Abb. 5) bezeichnete Bereich um die Wunden wurde in Reaktions- und Umgebungszone getrennt und vom Holz mit einem Skalpell abgeschabt (Abb.4).

Das Probenmaterial wurde mit der Kugelmühle zu einem feinen Pulver verarbeitet und diente für die Analysen von Phenylpropanoiden und PR-Proteinen.

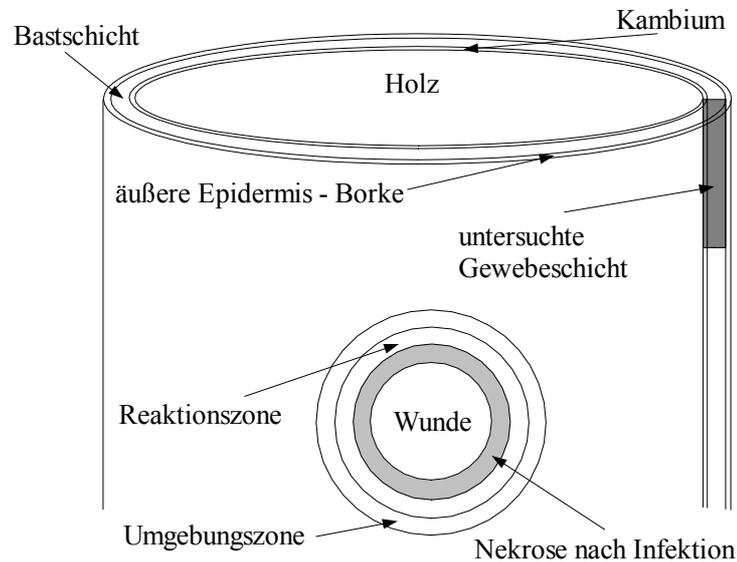


Abb. 4: Schematische Darstellung eines Apfelbaumstammes mit Lokalisation der untersuchten Gewebepartien

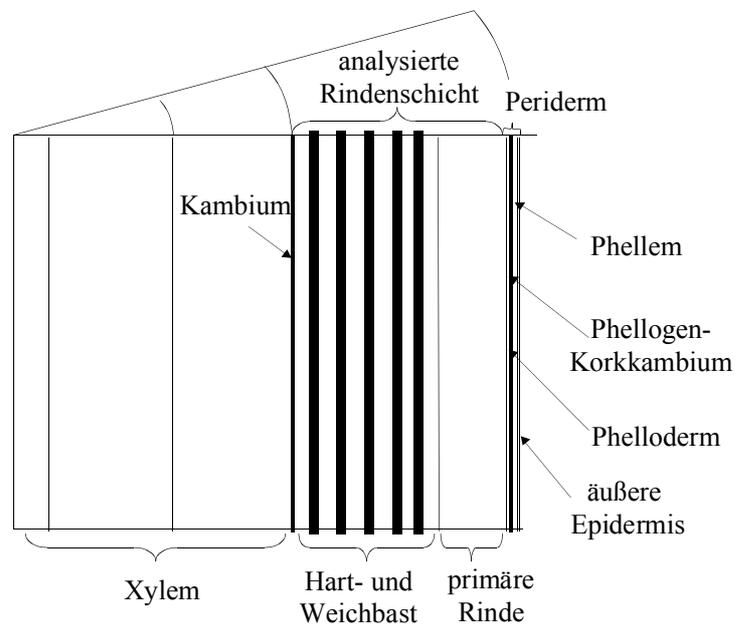


Abb. 5: Unterschiedliche Gewebe der Rinde im Längsschnitt (schematische Darstellung)

2.11 Analyse von Phenylpropanoiden

2.11.1 Extraktion

Das Probenpulver wurde nach dem Mahlen gewogen und in 1,5 ml Eppendorfgeläße überführt. Zur Extraktion diente Methanol, dem zuvor in einer Konzentration von 0,1 mg/ml der interne Standard 6-Methoxyflavon zugegeben wurde, in einem Verhältnis von 10 µl pro Milligramm Trockensubstanz Rindenprobe. Nach intensivem Schütteln wurden die Proben für 30 min im auf etwa 7°C gekühlten Ultraschallwasserbad extrahiert. Die nach Ultrazentrifugation bei -10°C und 10000 U/min vom Pellet mit einer Hamiltonspritze abgezogenen Extrakte wurden vor der HPLC-Analyse nochmals zentrifugiert, um etwaige Schwebeteilchen zu eliminieren.

Eine Lagerung der Extrakte ist bei -20 °C möglich. Aufgrund geringfügiger Veränderungen bei Lagerung über 2 Wochen wurden Proben maximal für eine Woche vorbereitet.

2.11.2 HPLC-Analytik (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)

Die Analyse der Phenylpropanoide wurde mit Hilfe der HPLC-Technik vorgenommen. Dabei wird die Summe aller löslichen phenolischen Inhaltsstoffe gemäß unterschiedlicher chemischer Eigenschaften (Molekulargewicht, Anzahl der funktionellen Gruppen, Löslichkeit in hydrophilen bzw. hydrophoben Lösungsmitteln) getrennt.

Weil es bei der Analyse von Catechinen und Proanthocyanidinen aus phenolreichen Rohextrakten häufig zu Überlagerungen der Flavanole mit Hydroxyzimtsäuren kommt, ist eine Bestimmung durch UV-Detektion bei 280 nm nur begrenzt möglich (TREUTTER 1991). Durch die Nachsäulenderivatisierung mit dem selektiven Reagenz *p*-Dimethylaminozimaldehyd (DMAZA) nach TREUTTER (1989, 1991) können auch die Flavanole in phenolreichen Rohextrakten selektiv und empfindlich detektiert werden. Die Nachweisgrenze von Catechin liegt bei dem hier verwendeten System zwischen 0,5 und 1 ng/ml. Zur Charakterisierung der Nachweisgrenze dient das Verhältnis zwischen Peakfläche und der Peakfläche des Rauschens und das Verhältnis zwischen Peakhöhe und der Peakhöhe des Rauschens. Als Grenzwert wird der Wert 3 beim Verhältnis von Peakhöhe zur Peakhöhe des Rauschens betrachtet.

HPLC-Ausrüstung

- Probengeber : Gilson-Abimed Modell 231
- Pumpen: Kontron Modell 422
Gynkotec Modell 300C (für Nachsäulenderivatisierung)
- Detektor I: Diodenarray-Detektor, Bio Tek Kontron 540+ (DAD)
für den Wellenlängenbereich von 200 nm – 600 nm
- Datenverarbeitung: Kroma System 2000
- Säule: 250 mm x 4 mm; gefüllt mit Shandon ODS Hypersil mit einer
Partikelgröße von 3 µm
- Säulentemperatur: Raumtemperatur
- Lösungsmittel: A: 5%-ige Ameisensäure
B: MeOH gradient grade
- Nachsäulenderivatisierung (NSD):
gestrickte PTFE-Kapillare, Länge 10 m, Innendurchmesser
0,5 mm
- Reagenz zur NSD: 1% DMAZA in MeOH und H₂SO₄ (konz. 95 - 97 %);
(Mischungsverhältnis 11:1)
- Detektor II: Kontron Detektor 432, eingestellt auf die feste
Wellenlänge 640 nm

Nach einer Reaktionszeit von 3 min können die mit DMAZA entstandenen Komplexe bei 640 nm quantitativ erfasst werden.

In Tabelle 4 und 5 ist der Analysenlauf mit seinen Parametern charakterisiert.

Tab. 4: Charakterisierung des HPLC-Analysenlaufs

Flußrate	0,5 ml/min
Analysendauer DAD	195 min
Analysendauer Detektor II nach NSD (640nm)	160 min
Analysendauer + Regeneration der Säule	235 min

Tab. 5: Methanol-Ameisensäure-Gradient für HPLC-Analytik

Verwendeter Gradient		
Zeit (min)	% B in A	
0 - 5	5	isokratisch
5 - 10	5 - 10	
10 - 15	10	isokratisch
15 - 35	10 - 15	
35 - 55	15	isokratisch
55 - 70	15 - 20	
70 - 80	20	isokratisch
80 - 95	20 - 25	
95 - 125	25 - 30	
125 - 145	30 - 40	
145 - 160	40 - 50	
160 - 175	50 - 90	
175 - 195	90	isokratisch
Regeneration: 195 - 210	90 - 5	
Äquilibrierung: 210 - 235	5	isokratisch

Berechnungsformel

$$\text{Gehalt}(i) = \frac{RF(i) * A(i)}{RF(iS) * A(iS)} * MF * \text{Konz}(iS)$$

Gehalt (i) = Gehalt der Einzelsubstanz in der
Trockensubstanz der Probe

RF (i) = Responsefaktor des Einzelpeaks (mg/A)

A (i) = Peakfläche des Einzelpeaks

MF = Multiplikationsfaktor, der Konzentration auf
1 g Trockensubstanz bezieht

Konz (iS) = Konzentration des internen
Standards

RF (iS) = Responsefaktor des internen Standards

A (iS) = Peakfläche des internen Standards

Als interner Standard wurde 6-Methoxyflavon in einer Konzentration von 0,1 mg/ml verwendet.

Die Berechnungsformel beinhaltet drei Verrechnungsschritte. Zum einen wird die Peakfläche über den Responsefaktor in Masse umgerechnet, zum zweiten findet eine Angleichung an eine feste Bezugsgröße statt (hier 1 g TS) und zum dritten wird die Gehaltsveränderung, die durch die nicht erschöpfende Extraktion entsteht, über den internen Standard ausgeglichen.

Responsefaktoren

Zur Bestimmung der Responsefaktoren wurden definierte Konzentrationen von Substanzen im HPLC-System analysiert. Die injizierte Konzentration an Reinsubstanz wurde mit der Fläche des Peaks ins Verhältnis gesetzt und es ergaben sich die in Tabelle 6 dargestellten Responsefaktoren.

Die verwendeten Responsefaktoren für die Procyanidine (in der Tabelle mit * markiert) wurden über den Responsefaktor von Epicatechin aus den Responsefaktoren für die Procyanidine nach M_{AYR} (1995) berechnet.

Tab. 6: Responsefaktoren zur Gehaltsbestimmung

Substanz	RF (mg/A)
<i>p</i> -Cumarsäure	$5,95 \times 10^{-6}$
Chlorogensäure	$2,3 \times 10^{-5}$
Eriodictyol 7-glucosid	$1,4 \times 10^{-5}$
Naringenin 7-gucosid	$1,3 \times 10^{-5}$
Rutin	$3,6 \times 10^{-5}$
Quercitrin	$3,4 \times 10^{-5}$
Avicularin	$2,5 \times 10^{-5}$
Phloridzin	$1,8 \times 10^{-5}$
Phloretin	$2,3 \times 10^{-5}$
Acylierte Flavonoide	Berechnet mit RF von Chlorogensäure
Catechin	$2,1 \times 10^{-5}$
Epicatechin	$1,4 \times 10^{-5}$
Procyanidine B1, B2, B5 *	$4,3 \times 10^{-5} *$
Procyanidine C1, E-B5 *	$9,1 \times 10^{-5} *$
6-Methoxyflavon	$7,4 \times 10^{-6}$

Zur Berechnung des Gehalts an Flavonolen wurde die Summe aus allen Substanzen im Retentionszeitbereich von 110 min bis zum Quercitrin bei 140 min mit charakteristischen Flavonolspektren (Abb. 9, Nr. 13 bis 16) und einem Maximum zwischen 345 nm und 355 nm zusammengefasst. Bei Avicularin und Quercitrin wurde der Gehalt mit den jeweiligen Responsefaktoren, sonst mit dem Responsefaktor von Rutin berechnet.

Die als unbekannt definierten Proanthocyanidine (Kap. 3.2.1) wurden mit dem Responsefaktor von Epicatechin berechnet.

2.11.3 Identifizierung

Um eine Substanz zu identifizieren muss eine Kombination verschiedener Methoden angewandt werden. Dabei genügt es nicht, dass die Substanz einer Probe mittels nur einer Methode zugeordnet wird. Erst die Übereinstimmung der Ergebnisse der folgenden Methoden lässt eine hinreichende Identifizierung einer Substanz zu.

2.11.3.1 Vergleich der UV-Spektren

Die mit dem Diodenarray-Detektor aufgenommenen Absorptionsspektren von Substanzen einer Probe lassen sich mit Spektren von einzelnen Reinsubstanzen vergleichen und geben Aufschluss über die mögliche Struktur einer Substanz (MABRY et al. 1970). Es lässt sich anhand der Spektren eine Gruppierung in Substanzklassen vornehmen, die durch die Ergebnisse der DC bestätigt werden müssen. So lassen sich die Monohydroxyzimtsäuren (z.B. *p*-Cumarsäure mit einem Maximum von 309 nm) von den Dihydroxyzimtsäuren (Chlorogensäure 325 nm; Kaffeesäure 322 nm) anhand ihrer unterschiedlichen Maxima unterscheiden und in zwei Gruppen auftrennen, soweit die Substanzen nicht durch Glycosidierung maskiert sind. Die charakteristischen Absorptionsspektren von Flavanolen (Maxima bei 278 nm) und Flavonolen (um 350nm) machen weitere Zuordnungen möglich.

2.11.3.2 Co-Chromatographie

Proben wurden mit einzelnen Reinsubstanzen in bestimmten Konzentrationen gemischt und über HPLC-Analyse ausgewertet. Bei Übereinstimmung des chromatographischen Verhalten kommt es zu einer Vergrößerung des zu identifizierenden Peaks. Diese Identifizierungsmethode allein gilt als nicht hinreichend für die Identifizierung einer Substanz, ist aber ein sehr wichtiges Indiz zur Bestimmung, vor allem wenn sich bei der Co-Chromatographie ein klares UV-Spektrum ergibt. Bei einer Überlagerung zweier unterschiedlicherer Substanzen ergeben sich „unsaubere“ Spektren. Diese Überlagerung zweier Substanzen ist bei TEUTTER (1991) beschrieben.

2.11.3.3 Dünnschichtchromatographie (DC)

Nach Trennung mittels HPLC wurden die Fraktionen eingengt (Vakuumzentrifuge) und, in Methanol aufgenommen, auf Cellulose DC-Platten (Machery-Nagel) aufgetragen. Die Platten wurden im Laufmittel BAW (Butanol : Eisessig : dest. Wasser im Verhältnis 4 : 1 : 2,2; v:v:v) entwickelt. Zur Bestimmung der Flavanone wurden Co-Chromatographien mit Eriodictyol 7-glucosid, Eriodictyol, Naringenin 7-glucosid und Naringenin vorgenommen. Die Zuordnung der Hydroxyzimtsäuren wurde über Standards von Chlorogensäure, *p*-Cumarsäure und anderen Abkömmlingen anhand der Co-Chromatographien und der charakteristischen Absorptionseigenschaften unter UV-Licht vorgenommen. Zur Identifizierung von *p*-Cumaroylglucose stand ein gereinigter Standard von Frau Dr. Römmelt zur Verfügung. Auch im Bereich der Flavonole wurden Standards von Hyperin, Rutin, Isoquercitrin, Avicularin, Quercitrin, Quercetin und Kämpferol zur Identifizierung auf DC herangezogen. Eine weitere Auswertung wurde nach Naturstoffbehandlung (1 g Naturstoff und 5 g Polyethylenglycol ad 100 ml Methanol) vorgenommen, bei der sich unter UV-Licht die Quercetinglycoside (orange) deutlich von den Kämpferolglycosiden (grün) unterscheiden lassen (ALT und SCHMIDLE 1980; BRASSEUR und ANGENOT 1986).

Der Nachweis für alle Substanzen wurde im UV-Licht (350 nm), nach Naturstoffbehandlung und jeweils nach Bedampfen mit Ammoniak untersucht.

Die Flavonole und Procyanidine wurden mit Standards von Catechin, Epicatechin, C1, B2, B5 und E-B5 nachgewiesen. C1 und B2 wurden freundlicherweise von Frau Ölschläger und B5 und E-B5 von Prof. Treutter zur Verfügung gestellt. Anstatt Celluloseplatten wurden Kieselgelplatten (Merck) mit dem Laufmittel TAA (Toluol : Aceton : Ameisensäure 3 : 6 : 1 v:v:v) verwendet. Zur Identifizierung wurden die DC-Platten dazu mit einer Lösung aus 1 g DMAZA in 50 ml 6N HCl und ad 100 ml Ethanol besprüht.

Die Platten wurden im UV-Licht (350 nm) und nach DMAZA-Behandlung ausgewertet.

2.12 Bestimmung des Proteingehalts

2.12.1 Extraktion der Proben

30 mg TS der mit der Kugelmühle gemahlene Proben wurden in Eppendorfcaps (2 ml) eingewogen, 1 ml 0,1 M Na-Acetatpuffer (pH-Wert 5,0; mit 1 % Polyvinylpolypyrrolidon =

Phenolfänger) wurde zugegeben. Für 10 sec wurde der Inhalt mittels eines Schüttlers (Vortex-Genie) durchmischt, dann 15 Minuten auf Eis liegend auf einem 2D-Schüttler rotiert und anschließend 10 Minuten bei 30000 g und 4°C zentrifugiert. 650 µl des Überstandes wurden in Eppendorfgläser (1,5 ml) abgezogen und für die Durchführung der Proteinbestimmung und die Messung der PR-Proteine herangezogen.

2.12.2 Durchführung des Protein-Assay

Der Proteingehalt wurde auf Mikrotiterplatten nach BRADFORD (1976) bestimmt. Dabei wird die Verschiebung der Extinktion des Färbereagens Coomassie Brilliant Blue von 495 nm auf 595 nm durch die Bindung an Aminosäuren von Proteinen ausgenutzt. Die Extinktion wurde bei 600 nm im Mikrotiterplatten-Photometer (Titertek Plus NT 212, ICN) gemessen.

Die Proteinrohextrakte wurden im Verhältnis 1:10 verdünnt. Es wurden „96 Well Assay Plates“ (Costar) mit einem Volumen von 360 µl pro Vertiefung verwendet. Als Referenzsubstanz diente eine BSA-Lösung mit einer Konzentration von 10 µg / 100 µl. Bei allen Ansätzen wurden drei Einzelmessungen vorgenommen.

Das Färbereagens Coomassie Brilliant Blue G250 (BIO-RAD Protein-Assay) ist sehr viskos. Aus diesem Grund wurde eine Mischung aus dem für den Ansatz benötigten Wasser und der Färbelösung (175 µl Aqua_{bidest.} und 50 µl des Färbereagens pro Einzelmessung) als Stammlösung vorbereitet (Tab. 7).

Tab. 7: Reaktionsansatz für die Proteinbestimmung

	Probe (verdünnter Extrakt)	Referenz (BSA-Lsg.)	Nullwert (Aqua _{bidest.})
	25 µl	25 µl	25 µl
Aqua _{bidest.} + Färbereagens	225 µl	225 µl	225 µl
Mischung auf Schüttler (Ableben der Platte mit Folie)			
Inkubation bei Raumtemperatur für 20 min im Dunkeln			

Formel zur Berechnung des Proteingehaltes

$$\text{Proteingehalt} = \frac{m_{BSA} * (E_{Probe} - E_{BW}) * Verd. * V_{Puffer}}{(E_{Referenz} - E_{BW}) * V_{Probe} * m_{Einwaage}}$$

m_{BSA} = Masse des BSA im Referenzansatz

E_{Probe} = Extinktion der Probe

E_{BW} = Extinktion des Blindwertes

$E_{Referenz}$ = Extinktion der Referenz

V_{Probe} = Volumen der Probe im Ansatz

V_{Puffer} = Volumen des Na-Acetatextraktionspuffers

$m_{Einwaage}$ = Masse der Extraktionseinwaage

Verd. = Verdünnung

2.13 Untersuchung von PR-Proteinen

2.13.1 Chitinase-Aktivität

Die Chitinase-Aktivität kann durch den hydrolytischen Abbau eines spezifischen farbstoffmarkierten Substrats, dem Carboxymethyl-Chitin-Remazol-Brilliant-Violett, photometrisch ermittelt werden (FLEISCHMANN 2000; WIRTH und WOLF 1990). Nicht umgesetztes Substrat stört dabei die Messung. Aus diesem Grund muss ein Nullwert mit Aqua_{bidest} als Probe mitgeführt und die Extinktion des Blindwertes von der Extinktion der Probe bei 550 nm substrahiert werden.

Die Proteinrohextrakte wurden 1:10 verdünnt. Als Reaktionsgefäße wurden ebenfalls Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen verwendet. Jede Messung wurde 3-fach wiederholt.

Für die Bestimmung wurden folgende Lösungen benötigt:

- Na-Acetatpuffer (0,1 M; pH-Wert 5,0)
- Substrat Carboxymethyl-Chitin-Remazol-Brilliant-Violett (LOEWE Biotech)
- Salzsäure (1M HCl)

Tab. 8: Reaktionsschema der Chitinasebestimmung

	Verdünnter Rohextrakt	Nullwert (Aqua_{bidest.})
	50 µl	50 µl
Na-Acetatpuffer	150 µl	150 µl
Substrat	50 µl	50 µl
	Platte mit Klebefolie verschließen und Proben auf Schüttler gut mischen	
Inkubation	20 min im Trockenschrank bei 37 °C	
Salzsäure (Abstoppen der Reaktion)	50µl	50µl
Eiswasser	10 min in Eiswasser abkühlen – nicht umgesetztes Substrat wird ausgefällt	
Zentrifugation	Bei 4 °C und 3000 U/min für 10 min	
Umpipettieren in neue Multititerplatte	175 µl	175µl
Messung	Mikrotiterplatten-Photometer bei 550 nm	

Formel zur Berechnung der Chitinase-Aktivität aus der gemessenen Extinktion:

$$\text{Aktivität (Units/g TS)} = \frac{(E_{\text{Probe}} - E_{\text{BW}}) * \text{Verd.} * V_{\text{Puffer}}}{\text{Inkubationszeit} * V_{\text{Probe}} * m_{\text{Einwaage}}}$$

E_{Probe} = Extinktion der Probe

V_{Puffer} = Volumen des Na-Acetatextraktionspuffers

E_{BW} = Extinktion des Blindwertes

V_{Probe} = Volumen der Probe im Ansatz

Verd. = Verdünnung

m_{Einwaage} = Masse der Extraktionseinwaage

2.13.2 β -1,3-Glucanaseaktivität

Mechanismus

β -1,3-Glucanase setzt das Substrat Laminarin, ein Zellwandglucan aus Braunalgen, um. Die bei der enzymatischen Hydrolyse freigesetzten Zuckeräquivalente können nach der Derivatisierung mit *p*-Hydroxybenzoesäurehydrazin (LEVER 1972) mittels photometrischer Messung des entstehenden Osazons bestimmt werden (FLEISCHMANN 2000).

Benötigte Materialien und Lösungen

Als Proben wurden die Proteinrohextrakte in einer Verdünnung von 1:500 verwendet. Die Reaktion und die Messung wurde wie bei der Protein- und Chitinase-Aktivitäts-Bestimmung im Mikrotiterplattenmaßstab durchgeführt und jede Probe 3-fach gemessen.

Lösungen:

- Na-Acetatpuffer (0,2 M; pH-Wert 5,0)
- Laminarin (4 mg/ml)

Um eine möglichst glucosefreie Laminarinlösung zu erhalten, wurde 1,0 g Laminarin in 50 ml 96 %-igem Ethanol suspendiert und für 20 min bei 4 °C mit 25000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert. Die Zugabe von 50 ml Ethanol mit anschließender Zentrifugation wurde insgesamt 3-mal wiederholt. Der Niederschlag wurde in 25 ml des Na-Acetatpuffers gelöst. Für den Assay wurde die Stammlösung nochmals 1:10 mit Na-Acetatpuffer verdünnt (PLESSL 2002).

- Salzsäure (0,1 M HCl)
- Natronlauge (0,5 M NaOH)
- Stammfärbelösung (0,1 g *p*-Hydroxybenzoesäurehydrazin in 10 ml 0,1 M HCl)
- Färbelösung aus der Stammfärbelösung, 0,5 M NaOH und Aqua_{bidest} im Verhältnis von 1:4:5
- Glucoselösung (5 mM; zur Erzeugung der Eichgeraden)

Tab. 9: Reaktionsschema der β -1,3-Glucanasebestimmung

	Probe	Nullwert der Probe	Laminarin-Nullwert	Glucose-Eichgerade
	je 50 μ l (Verdünnungen mit Aqua _{bidest} auffüllen)			
Na-Acetatpuffer	-		je 50 μ l	
Laminarin	50 μ l		-	
	Platte mit Klebefolie verschließen und auf Schüttler gut mischen			
Inkubation	60 min im Tockenschrank bei 37 °C			
Färbelösung	je 200 μ l			
Farbentwicklung	5 min im kochenden Wasser			
Abkühlung	5 min bei Raumtemperatur			
Messung	Mikrotiterplatten-Photometer bei 410 nm			
Umrechnung	Extinktion – Glucoseäquivalente – Glucanase-Aktivität (nach folgenden Formeln)			

Formel zur Berechnung der Glucoseäquivalente aus der Eichgerade

$$\text{Glucoseäquivalente} = \frac{((E_{\text{Probe mit Substrat}} \text{ bzw. } E_{\text{Probe ohne Substrat}} \text{ bzw. } E_{\text{Laminarin}}) - b)}{m}$$

m = Steigung der Regressionsgeraden

E = Extinktion

b = Achsenabschnitt der Regressionsgeraden

Formel zur Berechnung der β -Glucanaseaktivität

$$\text{Aktivität (nkat / g TS)} = \frac{((G\ddot{A}_{\text{Probe mit Substrat}} - G\ddot{A}_{\text{Probe ohne Substrat}} - G\ddot{A}_{\text{Laminarin}}) * \text{Verd.} * V_{\text{Puffer}})}{(\text{Inkubationszeit} * V_{\text{Probe}} * m_{\text{Einwaage}})}$$

$G\ddot{A}$ = Glucoseäquivalent

V_{Probe} = Volumen der Probe im Ansatz

Verd. = Verdünnung

m_{Einwaage} = Masse der Extraktionseinwaage

V_{Puffer} = Volumen des Na-Acetatextraktionspuffers

1 Unit entspricht 16,67 nKatal (Katal: freigesetzte $G\ddot{A}$ (mol) pro Sekunde).

3 Ergebnisse

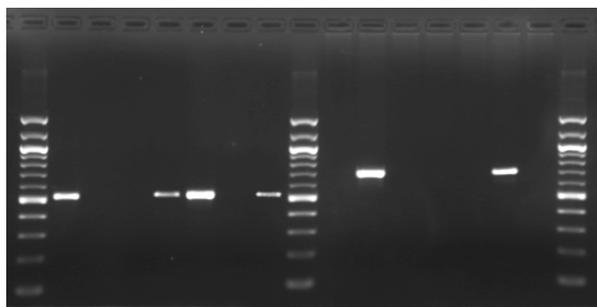
3.1 Isolierung und Identifizierung eines *Phytophthora cactorum*-Stammes



Abb. 6: *Phytophthora cactorum*-Befall an 'Topaz'

In 3-5-jährigen Anlagen der im ökologischen Anbau wichtigen Sorte 'Topaz' wurden im Herbst 2001 in Südtirol Infektionen mit *Phytophthora cactorum* festgestellt. Bei bis zu 7% der Bäume war die Infektion so weit fortgeschritten, dass der Baum knapp oberhalb der Veredlungsstelle vom Pathogen im Rindenbereich ganz umgürtet wurde. Die Rindenbereiche waren bereits abgestorben (Abb. 6) (LARDSCHNEIDER et al. 2002; MORNAU et al. 2002).

Aus den befallenen Partien wurde wie in Kapitel 2.4 beschrieben aus kleinen Rindenpartien mittels selektivem Agar der *Phytophthora*-Stamm Iso 2 isoliert. Wuchseigenschaften und Sporangiengröße wiesen auf *Phytophthora cactorum* hin.



1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1/ 9/ 17	100 bp-Leiter (dickere Banden bei 500 und 1000 bp)															
2/ 10	<i>Phytophthora cactorum</i> -Standard															
3/ 11	<i>Phytophthora citricola</i> -Standard															
4/ 12	Wasserkontrolle															
5/ 13	Stamm Iso 1															
6/ 14	Stamm Iso 2															
7/ 15	Stamm Pt8															
8/ 16	Stamm BBA 64197															
2-8	Primer spezifisch für <i>Phytophthora cactorum</i>															
10-16	Primer spezifisch für <i>Phytophthora citricola</i>															

Abb. 7: Ergebnis einer PCR zum Nachweis von *Phytophthora cactorum* und *Phytophthora citricola* (von Dr. F. Fleischmann zur Verfügung gestellt)

Gewissheit verschaffte die molekularbiologische Untersuchung mittels PCR mit *Phytophthora cactorum*-spezifischen Primern, die von Dr. Fleischmann durchgeführt wurde.

In Abb. 7 ist das Ergebnis der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) abgebildet.

Die Banden der Slots 5, 6, 13 und 14 stellen Amplifikate der im Rahmen dieser Arbeit isolierten *Phytophthora*-Stämme aus den deutlich befallenen Bäumen des Genotyps 'Topaz' dar (Abb. 6). In den Slots 2 bis 8 ist das

Ergebnis der PCR mit *Phytophthora cactorum*-spezifischen Primern dargestellt, in den Slots

10 bis 16 das Ergebnis der PCR mit *Phytophthora citricola*-spezifischen Primern. Durch diese Untersuchung konnte neben der Identifizierung der Stämme Iso 1 und 2 als *Phytophthora cactorum* auch der Stamm Pt8 eindeutig als *Phytophthora citricola* identifiziert werden (Slots 7 und 15).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch mit in Slot 8 (Abb. 7) ebenfalls eindeutig als *Phytophthora cactorum* identifizierten Stamm BBA 64197 gearbeitet.

3.2 Phenolische Inhaltsstoffe der Apfelerinde

Phenolische Inhaltsstoffe spielen in der Wirt-Parasit-Interaktion eine wichtige Rolle. Ihnen wird unter anderem eine Bedeutung in der Abwehr einer Pathogeninfektion zugeschrieben (Kap. 1.4.3.1). Deshalb wurden die phenolischen Inhaltsstoffe der Apfelerinde genau untersucht.

3.2.1 Identifizierung phenolischer Inhaltsstoffe

Die Identifizierung der phenolischen Inhaltsstoffe erfolgte mit HPLC, Dünnschichtchromatographie und UV-Spektroskopie.

In den Tabellen 10 und 11 sind die identifizierten Substanzen mit ihren chromatographischen Parametern aufgelistet und in den Abbildungen 8 bis 11 die UV-Spektren mit HPLC-Chromatogrammen dargestellt. Die unterschiedlichen Substanzklassen werden im Folgenden einzeln angesprochen.

Tab. 10: Einteilung in Substanzklassen mit charakteristischen Absorptionsmaxima mit Retentionszeiten

Substanznummer + Spektrum (Abb. 8, Abb. 9, Abb. 10)	Name	Substanzklasse	Maximum des UV- Absorptionsspektrums (nm)	Retentionszeit (min)	Rf-Werte (DC: Celluloseplatten mit BAW (4:1:2,2))
1		Cumarsäurederivat	314	21,4	63
2		unbekannt	245/275	22,8	-
3	p-Cumaroyl-glucose	Cumarsäurederivat	314	27,6	71
4		Cumarsäurederivat	314	30,9	35
5	Chlorogensäure	Kaffeensäurederivat	300 (sh) /324	37,8	69
6		Cumarsäurederivat	311	40,2	74
7		unbekannt	283	53,5	-
8	Eriodictyol 7-glucosid	Flavanon	282/324 (sh)	67,5	57
9		unbekannt	273	89,4	-
10	Naringenin 7-glucosid	Flavanon	282/324 (sh)	90,9	74
11		unbekannt	282	96,5	61
12	Phloridzin	Dihydrochalkon	282	100,2	72
13		Flavonol	257/352	129,8	49
14		Flavonol	267/352	132,5	52
15	Avicularin	Flavonol	257/354	136,2	63
16	Quercitrin	Flavonol	257/348	140,2	77
17	Phloretin	Dihydrochalkon	282	151,1	97
18		acyliertes Flavonoid	283/322 (sh)	166,1	-
19		acyliertes Flavonoid	286/314 (sh)	166,8	-
20		acyliertes Flavonoid	285/311 (sh)	169,8	-
21		acyliertes Flavonoid	289/312 (sh)	171,1	-
22		acyliertes Flavonoid	286/318 (sh)	171,4	-
23		unbekannt	281	171,6	-
24		acyliertes Flavonoid	286/318 (sh)	172,4	-

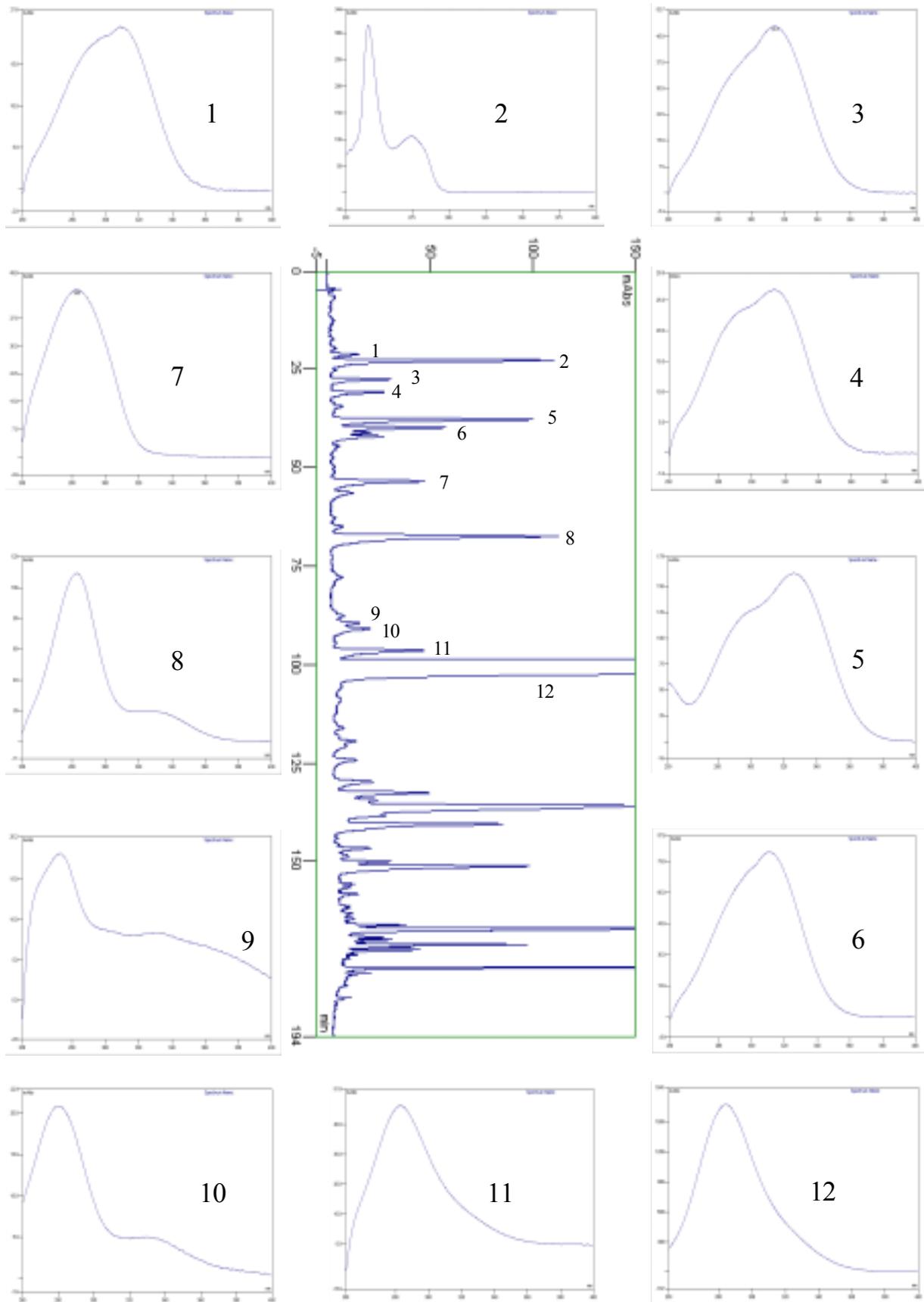


Abb. 8: Chromatogramm von 'Golden Delicious' mit UV-Spektren (Teil 1)

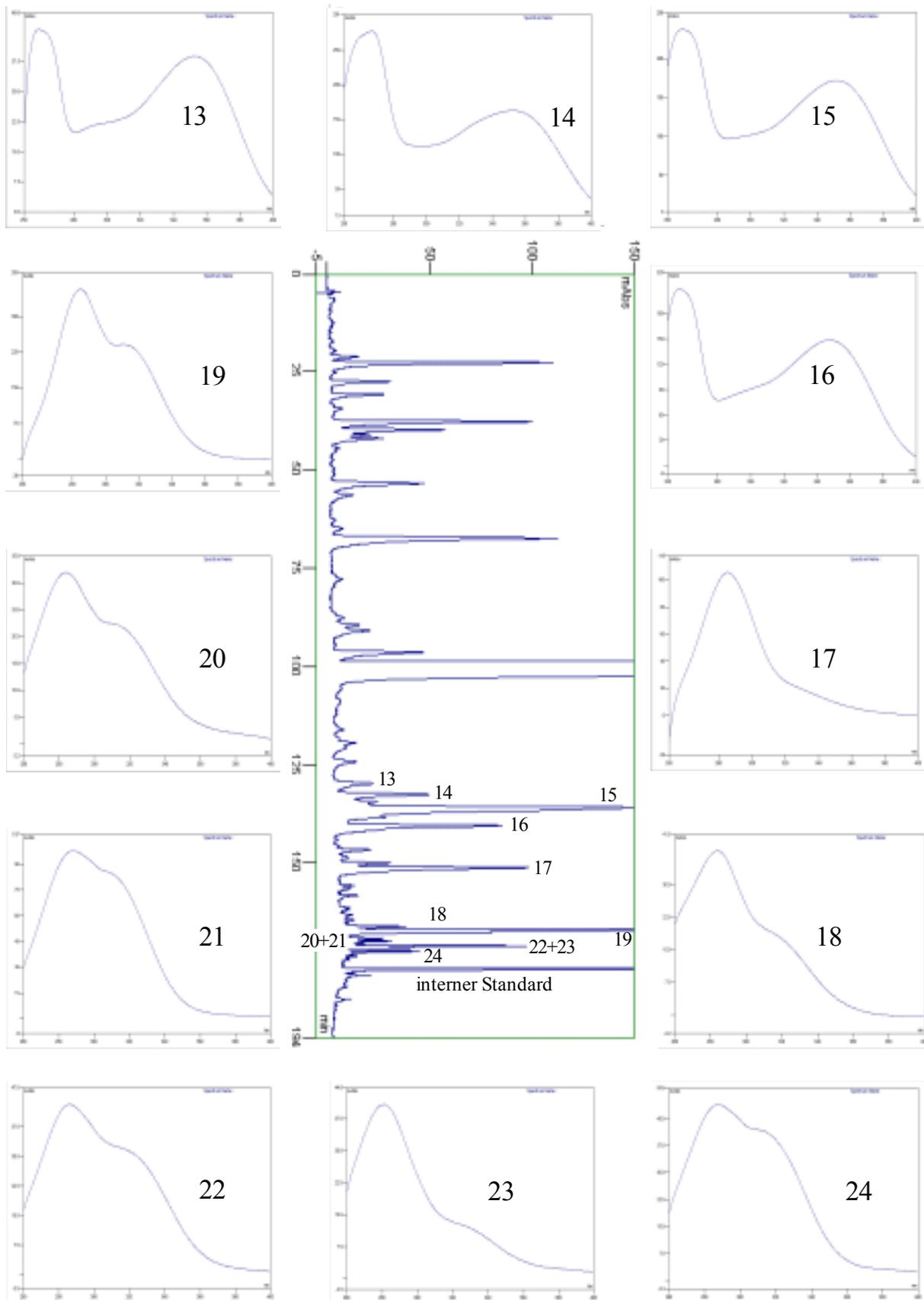


Abb. 9: Chromatogramm von 'Golden Delicious' mit UV-Spektren (Teil 2)

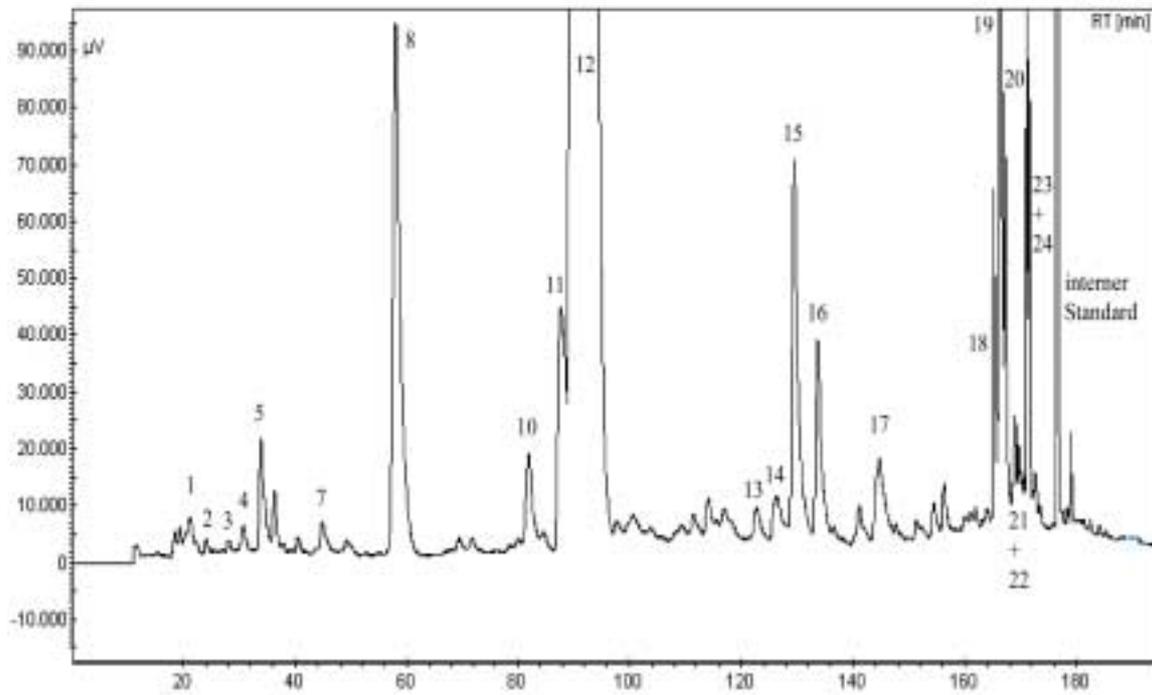


Abb. 10: Chromatogramm von 'Topaz' bei 280 nm, Substanzen nach Tab. 10 bezeichnet

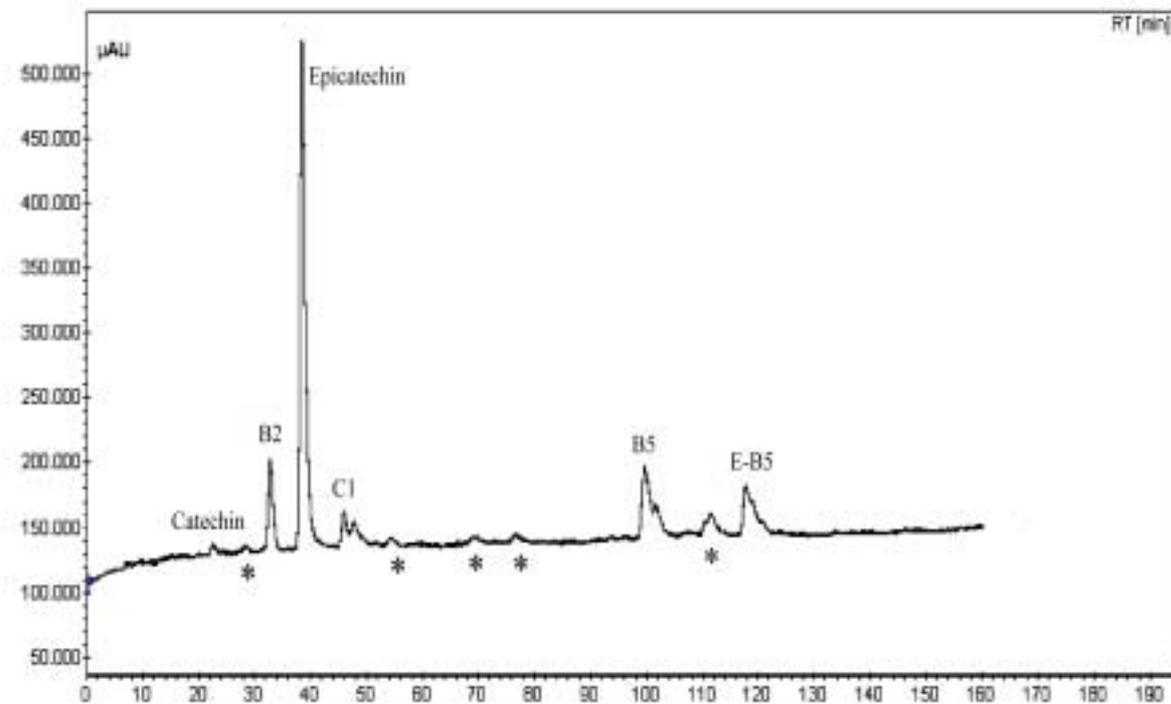


Abb. 11: Chromatogramm von 'Topaz' bei 640 nm nach Nachsäulenderivatisierung mit DMAZA; mit * bezeichneten Substanzen nicht identifizierte Proanthocyanidine

Tab. 11: Liste der identifizierten Flavanole und Proanthocyanidine

Name	Substanzklasse	Struktur	Retentionszeit (min)	Rf-Werte (DC: Kieselgelplatte mit TAA (3:6:1))
Catechin	Flavan 3-ol	2,3 trans-Flavan 3-ol	23,8	68
B2	Proanthocyanidin	Epicatechin-(4 β -8)-Epicatechin	33,9	50
Epicatechin	Flavan 3-ol	2,3 cis-Flavan 3-ol	40,1	47
C1	Proanthocyanidin	Epicatechin-(4 β -8)-Epicatechin-(4 β -8)-Epicatechin	46,3	38
B5	Proanthocyanidin	Epicatechin-(4 β -6)-Epicatechin	100,1	59
E-B5	Proanthocyanidin	Epicatechin-(4 β -6)-Epicatechin-(4 β -6)-Epicatechin	118,4	45

Hydroxyzimtsäurederivate

p-Cumaroyl-Glucose (Tab. 10, Abb. 8 (3)) konnte identifiziert werden und wurde mit den Peaks 1, 4 und 6 wegen der Spektrenverwandtschaft und identischem Färbeverhalten auf DC zur Gruppe der *p*-Cumarsäurederivate zusammengefasst.

Bei den Kaffeesäurederivaten konnte Peak 5 (Tab. 10, Abb. 8) als Chlorgensäure identifiziert werden.

Dihydrochalkone

Zu den Dihydrochalkonen wurde das Phloridzin (Peak 12; Tab. 10, Abb. 8) und das Phloretin (Peak 17; Tab. 10, Abb. 9) gezählt. Andere Dihydrochalkone wurden nicht identifiziert.

Flavanone

Die beiden Flavanonglucoside Eriodictyol 7-glucosid (Peak 8; Tab. 10, Abb. 8) und Naringenin 7-glucosid (Peak 10; Tab. 10, Abb. 8) stellten die Vertreter der Klasse der Flavanone.

Flavonole

Zur Klasse der Flavonole wurden die Peaks 13 bis 16 (Tab. 10, Abb. 9) gezählt. Dabei konnte der Peak 15 (Tab. 10, Abb. 9) als Avicularin und Peak 16 (Tab. 10, Abb. 9) als Quercitrin identifiziert werden.

Acylierte Flavonoide

Die Substanzen 18, 19, 20, 21, 22 und 24 wurden aufgrund der Ähnlichkeit ihrer Spektren mit den kürzlich von RÖMMELT (2002) identifizierten Substanzen 4-*O*-cis-*p*-Cumaroyl-Phloridzin und 4-*O*-trans-*p*-Cumaroyl-Phloridzin als acylierte Flavonoide bezeichnet. Die Entsprechungen in den Maxima der Absorptionsspektren und die ähnlichen Retentionszeiten (Tab. 10; Abb. 9) legen den Bezug nahe. Zusätzlich konnten diese Substanzen, wie die acylierten Substanzen von RÖMMELT (2002), auf der Dünnschichtplatte nicht sichtbar gemacht werden. Co-Chromatographien ergaben, dass keine der hier gefundenen Substanzen der von RÖMMELT (2002) beschriebenen entspricht.

Flavan 3-ole und Proanthocyanidine

Über die Retentionszeiten und R_f-Werte auf DC wurden die monomeren Flavan 3-ole Catechin und Epicatechin und die Procyanidine B2, C1, E5 und E-B5 zugeordnet (Tab. 11; Abb. 11). Zusätzlich wurden 5 Substanzen detektiert, die in Abbildung 11 mit einem Stern gekennzeichnet sind und mit den Procyanidinen die Gruppe der Proanthocyanidine bildeten.

Nach Infektion stimulierte Substanzen 2,7 und 11

Die nach Infektion stimulierte Substanz 2 ließ sich nur über ihr Spektrum mit den Maxima 245 nm und 275 nm charakterisieren. Die beiden Substanzen 7 und 11 besaßen beide ein Spektrum mit einem Maximum von 283 bzw. 282 nm (Tab. 10, Abb. 8). Das Spektrum der Substanz 11 gleicht dem Spektrum von Phloridzin (Tab. 10, Abb. 8). Die Spektren der beiden Substanzen 2 und 7 besaßen keine Ähnlichkeit mit anderen Spektren in der Probe. Auf DC ließen sich die drei Substanzen nicht sichtbar machen.

3.2.2 Diskussion der Substanzidentifizierung

Zur Einordnung der nachgewiesenen Substanzen in den Phenylpropanoidstoffwechsel ist in Abb. 12 eine Zusammenstellung der in der Rinde vorhandenen phenolischen Inhaltsstoffe dargestellt. Die Stoffwechselwege auf der linken Seite der Abbildung gehen auf Reaktionen im Blatt von *Malus domestica* zurück.

Die konstitutiv vorhandenen Vertreter der Hydroxyzimtsäuren, Dihydrochalkone, Flavanone, Flavonole und Flavanole lassen darauf schließen, dass sich die Enzymausstattung in der Rinde möglicherweise nur geringfügig von der im Apfelbalt vorhandenen unterscheidet. Dies

unterstützt die Arbeit von WILLIAMS (1960), wonach die Biosynthese phenolischer Inhaltsstoffe in der Rinde qualitativ der Biosynthese im Blatt gleicht.

LOCKARD et al. (1982) wiesen in der Rinde nach saurer Hydrolyse des Gesamtextraktes die unterschiedlichen Hydroxyzimtsäuren Ferulasäure, Protocatechusäure, Kaffeesäure, *p*-Cumarsäure und *p*-Hydroxybenzoesäure nach, die NACHIT und FEUCHT (1976) auch in jungen Apfeltriebspitzen nach saurer Hydrolyse nachweisen konnten. Neben der Hydroxyzimtsäure Chlorogensäure war im Rahmen dieser Arbeit nur der Bestandteil *p*-Cumaroylglucose eindeutig zu identifizieren.

Co-Chromatographien mit Ferulasäure, Protocatechusäure, Kaffeesäure und *p*-Cumarsäure ließen einen Nachweis dieser freien Säuren im nativen Extrakt nicht zu. Dies bestätigt die Aussagen von HERRMANN (1989), nachdem die meisten Hydroxyzimtsäuren in der Pflanze nicht in freier Form vorliegen, sondern als einfache Chinasäure- oder Glucoseester.

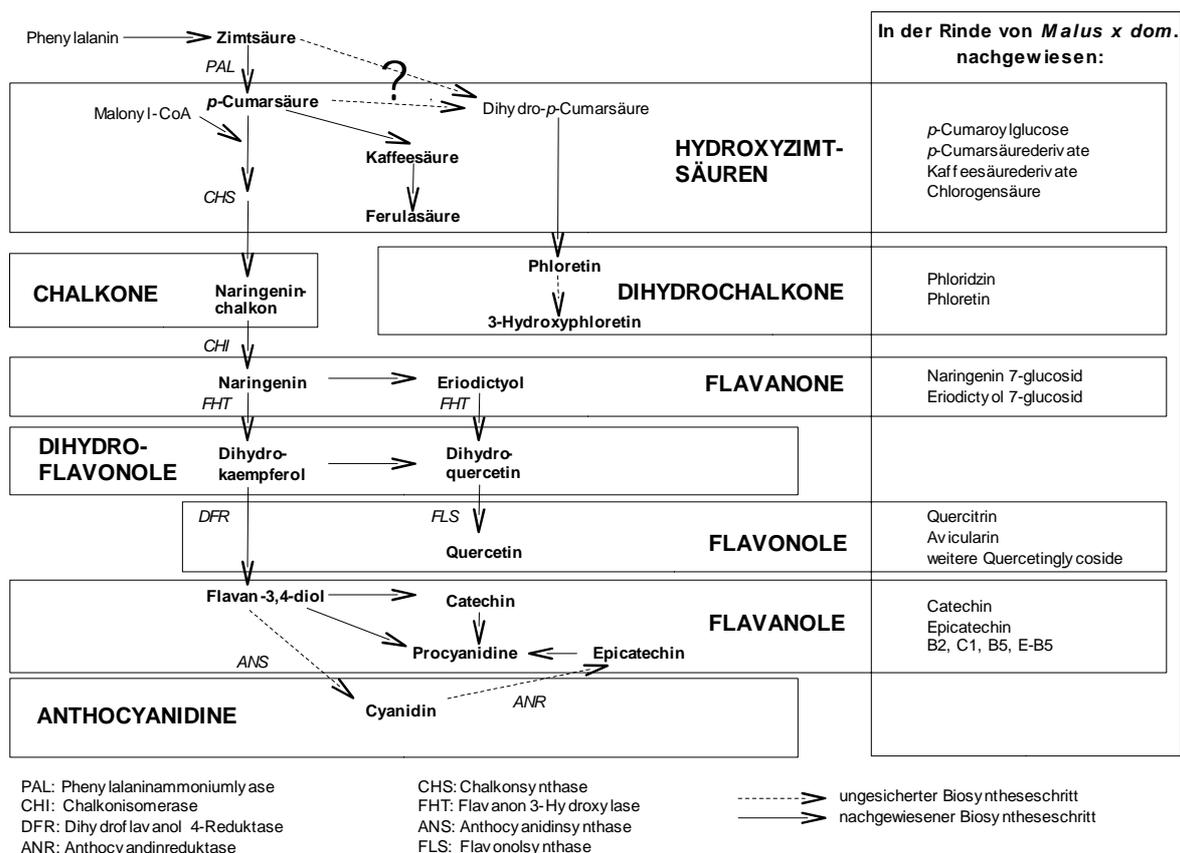


Abb. 12: Schema der Flavonoidbiosynthese bei *Malus domestica* bezogen auf die Rinde; modifiziert nach TREUTTER (2001) und XIE et al. (2004)

Phloridzin und sein Aglykon Phloretin wurden im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen, was die Ergebnisse von ALT und SCHMIDLE (1980), LOCKARD und SCHNEIDER (1981a,b), MARTIN UND WILLIAMS (1967), PRIESTLY (1960), SARAPUU (1964) und WILLIAMS (1960; 1982) qualitativ bestätigt.

Naringenin 7-glucosid und Eriodictyol 7-glucosid konnten im Rahmen dieser Arbeit erstmals als Inhaltsstoffe der Rinde von Apfel beschrieben werden. Das Eriodictyol 7-glucosid wurde kürzlich von RÖMMELT et al. (2003) als induzierter Bestandteil des Apfelblattes nach Prohexadion-Ca-Behandlung erstmalig für Apfel beschrieben. Interessant ist, dass Eriodictyol 7-glucosid nur nach Behandlung mit dem FHT-Inhibitor Prohexadion-Ca im Blatt nachweisbar ist (RÖMMELT et al. 2003), in der Rinde jedoch als konstitutiver Inhaltsstoff vorliegt. Auch das Naringenin 7-glucosid ist in der Rinde als konstitutiver Inhaltsstoff nachweisbar.

Die nach ALT und SCHMIDLE (1980) und WILLIAMS (1960; 1982) in der Apfelfrinde vorhandenen Kämpferolglycoside konnten nicht nachgewiesen werden. Auch nach saurer Hydrolyse waren die Ergebnisse von ALT und SCHMIDLE (1980) nicht zu bestätigen. Das von WILLIAMS (1982) als Inhaltsstoff der Rinde von Apfel postulierte Isorhamnetin und seine Glycoside wurde ebenfalls nicht nachgewiesen.

Geht man bei Betrachtung des Phenylpropanoidstoffwechsels davon aus, dass bei einer vorhandenen FHT-Aktivität Naringenin in das Dihydrokämpferol umgesetzt wird, so liegt der Schluss nahe, dass sich auch Kämpferol bei vorhandener FLS-Aktivität bilden könnte. Interessanterweise konnte aber kein Kämpferol nachgewiesen werden, was wiederum den von TREUTTER (2001; Abb. 12) für das Blatt postulierten Stoffwechsel ohne Kämpferol bestätigt.

ALT und SCHMIDLE (1980) und WILLIAMS (1960; 1982) konnten in ihren Arbeiten verschiedene Quercetinglycoside in der Rinde nachweisen. Nach WILLIAMS sollen sich in der Rinde Avicularin, Quercitrin, Isoquercitrin, Hyperin und Rutin bilden. Der Nachweis von Avicularin und Quercitrin wurde auch im Rahmen dieser Arbeit erbracht. Dennoch konnten die anderen Quercetinglycoside nicht eindeutig zugeordnet werden. In Anlehnung an ALT und SCHMIDLE (1980) wurden die Substanzen anhand ihrer Spektren und ihrem Färbeverhalten auf DC den Quercetinglycosiden zugeordnet. Die Abgrenzung gegenüber den Kämpferolglycosiden wurde anhand der Färbung auf DC erbracht, bei der Quercetinglycoside nach Naturstoffbehandlung unter UV leuchtend gelb bis orange erscheinen, Kämpferolglycoside aber grün (ALT und SCHMIDLE 1980; BRASSEUR und ANGENOT 1986). Auch nach saurer Hydrolyse konnte kein Kämpferol nachgewiesen werden.

Die als acylierte Flavonoide eingestuft Substanzen wurden ausschließlich anhand ihrer Spektrenverwandschaft und ihrem ähnlichen chromatographischen Verhalten wie die kürzlich von RÖMMELT (2002) im Apfelbalgt identifizierten Substanzen 4-*O*-cis-*p*-Cumaroyl-Phloridzin und 4-*O*-trans-*p*-Cumaroyl-Phloridzin zugeordnet. Beim Vergleich der Retentionszeiten ergaben sich geringe Verschiebungen, was möglicherweise auf unterschiedliche Hydroxylierungsmuster hindeutet.

Flavane wurden in der Apfelrinde bisher nicht untersucht. Die identifizierten Substanzen Catechin, Epicatechin und die Procyanidine B2, B5, E-B5 und C1 wurden aber im Rahmen von Arbeiten am Apfelblatt und als Inhaltsstoffe der Frucht schon nachgewiesen (MAYR et al. 1996).

3.2.3 Gehalte an Phenylpropanoiden

Die folgenden Ergebnisse sind an den unterschiedlichen Genotypen mit jeweils drei Wiederholungen an unterschiedlichen Bäumen eines Klons erhoben worden. Untersucht wurden die Gehalte an Phenylpropanoiden in der Phloemkambialschicht im unverwundeten Gewebe und 4 Wochen nach Verwundung. Die Untersuchungen wurden an Bäumen, die sich in der Winterruhe befanden, vorgenommen. Die Probennahmen erfolgten jeweils im Januar und Februar. In den Abbildungen ist jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung dargestellt.

3.2.3.1 Vergleich der Genotypen anhand des Phenylpropanoidgehalts

In der unverwundeten Phloemkambialschicht wurden deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen nachgewiesen (Abb. 13).

Die Phloemkambialschicht der untersuchten Genotypen enthielt zwischen 75 mg/g TS (M9) und 117 mg/g TS (GD) Phenylpropanoide, die mit Abstand geringsten Gehalte hatten die Genotypen M9 und 'Topaz' (Abb. 13, Gesamtsumme). Den Hauptanteil machte das Phloridzin mit einem Gehalt von 50 mg/g TS (M9) bis 80 mg/g TS (GD) (Abb. 13, Phloridzin) aus. M9 zeigte einen deutlich geringeren Gehalt an Phloridzin als die anderen Genotypen.

'Topaz' enthielt mit 9 mg Flavonolen/g TS und einem Gehalt von 16 mg/g TS Gesamtflavonoiden ohne Phloridzin deutlich weniger als die anderen Genotypen (Abb. 13, Flavane),

Summe ohne Phloridzin). Dennoch besaß `Topaz` mit 70 mg/g TS einen nur minimal geringeren Phloridzingehalt wie `Golden Delicious`, `Rewena` und MM106.

In den Gehalten an Flavanonen unterschied sich `Topaz` nicht von `Golden Delicious`, MM106 und M9 (Abb. 13, Flavanone). `Rewena` besaß einen erheblich höheren Gehalt an Naringenin 7-glucosid. Damit enthielt die Phloemkambialschicht von `Rewena` mit einem Gehalt von 5,6 mg Flavanonen/g TS mehr als die doppelte Menge im Vergleich zu den anderen Genotypen (Abb. 13, Flavanone).

Die Sorte mit den höchsten Gehalten an acylierten Flavonoiden waren `Golden Delicious` und MM106 mit 5 mg/g TS, gefolgt von `Rewena` und `Topaz` (3 mg/g TS). M9 zeigte mit 0,6 mg/g TS den geringsten Anteil dieser Substanzklasse (Abb. 13, acylierte Flavonoide).

MM106 besaß mit über 3,0 mg/g TS an Catechin und Epicatechin den dreifachen Gehalt im Vergleich zu den anderen Genotypen. Dabei halten sich bei den anderen Genotypen die monomeren Flavan 3-ole mit den Proanthocyanidinen die Waage, bei MM106 war ein Gehalt von 1,5 mg/g TS an monomeren Flavan 3-olen und 2,5 mg/g TS Proanthocyanidinen nachweisbar (Abb. 13, Catechin und Epicatechin, Proanthocyanidine).

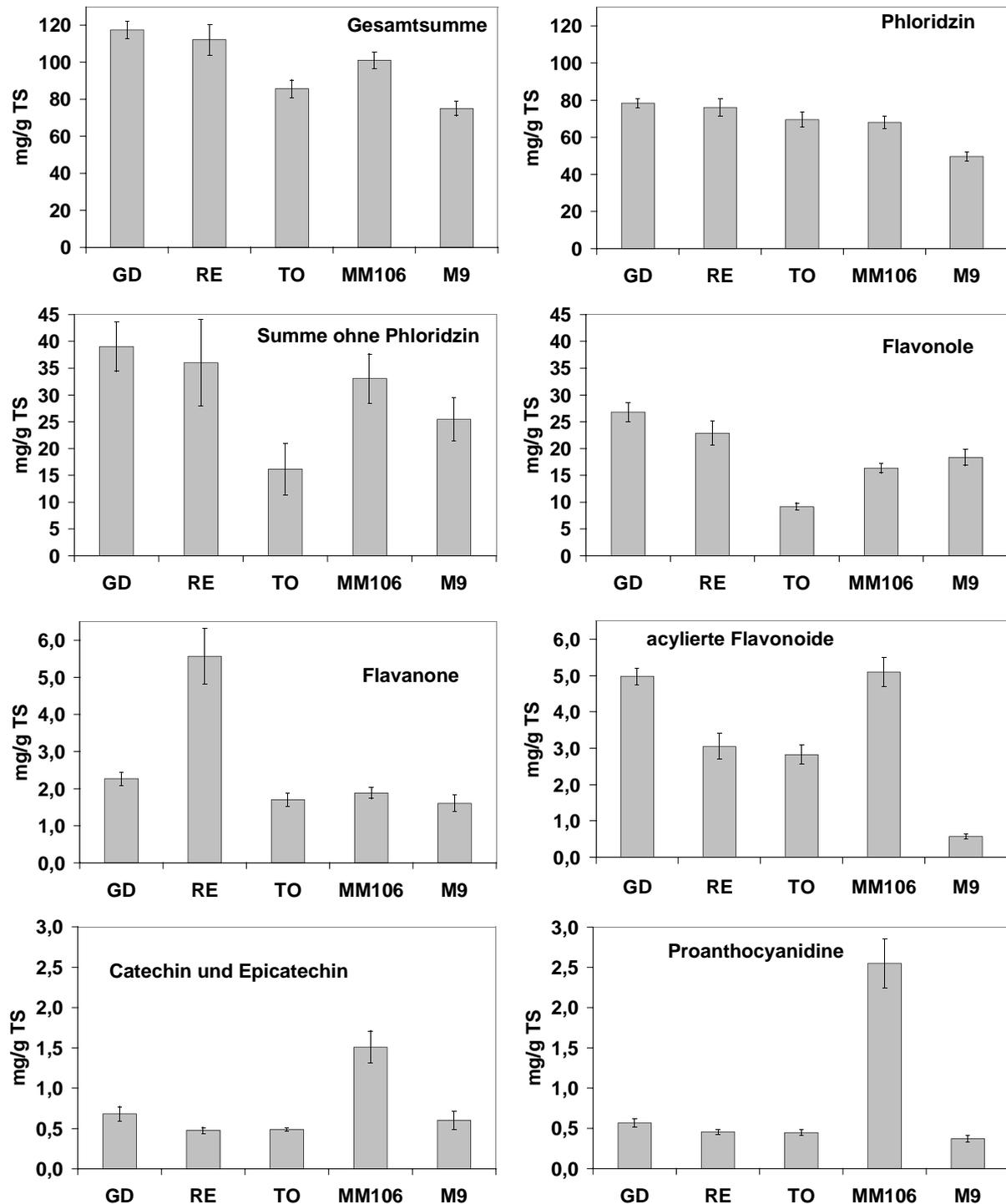


Abb. 13: Gehalt an verschiedenen Phenylpropanoidklassen in der unverwundeten Phloemkambialschicht von 'Golden Delicious' (GD), 'Rewena' (RE), 'Topaz' (TO), MM106 und M9

3.2.3.2 Wirkung von Verwundung auf den Gehalt an Phenylpropanoiden

Um den Effekt von Verwundung ohne andere Einflussfaktoren zu untersuchen und damit die Unterschiede zwischen der Wundreaktion und der Abwehrreaktion gegen das Pathogen (siehe Kap. 3.3) zu eruieren, wurden bei allen Versuchen reine Kontrollverwundungen mit der Korkbohrermethode vorgenommen. Die Veränderungen des Phenylpropanoidgehalts um die Wunden wurden anhand der zwei Analyseresultate von Reaktionszone (R) und Umgebungszone (U) dargestellt (Abb. 4). Die Aufteilung der untersuchten Zonen und Schichten ist identisch mit den Untersuchungen nach Infektion, die im weiteren Verlauf dargestellt werden.

3.2.3.2.1 MM106 und `Topaz`

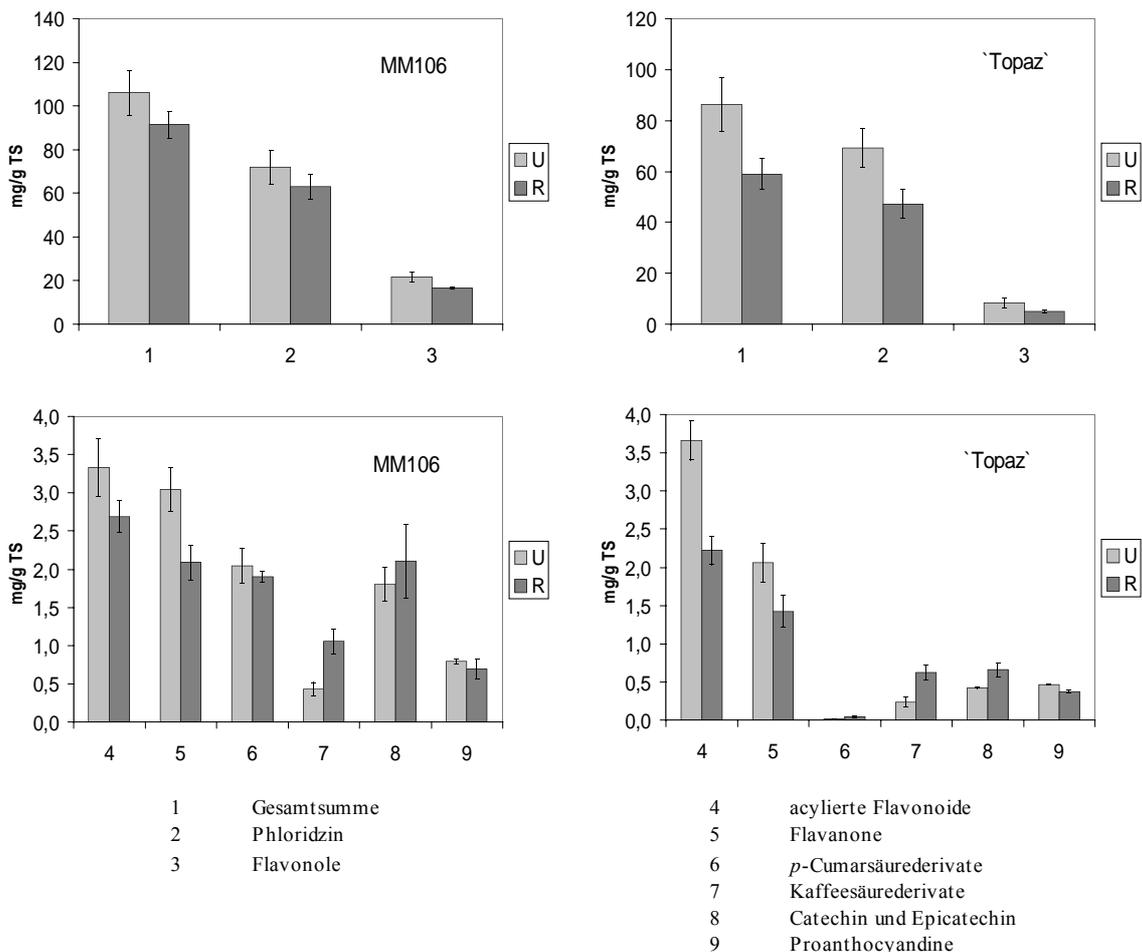


Abb. 14: Gehalte an Phenylpropanoiden in der Phloemkambialschicht 4 Wochen nach Verwundung bei den Genotypen MM106 und `Topaz`; U= Umgebungszone, R= Reaktionszone

MM106

In der Umgebungszone waren höhere Gehalte an Phloridzin, Flavonolen, acylierten Flavonoiden und Flavanonen als in der Reaktionszone nachweisbar (Abb. 14; 2,3,4,5). Der Gehalt an *p*-Cumarsäurederivaten (6) und Proanthocyanidinen (9) unterschied sich zwischen den Zonen kaum. Derivate der Kaffeesäure (7) akkumulierten nach Verwundung in der Reaktionszone. Das Verhältnis der monomeren Flavanole, Catechin und Epicatechin, zu den Proanthocyanidinen lag bei etwa 2 zu 1, im Gegensatz zu `Topaz`, wo das Verhältnis etwa 1 zu 1 war.

Der Anteil der Flavonole an der Gesamtsumme an Phenylpropanoiden lag bei 18 – 20 % (Tab.12). Die monomeren Flavanole stellten 2,3 % der Gesamtsumme in der Reaktionszone und 1,7 % in der Umgebungszone. Phloridzin machte etwa 68 % der untersuchten Phenylpropanoide aus (Tab.12).

Tab. 12: Prozentualer Gehalt der Phenylpropanoidklassen bezogen auf die Gesamtsumme; Genotypen MM106 und `Topaz`

	MM106		`Topaz`	
	U	R	U	R
Phloridzin	67,8	69,2	80,2	80,2
Flavonole	20,3	18,1	9,7	8,7
acyl. Flavonoide	3,1	3,0	4,3	3,8
Flavanone	2,9	2,3	2,4	2,4
<i>p</i> -Cumarsäurederivate	1,9	2,1	0,0	0,1
Kaffeesäurederivate	0,4	1,2	0,3	1,1
Catechin + Epicatechin	1,7	2,3	0,5	1,1
Proanthocyanidine	0,8	0,8	0,5	0,6

Topaz

Bei `Topaz` kam es zu einem deutlichen Abnahme von Phloridzin, acylierten Flavonoiden und Flavanonen in der Reaktionszone nach Verwundung (Abb. 14; 2,4,5). Den Abnahmen in der Reaktionszone standen höhere Gehalte an Kaffeesäurederivaten (7) und monomeren Flavan 3-olen (8) in der Reaktionszone gegenüber (Abb. 14).

Phloridzin stellte mit 80 % der Gesamtsumme den Hauptanteil an Phenylpropanoiden in der Rinde (Tab. 12). Nur unter 10 % der Gesamtphenylpropanoide waren Flavonole. Ebenso war der Anteil an Catechin und Epicatechin mit 1,1 % im Vergleich niedrig (Tab. 12).

Besonders fielen die in der Reaktionszone im Vergleich zur Umgebungszone prozentual hohen Gehalte an Kaffeesäurederivaten und monomeren Flavan 3-olen auf (Tab. 12).

3.2.3.2.2 `Rewena`, `Golden Delicious` und M9 unter dem Einfluss unterschiedlicher Stickstoffdüngung

Im Gegensatz zu den Genotypen MM106 und `Topaz` wurde bei den Genotypen `Rewena`, `Golden Delicious` und M9 die Wundreaktion bei unterschiedlich mit Stickstoff versorgten Bäumen untersucht. Es galt die Frage des Stickstoffeinflusses auf die Wundreaktion zu klären. Die genaue Stickstoffversorgung und die Entwicklung der Pflanzen ist in Kapitel 2.7 erklärt.

Generell zeigten sich bei den Genotypen `Rewena`, `Golden Delicious` und M9 höhere Gehalte an Phenylpropanoiden in der Umgebungszone als in der Reaktionszone (Abb. 15 und 16). Nur bei den Kaffeesäurederivaten konnte diese Beobachtung nicht bestätigt werden (Abb. 16). Für diese Substanzklasse wurde ein höherer Gehalt in der Reaktionszone bei `Rewena`, `Golden Delicious` und bei M9 in N3 nachgewiesen (Abb. 16). In der Stickstoffstufe N1 des Genotyps M9 war dieser Effekt nicht nachweisbar.

Vergleich der Stickstoffstufen

Bei `Rewena` wurden in N3 weniger acylierte Flavonoide und ein geringerer Gehalt an Kaffeesäurederivaten als in N1 gebildet (Abb. 15 und 16).

Bei `Golden Delicious` konnte für N3 in der Reaktionszone ein geringerer Gehalt, in der Umgebungszone ein tendenziell geringerer Gehalt an Phenylpropanoiden nachgewiesen werden (Abb. 15; Gesamtsumme). Dass dieser Effekt vor allem auf den geringeren Gehalt an Phloridzin und an Flavonolen zurückzuführen war, wird aus Abb. 15 (Phloridzin und Flavonole) deutlich. Der Gehalt an *p*-Cumarsäurederivaten war bei `Golden Delicious` ebenfalls wie beim Genotyp M9 in N1 höher als in N3 (Abb. 16). Bei M9 zeigte vor allem die Gesamtsumme ohne Phloridzin einen höheren Gehalt in N1 als in N3, der unter anderem auch auf den höheren Gehalt an Flavonolen in N1 zurückzuführen war (Abb. 15 – Summe ohne Phloridzin; Flavonole). Außerdem konnte in der Umgebungszone von M9 in N1 ein im Vergleich zu N3 erhöhter Gehalt an acylierten Flavonoiden gezeigt werden (Abb. 15).

Zwei Stickstoffeinflüsse wurden speziell herausgefiltert: Zum einen sank der Flavonolgehalt in der Stickstoffstufe N3 bei den Genotypen `Golden Delicious` und M9 im Vergleich zur Stickstoffstufe N1 (Abb. 15). Zum zweiten konnte bei den Kaffeesäurederivaten für die Sorten

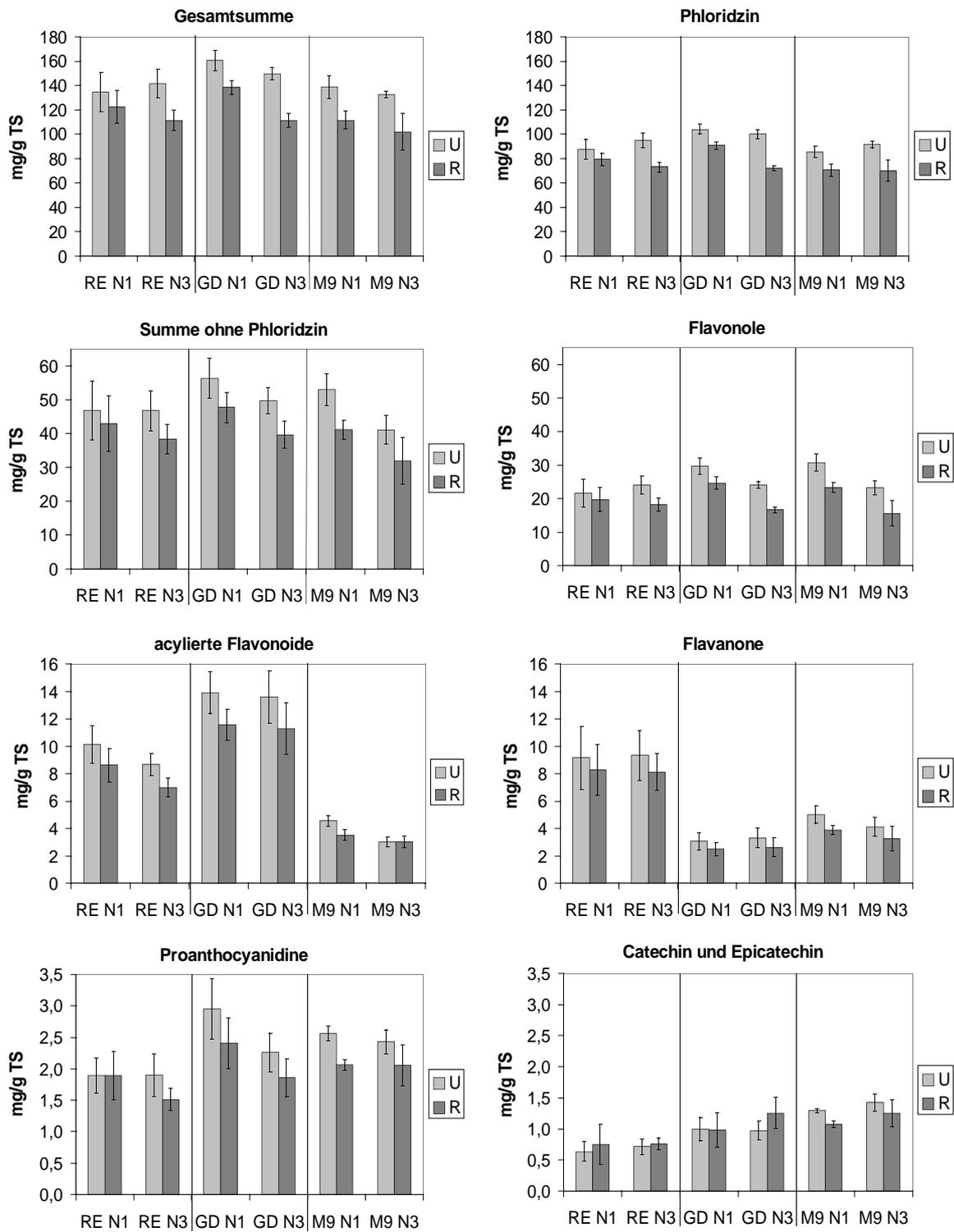


Abb. 15: Gehalte an Phenylpropanoiden in der Phloemkambialschicht nach Verwundung, Genotypen 'Rewena', 'Golden Delicious' und M9 bei unterschiedlicher N-Düngung; N1: moderate Stickstoffversorgung, N3: hohe Stickstoffversorgung; U = Umgebungszone, R = Reaktionszone; Teil 1

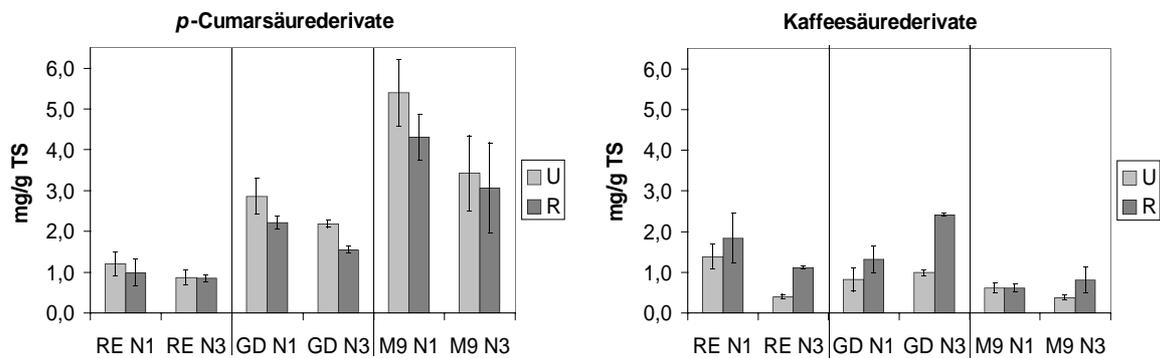


Abb. 16: Gehalte an Phenylpropanoiden in der Phloemkambialschicht nach Verwundung, Genotypen 'Rewena', 'Golden Delicious' und M9 bei unterschiedlicher N-Düngung; N1: moderate Stickstoffversorgung, N3: hohe Stickstoffversorgung; U = Umgebungszone, R = Reaktionszone; Teil 2

'Rewena', 'Golden Delicious' und die Unterlage M9 jeweils in der Stickstoffstufe N3 eine deutliche Anreicherung in der Reaktionszone im Vergleich zur Umgebungszone gezeigt werden (Abb. 16).

Unterschiede zwischen den Genotypen 'Rewena', 'Golden Delicious' und M9

Deutliche Unterschiede zeigten sich im Gehalt von *p*-Cumarsäurederivaten (Abb. 16). In M9 wurde im Vergleich zu den anderen beiden Genotypen ein deutlich höherer Gehalt nachgewiesen. Gleichzeitig war bei M9 der geringste Gehalt an Kaffeesäurederivaten aufzeigbar (Abb. 16). M9 hatte einen tendenziell erhöhten Gehalt an Catechin und Epicatechin (Abb. 15)

Für 'Rewena' wurde ein doppelt so hoher Gehalt an Flavanonen nachgewiesen wie für die beiden anderen Genotypen (Abb. 15; Flavanone). 'Rewena' beinhaltete nach Verwundung die doppelte Menge an acylierten Flavonoiden im Vergleich zu M9, 'Golden Delicious' zeigte im Vergleich zu M9 sogar einen ungefähr 3-fachen Gehalt an acylierten Flavonoiden (Abb. 15; acylierte Flavonoide).

Auffällig bei den Flavonolen war, dass besonders die Genotypen 'Golden Delicious' und M9 im Gegensatz zu 'Rewena' höhere Gehalte in der Stickstoffstufe N1 aufwiesen. 'Rewena' zeigte hier keine Unterschiede in den Stickstoffstufen (Abb. 15).

Vergleich der prozentualen Anteile der unterschiedlichen Phenylpropanoidklassen am Gesamtphenylpropanoidgehalt

Tab. 13: Prozentualer Anteil verschiedener Phenylpropanoidklassen bezogen auf die Gesamtsumme der Genotypen 'Rewena', 'Golden Delicious' und M9 in unterschiedlichen N-Stufen nach Verwundung

% der Gesamtsumme	RE - N1		RE - N3		GD - N1		GD - N3		M9 - N1		M9 - N3	
	U	R	U	R	U	R	U	R	U	R	U	R
Phloridzin	65,2	65,0	67,0	65,6	64,8	65,6	66,8	64,5	61,7	63,1	69,0	68,7
Flavonole	16,1	16,1	16,9	16,4	18,5	17,8	16,1	14,9	22,1	20,8	17,5	15,4
acyl. Flavonoide	7,5	7,0	6,1	6,3	8,7	8,3	9,1	10,1	3,3	3,1	2,3	3,0
Flavanone	6,8	6,8	6,6	7,3	1,9	1,8	2,2	2,3	3,6	3,5	3,1	3,2
p-Cumarsäurederivate	0,9	0,8	0,6	0,8	1,8	1,6	1,5	1,4	3,9	3,9	2,6	3,0
Kaffesäurederivate	1,0	1,5	0,3	1,0	0,5	0,9	0,7	2,2	0,4	0,5	0,3	0,8
Catechin + Epicatechin	0,5	0,6	0,5	0,7	0,6	0,7	0,6	1,1	0,9	1,0	1,1	1,2
Proanthocyanidine	1,4	1,5	1,3	1,4	1,8	1,7	1,5	1,7	1,9	1,8	1,8	2,0

Beim Vergleich der prozentualen Anteile (Tab. 13) wurde deutlich, dass sich der Phloridzinanteil an der Gesamtsumme bei 'Rewena' und 'Golden Delicious' zwischen den Stickstoffstufen N1 und N3 und der Reaktions- und Umgebungszone kaum unterschied. Von besonderem Interesse war der Effekt bei M9: In N1 zeigte sich ein deutlich geringerer Anteil an Phloridzin als in N3. Der prozentuale Anteil von Phloridzin an der Gesamtsumme nahm in der Umgebungszone um 7,3 %, in der Reaktionszone um 5,6 % zu (Tab. 13). Der gegenläufige Effekt konnte bei M9 für die Flavonole gezeigt werden. Hier kam es in N3 zu einer Anteilsverringerng von 4,6 % in der Umgebungszone und 5,4 % in der Reaktionszone (Tab. 13).

Beim Genotyp 'Rewena' verschob sich der Anteil an Flavonolen nach Verwundung durch die unterschiedlichen Stickstoffstufen nicht (Tab. 13).

In der Umgebungszone war im Vergleich zur Reaktionszone bei 'Golden Delicious' und M9 ein erhöhter Gehalt an Flavonolen am Gesamtgehalt nachweisbar (Tab. 13). Gleichzeitig wurde nach erhöhter Stickstoffdüngung (N3) ein geringerer Anteil an Flavonolen festgestellt (Tab. 13). Bezüglich des Flavonolanteils der Genotypen 'Golden Delicious' und M9 bewirkte die Stickstoffdüngung eine größere prozentuale Zunahme als die Veränderung von der Umgebungszone zur Reaktionszone.

Der prozentuale Anteil an acylierten Flavonoiden blieb bei M9 zwischen den Stickstoffstufen nahezu gleich, verringerte sich bei 'Rewena' von N1 zu N3 und stieg bei 'Golden Delicious' von N1 zu N3. Interessant ist, dass in M9 mit 3 % acylierten Flavonoiden der geringste Anteil an der Gesamtsumme, in 'Rewena' mit Werten um die 6 % ein doppelt so hoher Anteil und in

‘Golden Delicious’ sogar Werte bis zu 10 % acylierte Flavonoide an der Gesamtsumme nachweisbar waren (Tab. 13).

M9 hatte einen Anteil von bis zu 4 % *p*-Cumarsäurederivate (Tab. 13). ‘Golden Delicious’ zeigte einen Höchstanteil von 1,8 %, wohingegen ‘Rewena’ mit Gehalten um 0,8 % den geringsten Anteil besaß. Bei ‘Golden Delicious’ und M9 war durch Erhöhung der Stickstoffgabe (N3) eine Verringerung des Anteils nachweisbar (Tab. 13).

Akkumulationsfähigkeit

Zum Vergleich der Reaktionszone mit der Umgebungszone wurden die Gehalte der unterschiedlichen Substanzklassen in der Reaktionszone auf den Gehalt in der Umgebungszone bezogen und die prozentuale Veränderung in Tab. 14 dargestellt. Dies ist ein Maß für die Akkumulationsfähigkeit in der Reaktionszone.

Tab. 14: Prozentualer Phenylpropanoidgehalt in der Reaktionszone nach Verwendung bezogen auf die jeweiligen Werte der Umgebungszone (100%); ‘Rewena’, ‘Golden Delicious’ und M9; s=Standardabweichung

Gehalt in R in % U	RE - N1		RE - N3		GD - N1		GD - N3		M9 - N1		M9 - N3	
	%	s	%	s	%	s	%	s	%	s	%	s
Phloridzin	90,8	11,6	76,8	8,3	87,4	5,7	71,9	4,3	82,4	10,9	76,5	19,0
Flavonole	91,3	33,0	75,9	16,5	83,2	12,1	69,0	6,6	75,8	9,4	67,4	32,1
acyl. Flavonoide	85,2	23,9	80,7	15,9	83,2	16,2	83,0	27,4	77,2	16,3	99,7	26,1
Flavanone	90,4	40,0	87,0	28,7	81,8	30,4	79,4	41,7	77,4	11,5	78,9	44,3
<i>p</i> -Cumarsäurederivate	81,5	54,1	98,1	18,3	77,3	11,5	70,8	7,9	79,9	21,0	89,4	64,9
Kaffeesäurederivate	132,9	87,9	276,4	13,8	159,2	79,7	242,6	7,9	98,7	28,7	211,3	167,3
Catechin + Epicatechin	118,0	102,7	106,4	27,4	98,6	55,7	129,4	51,6	83,0	7,6	87,8	30,8
Proanthocyanidine	99,9	41,1	79,4	18,3	81,3	27,0	82,3	26,7	80,4	6,3	84,7	27,1
Summe	91,0	19,8	78,5	11,7	86,4	7,3	74,5	7,9	80,5	10,8	76,9	22,4

Aus den in Tabelle 14 dargestellten Gehaltsveränderungen in der Reaktionszone bezogen auf die Umgebungszone wurde eine Akkumulation beim Genotyp ‘Rewena’ nur für die Kaffeesäurederivate und die monomeren Flavan 3-ole gezeigt. Dieser Effekt war unabhängig von der Stickstoffstufe, bei N3 kam es aber zur deutlich stärkeren Akkumulation von Kaffeesäurederivaten.

Für den Genotyp ‘Golden Delicious’ wurde ein identisches Akkumulationsverhalten für die Kaffeesäurederivate gezeigt (Tab. 14). Catechin und Epicatechin reicherten sich jedoch nur in der Reaktionszone der Stickstoffstufe N3 an.

Gehaltszunahmen konnten bei M9 für Catechin und Epicatechin nicht gezeigt werden (Tab. 14). Allerdings wurde eine Akkumulation auf 211 % bezogen auf die Umgebungszone bei den Kaffeesäurederivaten nachgewiesen (Tab. 14). Diese Anreicherung war aber auf die Stickstoffstufe N3 begrenzt.

Für alle anderen Substanzklassen wurden keine Akkumulationen festgestellt (Tab. 14). Dennoch konnte für `Rewena` und M9 ein erheblich geringerer Gehaltsverlust an *p*-Cumarsäurederivaten in der Stickstoffstufe N3 gezeigt werden als in N1 (Tab. 14). Dieser Effekt war für M9 auch für die acylierten Flavonoide und die monomeren Flavan 3-ole zu finden (Tab. 14).

Bei der Betrachtung der Gehaltsveränderungen der Gesamtsummen fiel ein für alle drei Genotypen einheitlicher Effekt durch die Stickstoffversorgung auf. Die Gehalte bezogen auf die Umgebungszone lagen in der Stickstoffstufe N1 immer deutlich über den Gehalten in der Stickstoffstufe N3 (Tab. 14).

3.3 Wirt-Parasit-Interaktion

Zur Untersuchung der Veränderungen, die im Rahmen der Wirt-Parasit-Interaktion zwischen Apfel und *Phytophthora* im Rindengewebe des Apfels stattfinden, wurden die Aktivitäten der β -1,3-Glucanasen und Chitinasen, die Wirkung des gereinigten Kulturfiltrats von *Phytophthora cactorum*, der Einfluss der Position der Infektion am Stamm auf die Pathogenese und jeweils die Veränderungen im Sekundärstoffwechsel unter veränderten Ressourcenbedingungen nach Infektion untersucht.

Allen Ergebnissen liegen, sofern nicht gesondert beschrieben, unabhängige Wiederholungen an drei Bäumen eines Klons zugrunde. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung.

3.3.1 Veränderung des Gesamtproteingehalts durch Stickstoffdüngung bei `Rewena` und `Golden Delicious`

Zur Untersuchung des Einflusses der Stickstoffdüngung auf den Proteingehalt in der Phloemkambialschicht nach Infektion und der Klärung der Chitinase- und β -1,3 -Glucanaseaktivität nach Infektion wurden Bäume der beiden Genotypen `Golden Delicious` und `Rewena` mit der Korkbohrermethode mit *Phytophthora cactorum* inokuliert und sowohl Reaktions- als auch Umgebungszone analysiert.

Weil der Pathogenstamm BBA 64197 nicht deutlich sichtbar infiziert hatte, wurde nochmals mit dem *Phytophthora cactorum*-Stamm Iso 2 nachinokuliert. Die Versuchsdauer lag bei 4 Wochen.

Die Pathogene wurden auf dem synthetischen Medium MK gezogen. Die Medienkontrollen wurden mit MK-Medium vorgenommen.

Die Pathogenkombination der beiden Stämme verursachte gleichmäßige nekrotische Ränder von etwa 2 mm um die Infektionsstellen.

Genotyp `Rewena`

Der Gesamtproteingehalt im Bast und Phloem von `Rewena` lag in der Winterruhe bei einem Gehalt zwischen 0,2 bis 0,3 mg Protein/g TS (Abb. 17). Ein Effekt durch die unterschiedliche Versorgung mit Stickstoff war nicht nachweisbar (Abb. 17).

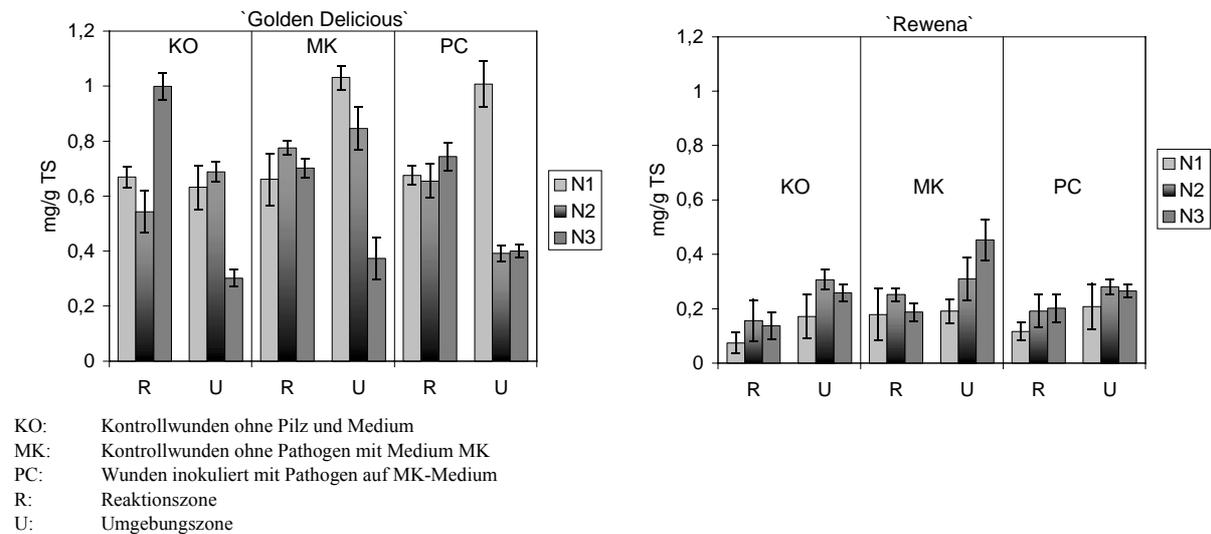


Abb. 17: Proteingehalt der Phloemkambialschicht der beiden Genotypen 'Golden Delicious' und 'Rewena'

Genotyp 'Golden Delicious'

Im Genotyp 'Golden Delicious' schwankten die Werte um einen Wert von 0,6 mg/g TS. Die Schwankungen zwischen den unterschiedlichen Stickstoffstufen innerhalb der einzelnen Varianten waren teilweise deutlich, dennoch ließ sich kein klares einheitliches Bild finden (Abb. 17).

Bei der Stickstoffstufe N1 zeigte sich eine Anreicherung in der Mediumkontrolle MK und in der *Phytophthora*-Variante in der Umgebungszone: Von den sonst einheitlichen Werten um 0,65 mg/g TS stiegen die Werte auf Gehalte um 1,0 mg/g TS (Abb. 17).

Ein gegenteiliges Bild zeichnete sich bei der Stickstoffstufe N3 ab: Hier zeigten sich bei allen Varianten in der Umgebungszone geringere Werte als in der Reaktionszone. Gleichzeitig reagierte die Reaktionszone in der Stickstoffstufe N3 auf die Verwundung in der Kontrollvariante mit einer Akkumulation der Proteine auf einen Gehalt von 1,0 mg/g TS (Abb. 17).

Bei den Stickstoffstufen N1 und N2 waren zwischen den Kontrollvarianten und der *Phytophthora*-Variante in der Reaktionszone keine Unterschiede zu sehen. Bei der Stickstoffstufe N3 zeigte sich eine Verringerung des Proteingehaltes von der Kontrollvariante zur MK- und *Phytophthora*-Variante (Abb. 17).

3.3.2 Veränderungen der Chitinase- und β -1,3-Glucanaseaktivität durch Stickstoffdüngung bei den Genotypen `Rewena` und `Golden Delicious`

Das Material, bei dem der Proteingehalt bestimmt wurde (Kapitel 3.3.1), stellte auch die Basis für die Versuche zu den Enzymaktivitäten dar.

3.3.2.1 Chitinaseaktivität

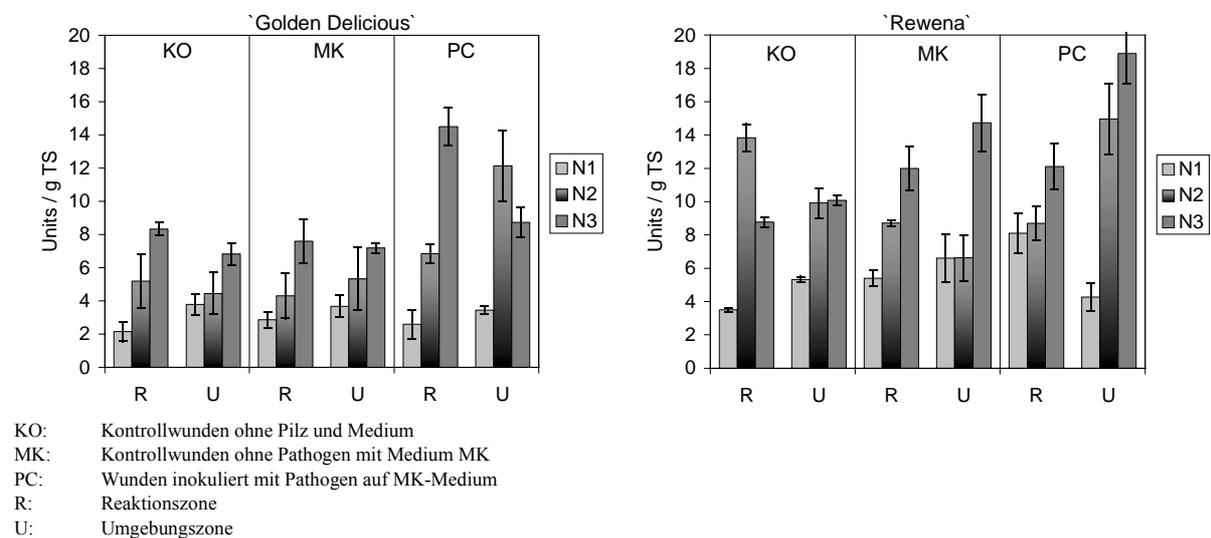


Abb. 18: Chitinaseaktivität in der Phloemkambialschicht der Genotypen `Golden Delicious` und `Rewena`

Bei der Chitinaseaktivität zeigte sich für beide Genotypen eine Abhängigkeit von der Stickstoffstufe. Nur der Wert bei `Golden Delicious` in der Umgebungszone der mit *Phytophthora* inokulierten Variante war bei N2 höher als in N1 und N3. Die Werte streuten zwischen 2 und 8 U/g TS (Abb. 18).

Im Gegensatz dazu streuten die leicht erhöhten Werte des Genotyps `Rewena` zwischen 4 und 14 U/g TS (Abb. 18). Eine Ausnahme bildete hier die Reaktionszone in der Kontrollvariante bei N2, die deutlich über den Werten von N1 und N3 lag.

Auffällige Ergebnisse waren der generell höhere Level der Chitinaseaktivität beim Genotyp `Rewena` und die Erhöhung der Aktivität durch die höhere N-Stufe bei beiden Genotypen (Abb. 18).

Außerdem waren nach Infektion (PC) an `Golden Delicious` für die Stickstoffstufen N2 und N3 Aktivitätssteigerungen gegenüber den MK-Kontrollen zu verzeichnen (Abb. 18).

3.3.2.2 β -1,3-Glucanaseaktivität

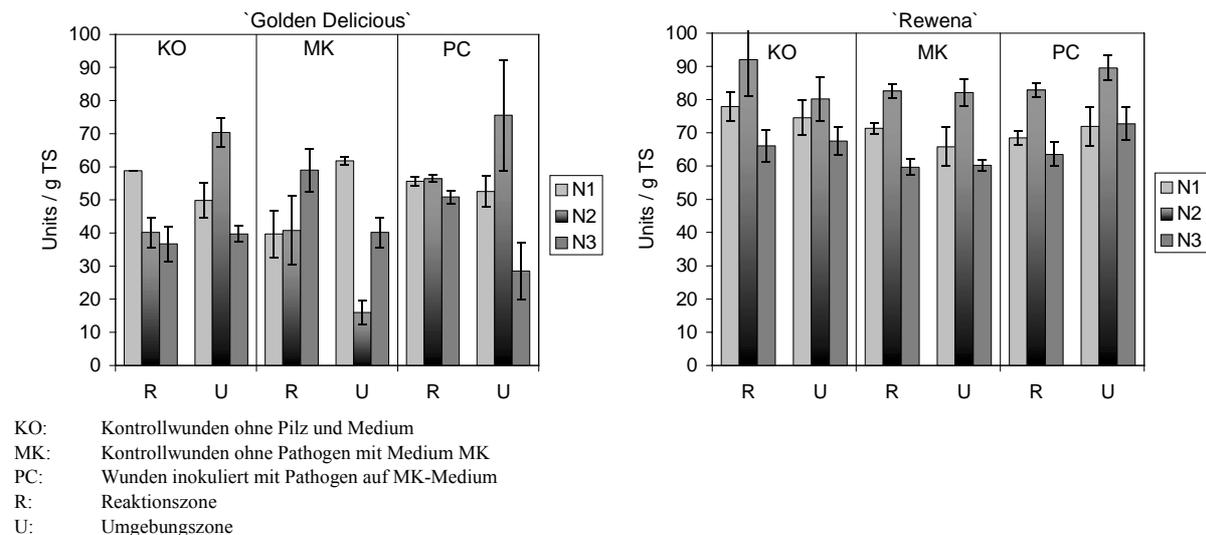


Abb. 19: β -1,3-Glucanaseaktivität in der Phloemkambialschicht der Genotypen `Golden Delicious` und `Rewena`

`Golden Delicious`

Die β -1,3-Glucanaseaktivität bei `Golden Delicious` zeigte keinen durchgehenden Stickstoffeinfluss (Abb. 19). Während in der Variante der Kontroll-Reaktionszone ein scheinbar negativer Effekt durch die N-Steigerung zu finden war, lagen die Werte in der *Phytophthora*-Variante der Reaktionszone um einen einheitlichen Wert (Abb. 19). Bei direktem Vergleich zeigten sich sogar Zunahmen in der Aktivität bei den Stickstoffstufen N2 und N3. Die höhere Aktivität in der Mediumkontrolle im Vergleich zur Kontrollvariante bei N3 deutete auf einen Mediumeffekt hin, der allerdings innerhalb des Versuchs durch andere Varianten nicht bestätigt wurde.

Der Vergleich zwischen Reaktions- und Umgebungszone zeigte bei N1 in der Kontrollvariante und der *Phytophthora*-Variante keinen Unterschied, bei der Mediumkontrolle MK ein Aktivitätsanstieg (Abb. 19). Bei N2 war in der Umgebungszone bei der Kontrollvariante und der *Phytophthora*-Variante eine Zunahme der Aktivität zu verzeichnen, bei der Medium-

kontrolle eine Abnahme. N3 zeigte bei der Kontrollvariante gleichmäßig niedrige Werte, aber bei der Mediumkontrolle und der *Phytophthora*-Variante eine Aktivitätssteigerung in der Reaktionszone im Vergleich zur Umgebungszone (Abb. 19).

`Rewena`

Bei der Glucanaseaktivität des Genotyps `Rewena` zeigte sich eine Streuung um einen relativ gleichmäßigen Wert, der aber mit 70 U/g TS deutlich über den Werten bei `Golden Delicious` lag (Abb. 19). Die unterschiedlichen Varianten und die unterschiedlichen Analysezeiten haben keinen Einfluss auf die Glucanaseaktivität. N2 besaß eine leicht erhöhte Aktivität gegenüber N1 und N3.

Auffällige Ergebnisse waren zum einen die erhöhte Aktivität bei `Rewena`, zum anderen die starke Streuung beim Genotyp `Golden Delicious` (Abb. 19). Außerdem konnte keine Induktion nach Infektion mit *Phytophthora cactorum* nachgewiesen werden.

3.3.3 Wirkungen des gereinigten Kulturfiltrats

Um die Wirkung des Elicitins Cactorein auf das Rindengewebe von Apfel zu untersuchen, wurde nach Flüssigmediumkultur das Kulturfiltrat in einigen Reinigungsschritten konzentriert (Kap. 2.6).

Im Gegensatz zu den meisten in der Literatur beschriebenen inkompatiblen Reaktionen bei Wirt-Pathogen-Interaktionen, wurde sich bei den folgenden Untersuchungen auf die nachgewiesenermaßen kompatible Interaktion zwischen dem *Phytophthora cactorum* - Stamm Iso 2 und seinem Wirt *Malus domestica* `Topaz` konzentriert. Der Stamm wurde von `Topaz` isoliert und verursachte auch nach künstlicher Infektion heftige Nekrosen. Zum Nachweis des Elicitins wurde das aufgereinigte Kulturfiltrat in Tabakblätter injiziert. In folgendem Schema sind die Untersuchungen zur Wirkung des Elicitins dargestellt (Abb. 20).

Untersuchungen zur Wirkung des Elicitins

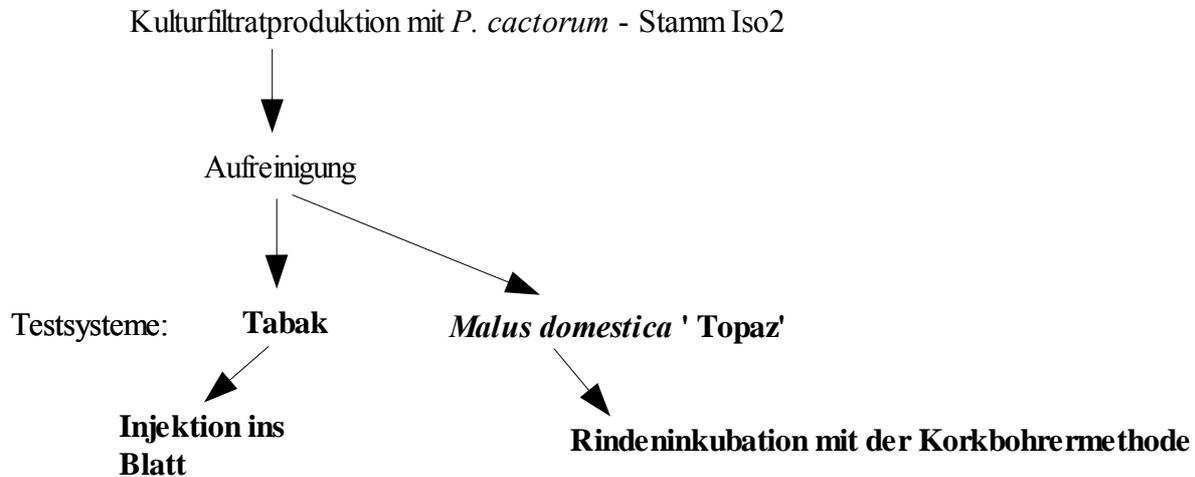


Abb. 20: Schema zu den Untersuchungen zur Wirkung des Elicitins

3.3.3.1 Wirkung auf Tabak

Für den Nachweis des Elicitins wurden Tabakpflanzen der Sorte 'Bel W3', die durch ihre hohe Anfälligkeit gegenüber Ozon zur Überwachung der Luftqualität eingesetzt werden, verwendet. Nach der Methode von KOEHL (2002) wurden Blätter mit einer Nadel durchstochen und mittels einer stumpfen Spritze das aufgereinigte Kulturfiltrat in die Interzellularen infiltriert. Dies geschieht mit sanftem Gegendruck eines Fingers von der anderen Seite des Tabakblattes. Die Interzellularräume füllen sich sehr schnell mit der Flüssigkeit, was durch das Aufhellen unter Licht nachzuweisen ist (Abb. 21). Die Kontrollen wurden mit Wasser behandelt. Die Pflanzen wurden bei Schwachlicht (dicht bewölkter Oktobertag ohne Sonne) am Fensterbrett gehalten.

Ergebnisse

Nach 4 Stunden waren keine Unterschiede zwischen der Elicitinvariante und der Wasserkontrolle sichtbar.

21 Stunden nach Infiltration war bei den mit Kulturfiltrat behandelten Varianten eingefallenes und schon nekrotisches Gewebe sichtbar (Abb. 22). Die Wasserkontrollen zeigten kein eingefallenes Gewebe. Um die Einstichstelle waren keine größeren Nekrosen zu sehen. Das Wasser in den Interzellularen war bereits von der Pflanze aufgenommen oder über die Stomata verdunstet und im Lichttest war keine Aufhellung mehr zu sehen.

Bei den Wasservarianten zeigten sich auch nach 45 Stunden keine weiteren Veränderungen mehr. Hingegen waren die eingefallenen Gewebeteile bei den Kulturfiltratvarianten inzwischen gänzlich nekrotisch (Abb. 23).



Abb. 21: Veränderte Lichtdurchlässigkeit eines Tabakblattes nach Infiltration

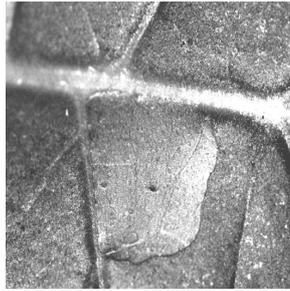


Abb. 22: Tabakblatt 21 h nach Einleitung des aufgereinigten Kulturfiltrats von *Phytophthora cactorum* Iso 2

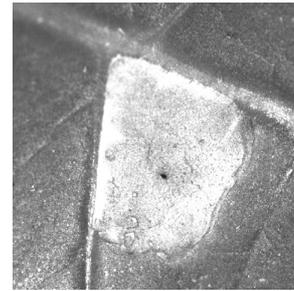


Abb. 23: Tabakblatt 45 h nach Einleitung des Kulturfiltrats

3.3.3.2 Wirkung auf den Phenylpropanoidstoffwechsel in der Rinde von *Malus domestica* `Topaz`

Bäume des Genotyps `Topaz` wurden mittels Korkbohrermethode am Stamm in standardisierter Form verletzt, das aufgereinigte Kulturfiltrat auf Filterpapierbrücken in die Wunden gebracht und diese steril verbunden (siehe Kap. 2.9). Als Kontrollen dienten Wunden, die mit autoklaviertem Wasser behandelt wurden. Nach 14 Tagen wurde die Wirkung des Kulturfiltrats auf den Phenylpropanoidstoffwechsel untersucht.

Dabei zeigten sich die in Abb. 24 dargestellten Unterschiede. Es wurde eine Erhöhung im Gehalt an Chlorogensäure, Epicatechin und den drei nicht identifizierten Substanzen 2, 7 und 11 nach Behandlung mit dem gereinigten Kulturfiltrat festgestellt (Abb. 24). Die Menge an Naringenin 7-glucosid nahm ebenfalls tendenziell zu.

Anzumerken bleibt, dass durch die Elicitinbehandlung ansonsten keine nachweisbaren Veränderungen im Phenylpropanoidmetabolismus zu beobachten waren.

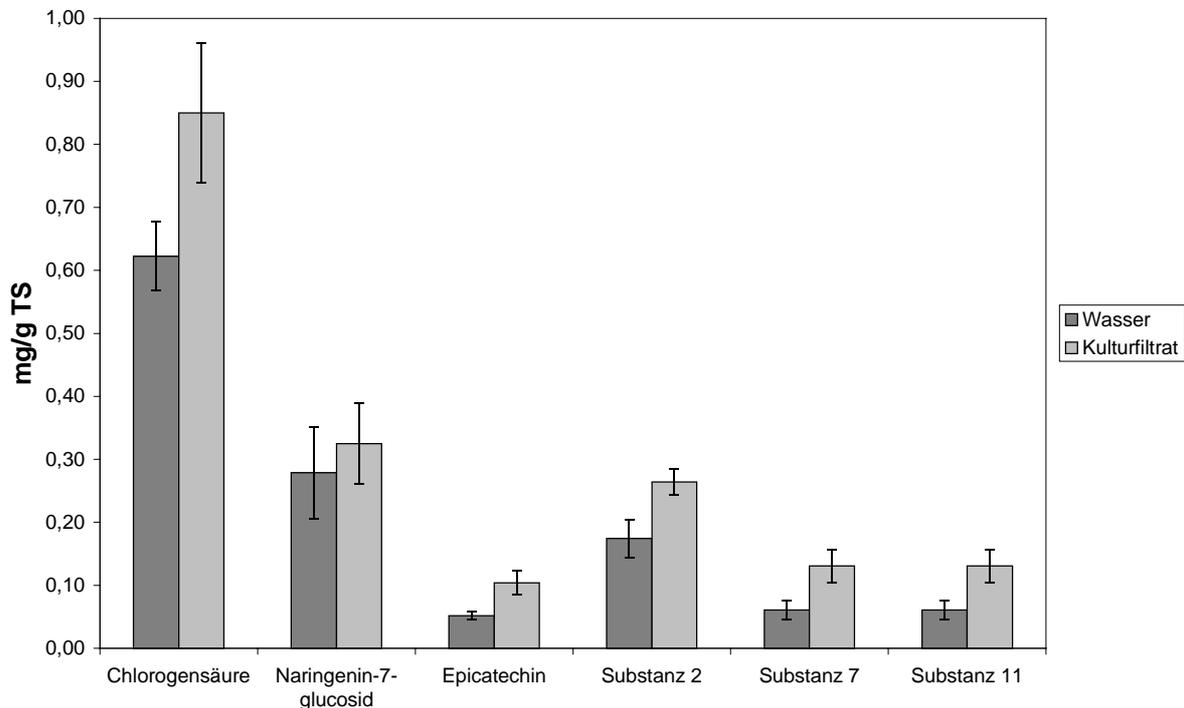


Abb. 24: Veränderungen im Phenylpropanoidgehalt in der Reaktionszone bei 'Topaz' nach Infiltration mit aufgereinigtem Kulturfiltrat von *Phytophthora cactorum* Iso 2

3.3.3.3 Resistenzveränderung durch das gereinigte Kulturfiltrat

Bei Tabak wird durch Elicidine von verschiedenen *Phytophthora*-Arten systemische Resistenz ausgelöst. An Apfel wurde dies noch nicht untersucht. Deshalb stellt sich die Frage, ob das gereinigte Kulturfiltrat, das das Elicitin enthält, in der Lage ist, systemische Resistenz bei Apfel zu induzieren.

Dazu wurde die Rinde von Bäumen der Sorte 'Topaz', die unterschiedlich mit Stickstoff versorgt wurden, mittels Korkbohrermethode und Filterscheiben mit dem gereinigten Kulturfiltrat infiltriert (Abb. 26; Kap. 2.9). Als Kontrollen dienten mit autoklaviertem Wasser infiltrierte Wunden. Nach 7 Tagen wurden in 3 mm Abstand wiederum mittels Korkbohrermethode Rindenscheiben entfernt und mit *Phytophthora cactorum* Iso 2 inokuliert. Nach erneuten 11 Tagen wurde nach Entfernen der Epidermis die nekrotische Fläche der Rindenzone bestimmt, die das Pathogen zum Absterben gebracht hat (Abb. 26).

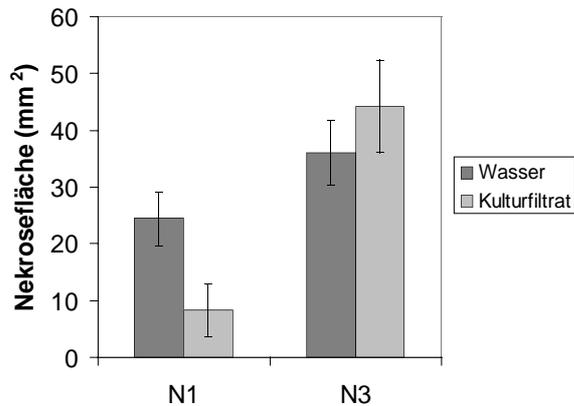


Abb. 25: Nekrosenfläche bei 'Topaz' nach vorheriger Behandlung mit aufgereinigtem Kulturfiltrat von *Phytophthora cactorum* Iso 2

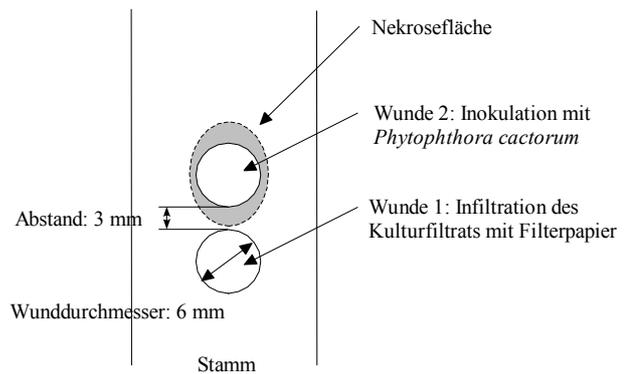


Abb. 26: Versuchsanordnung zur Untersuchung der systemischen Resistenz an 'Topaz'

Nach Infektion mit *Phytophthora cactorum* Iso 2 zeigten sich in der moderat mit Stickstoff versorgten Variante N1 deutlich geringere Nekrosenflächen nach Infiltration des aufgereinigten Kulturfiltrats als nach Infiltration mit autoklaviertem Wasser (Abb. 25). Hier war eine deutlich geringere Anfälligkeit gegenüber dem Pathogen nachweisbar, wenn zuvor mit dem elicitinhaltigen Kulturfiltrat behandelt worden ist.

In der Stickstoffstufe N3 war der Effekt der Resistenzbildung durch das Kulturfiltrat jedoch nicht nachweisbar. Hier zeigte sich nach Vorbehandlung mit dem Kulturfiltrat sogar eine tendenziell höhere Anfälligkeit als nach Vorbehandlung mit Wasser (Abb. 25).

3.3.4 Einfluss der Position der Infektion am Stamm

Weil in unterschiedlichen Positionen am Stamm Infektionen vorgenommen wurden, war die Frage nach einem möglichen Einfluss durch die Position am Stamm auf das Abwehrverhalten zu untersuchen.

3.3.4.1 Anfälligkeit der Apfelrinde gegen *Phytophthora cactorum* in Abhängigkeit von der Position der Verwundung am Stamm

Bäume der Genotypen 'Golden Delicious', 'Rewena' und M9 wurden in der Winterruhe mit dem *Phytophthora*-Stamm Pt8 inokuliert, nach 4 Wochen Versuchsdauer wurde der Bereich um die Infektionsstellen, der vom Pathogen abgetötet wurde (Abb. 27, schematisch: Abb. 4)

gemessen. Dabei wurde die Länge und die Breite der Nekrosenfläche bestimmt, mittels der Ellipsengleichung die Fläche berechnet und davon die Fläche des bei der Inokulation entfernten Rindescheibchens subtrahiert. Vor der Messung wurde die Epidermis der Rinde entfernt, um den Bereich der Nekrosenfläche deutlich abgrenzen zu können. Die Bereiche um die Nekrosen wurden auf Metabolite des Phenylpropanoidstoffwechsels untersucht.



Abb. 27: Nekrotische Abgrenzung nach Infektion bei 'Golden Delicious'; oben: N3, unten: N1

Pro Baum wurden 3 Verwundungen in unterschiedlichen Höhen gesetzt, wovon eine mit dem Pathogen inokuliert wurde, eine weitere zur Kontrolle mit Medium und die dritte zur Untersuchung der reinen Wundreaktion diente. Um den Einfluss der unterschiedlichen Positionen zu untersuchen, wurden die Inokulationen gleichmäßig auf die unterschiedlichen Positionen verteilt. Es wurden Bereiche gewählt, die keinerlei Vernarbungen durch alte Wunden und abgetrennte Zweige aufwiesen. Aus diesem Grund kam es von Baum zu Baum zu Verschiebungen in der Position der einzelnen Wunden an den Bäumen.

Die Werte der Nekrosenflächen wurden in 3 Klassen aufgeteilt: Als Klasse 1 wurden Wunden mit einem Abstand von bis zu 12,5 cm von der Stammbasis, als Klasse 2 Wunden im Abstand von 12,5 cm bis 25 cm und als Klasse 3 Wunden mit einem Abstand über 25 cm von der Stammbasis zusammengefasst. Der Abstand von der Stammbasis ist für die veredelten Genotypen 'Rewena' und 'Golden Delicious' als Abstand zur Veredlungsstelle definiert worden. Die Untersuchungen wurden an Bäumen vorgenommen, die unterschiedlich mit Stickstoff versorgt waren. In Abbildung 28 sind die Mittelwerte der jeweiligen Klassen und Stickstoffstufen dargestellt. Wenige Klassen enthielten nur einen Wert. Aus diesem Grund konnte zum Teil keine Standardabweichung dargestellt werden.

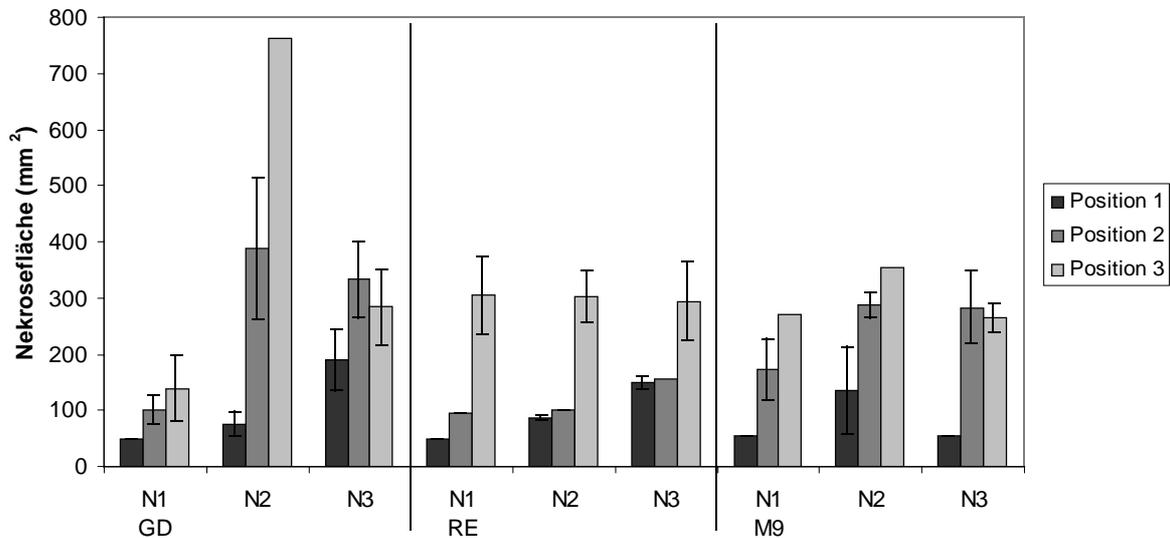


Abb. 28: Nekrosenflächen 4 Wochen nach Infektion mit *Phytophthora*-Stamm Pt8 an den Genotypen 'Rewena', 'Golden Delicious' und M9

Neben den Stickstoffeffekten, die vor allem in der Klasse 1 unterhalb von 12,5 cm bei 'Rewena' und 'Golden Delicious' zu sehen waren, zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Positionen. Dabei waren in Position 2 bei 'Golden Delicious' und M9 immer größere Nekrosenflächen als die Klasse 1 zu finden. Die Unterschiede zwischen den Positionsklassen 2 und 3 sind bei M9 teilweise nur sehr gering (Abb. 28, Stickstoffstufe N2 Klasse 3). Beim Genotyp 'Rewena' unterschieden sich die Nekrosenflächen der Positionsklassen 1 und 2 in den einzelnen Stickstoffstufen nur wenig. Es war sowohl ein Stickstoffeffekt als auch ein sehr leichter Positionseffekt zu sehen. Dagegen nivellierte sich der Stickstoffeffekt in Positionsklasse 3 und ein Effekt der Position wird beim Vergleich mit den Positionsklassen 1 und 2 deutlich.

Die weiteren Betrachtungen konzentrierten sich auf die Werte der Positionsklasse 1 und 2, die sich auf den Bereich bis 25 cm Entfernung von der Stammbasis bezogen. Zum einen zeigten sich bei weiterer Entfernung extreme Werte für die Nekrosenflächen, zum anderen stellte der Bereich mit einer Entfernung von mehr als 25 cm von der Stammbasis einen Bereich an der Pflanze dar, in dem *Phytophthora cactorum* nicht den höchsten Infektionsdruck besitzt.

Genotypeinfluss auf die Ausbildung der Nekrosenflächen

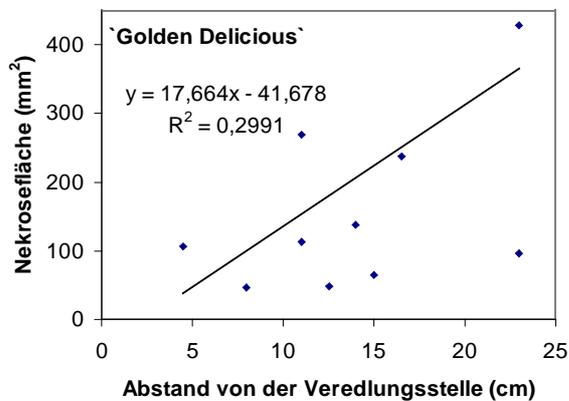


Abb. 29: Nekrosenfläche in Abhängigkeit von der Entfernung zur Stammbasis bei 'Golden Delicious'

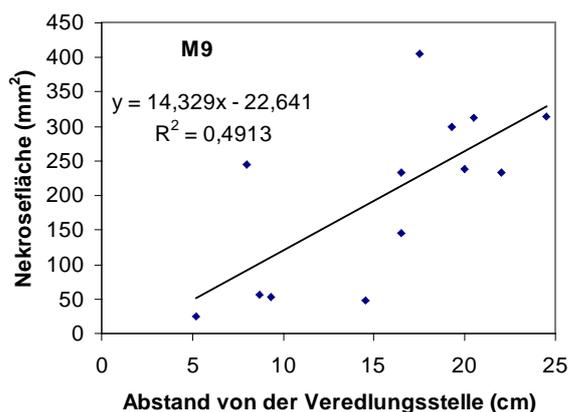


Abb. 30: Nekrosenfläche in Abhängigkeit von der Entfernung zur Stammbasis bei M9

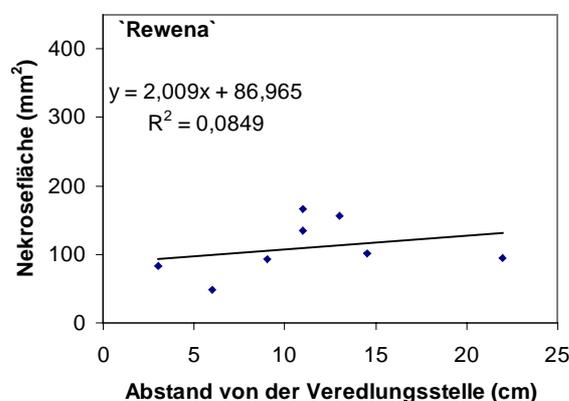


Abb. 31: Nekrosenfläche in Abhängigkeit von der Entfernung zur Stammbasis bei 'Rewena'

Zur Betrachtung des Sorteneinflusses auf den Zusammenhang zwischen dem Abstand von der Stammbasis und der Nekrosenfläche wurden alle Ergebnisse eines Genotyps ohne eine Trennung der Stickstoffstufen zusammengefasst und mittels Regressionsanalysen untersucht. Dabei ergeben sich die in Abbildungen 29, 28 und 30 dargestellten Zusammenhänge.

'Golden Delicious'

Für den Genotyp 'Golden Delicious' wurde eine Regression mit einer Steigung von $17,7 \text{ mm}^2/\text{cm}$ errechnet (Abb. 28). Diese Steigung ist im Vergleich mit den anderen Genotypen die höchste, das Bestimmtheitsmaß von 30 % macht aber deutlich, dass der Zusammenhang zwischen Nekrosenfläche und dem Abstand zur Veredlungsstelle bei der Sorte 'Golden Delicious' eher gering war. Bei einer Betrachtung der Daten in Abbildung 28 wird klar, dass für 'Golden Delicious' ein starker Stickstoffeinfluss angenommen werden kann.

M9

Der Zusammenhang zwischen der Nekrosenfläche und dem Abstand zur Stammbasis war bei M9 mit einem Bestimmtheitsmaß von 49 % deutlich höher

als bei `Golden Delicious` und `Rewena` (Abb. 30). Trotz eines deutlichen Stickstoffeinflusses (Abb. 28) ließen sich 49 % der Nekrosenflächenzunahme durch die Zunahme der Distanz zur Stammbasis erklären.

`Rewena`

Mit einem Bestimmtheitsmaß von 8,5 % und einer Steigung der Regressionsgeraden von 2 mm²/cm war der Zusammenhang zwischen der Nekrosenfläche und dem Abstand der Verwundung von der Veredlungsstelle als sehr gering einzustufen. Von besonderer Bedeutung war beim Vergleich von Abb. 31 und Abb. 28, dass sich in einem Bereich über 25 cm von der Entfernung der Veredlungsstelle die Nekrosenfläche verdoppelte. Gleichzeitig ist aber im Bereich unter 25 cm kein Einfluss der Position auf die Anfälligkeit zu erkennen. Die Zunahme der Nekrosenfläche war mit steigender Stickstoffstufe im Bereich bis 25 cm aus Abb. 28 deutlich ersichtlich.

Einfluss der Stickstoffdüngung auf die Nekrosenfläche

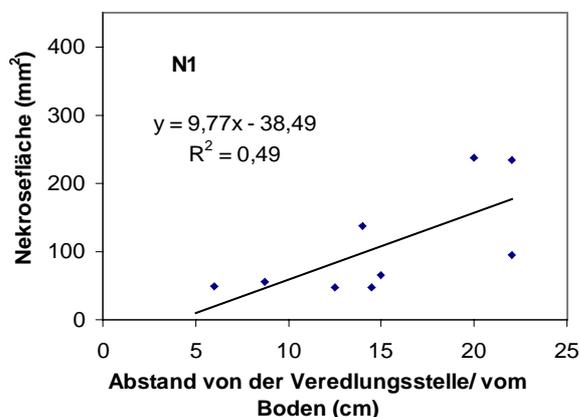


Abb. 32: Nekrosenfläche in Abhängigkeit vom Abstand von der Stammbasis bei der Stickstoffstufe N1 (`Rewena`, `Golden Delicious`, M9; unter 25 cm)

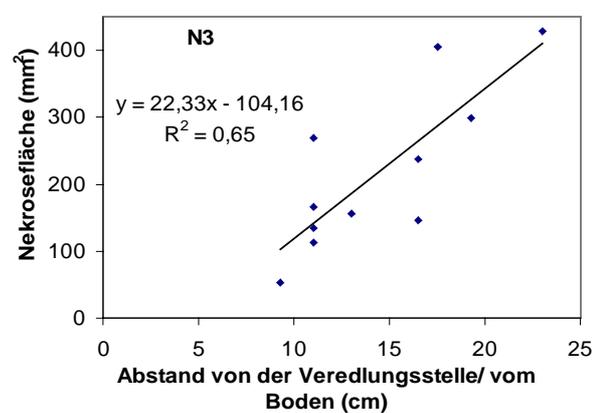


Abb. 33: Nekrosenfläche in Abhängigkeit vom Abstand von der Stammbasis bei der Stickstoffstufe N3 (`Rewena`, `Golden Delicious`, M9; unter 25 cm)

Fasst man die Ergebnisse der drei Genotypen zusammen und untersucht den Einfluss der Stickstoffdüngung auf *Malus domestica*, so ergaben sich die beiden oben dargestellten Zusammenhänge (Abb. 32 und 33). Anhand der durchgeführten Regressionsanalysen zeigt sich, dass der Einfluss der Position auf die Nekrosenfläche in der Stickstoffstufe N1 mit

einem Bestimmtheitsmaß von 49 % einen deutlich geringeren Einfluss auf die Nekrosenfläche hatte als in der Stickstoffstufe N3, bei der ein Bestimmtheitsmaß von 65 % gefunden wurde. Allein die Steigung der Regressionsgerade bei N3 ist um mehr als das doppelte der Steigung bei N1 erhöht. Mit zunehmender Stickstoffgabe wurden die Bäume einerseits anfälliger (Abb. 28) und andererseits nahm die Anfälligkeit mit steigender Distanz zur Stammbasis zu.

3.3.4.2 Einfluss der Position am Stamm auf den Gehalt an Phenylpropanoiden

Der Einfluss der Position auf die Nekrosenflächen nach Infektion eröffnet die Frage nach der Abhängigkeit des Gehalts an Phenylpropanoiden vom Abstand zur Veredlungsstelle bzw. zur Stammbasis. Dazu wurden unverwundete Rindenpartien in bestimmtem Abstand von der Veredlungsstelle bzw. von der Stammbasis untersucht.

3.3.4.2.1 `Rewena` und `Golden Delicious` unter Stickstoffeinfluss

Bäume der beiden Genotypen wurden über 3 Jahre nach den in Kapitel 2.7.2 genannten Bedingungen unterschiedlich mit Stickstoff gedüngt. Es wurden die unterschiedlichen Stickstoffstufen N1, N2 und N3 untersucht. Im Winter 2002/2003 wurden Proben in 3 cm, 18 cm, 33 cm und 48 cm Abstand von der Veredlungsstelle genommen und die Bastschicht auf den Gehalt an löslichen Phenylpropanoiden analysiert.

In den Abbildungen 34 und 35 sind die Gehalte der unterschiedlichen Phenylpropanoidklassen und Gesamtsummen der beiden Genotypen in den unterschiedlichen Stickstoffstufen abhängig von ihrer Distanz von der Veredlungsstelle direkt nebeneinander dargestellt.

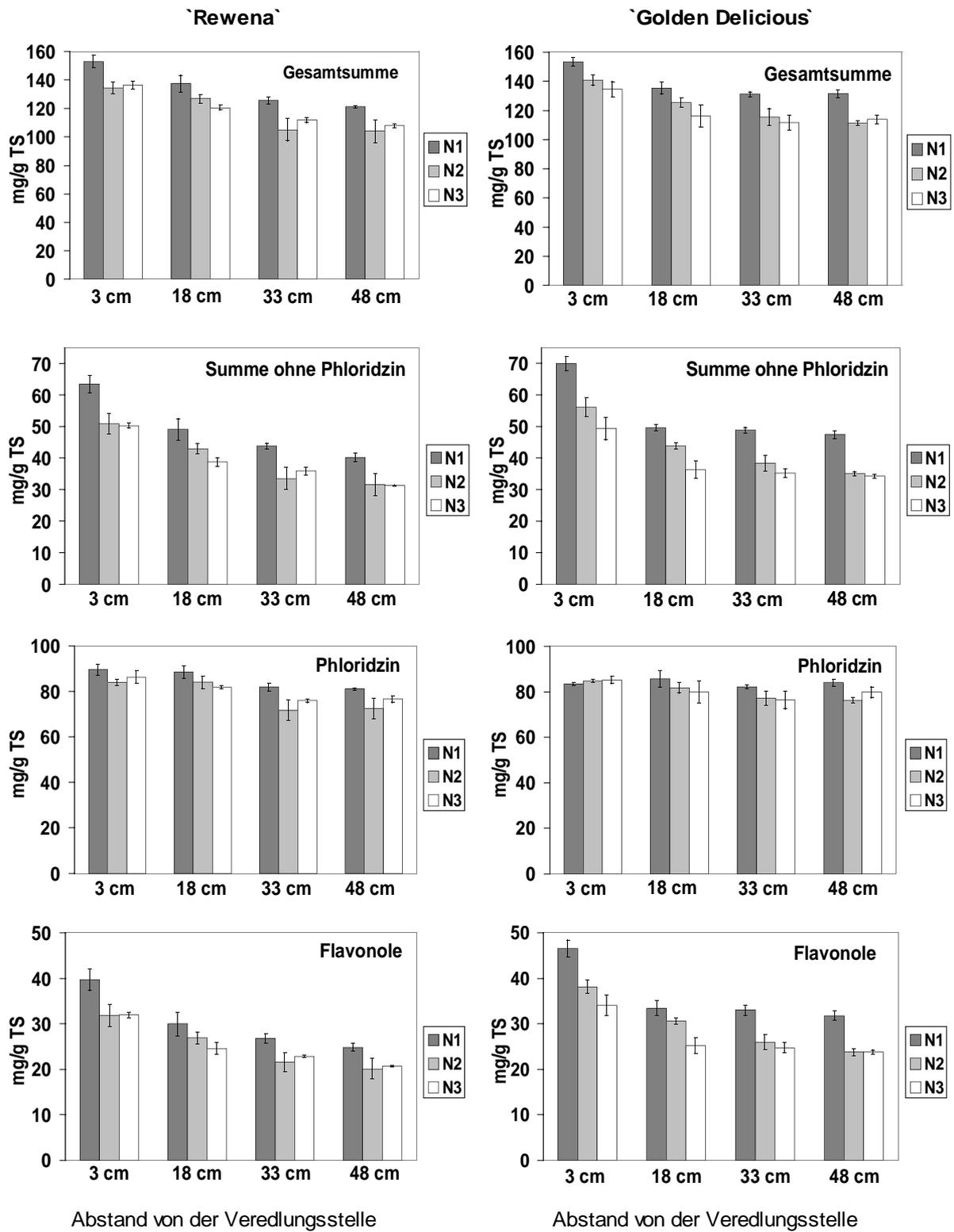


Abb. 34: Phenylpropanoidgehalte der Genotypen 'Rewena' und 'Golden Delicious' in der Rinde in Abhängigkeit vom Abstand von der Veredlungsstelle; Teil 1 – Gesamtsumme, Summe ohne Phloridzin, Phloridzin und Flavonole

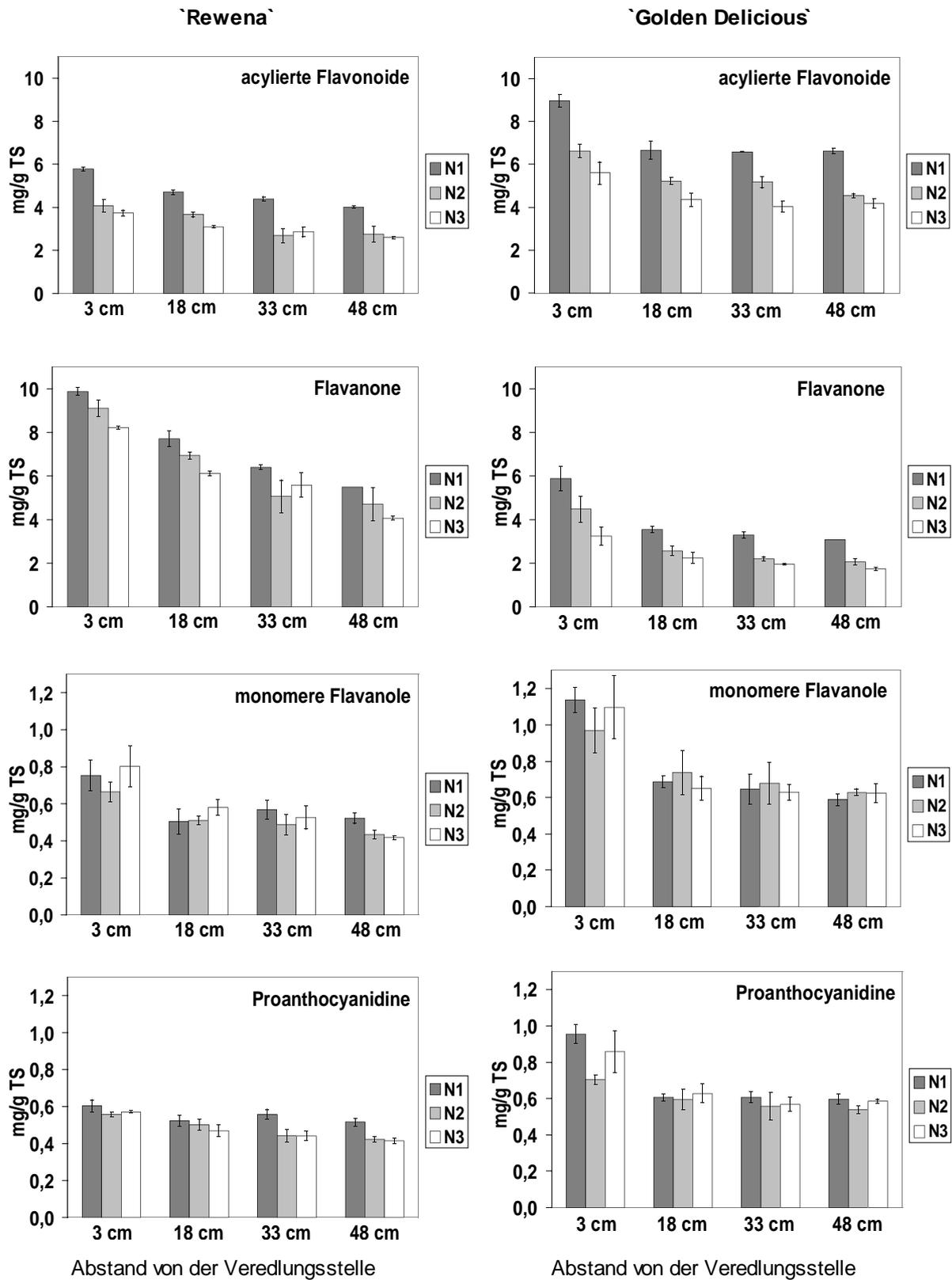


Abb. 35: Phenylpropanoidgehalte der Genotypen 'Rewena' und 'Golden Delicious' in der Rinde in Abhängigkeit vom Abstand von der Veredlungsstelle; Teil 2 - Flavanone, acylierte Flavonoide, monomere Flavanoide, Proanthocyanidine

Die Gesamtsumme an Phenylpropanoiden nahm bei `Rewena` mit zunehmendem Abstand von der Veredlungsstelle ab. Diese Abnahme setzte sich über den gesamten untersuchten Bereich gleichmäßig fort (Abb. 34; Gesamtsumme). Bei `Golden Delicious` war die Abnahme von 3 cm über der Veredlungsstelle bis 18 cm über der Veredlungsstelle am deutlichsten. Besonders zwischen den Gehalten in 33 und 48 cm Abstand waren keine Unterschiede in der Gesamtsumme nachweisbar (Abb. 34; Gesamtsumme).

Bezüglich der die Hauptphenylpropanoidkomponente in der Rinde, das Phloridzin, konnte bei beiden Genotypen kein deutlicher Einfluss durch den Abstand von der Veredlungsstelle gezeigt werden (Abb. 34; Phloridzin). Dagegen wurde bei Betrachtung der Gehalte ohne Phloridzin die gleichmäßige Abnahme bei `Rewena` im Gegensatz zu `Golden Delicious` deutlich, bei welchem sich in den Stickstoffstufen N1 und N3 die Gehalte der Positionen 18 cm, 33 cm und 38 cm nicht unterschieden (Abb. 34; Summe ohne Phloridzin). Für die Stickstoffstufe N2 zeigte sich bei `Golden Delicious` eine gleichmäßige Abnahme.

Die Positionen 3 cm über der Veredlungsstelle zeigten deutlich höhere Gehalte als die anderen Positionen (Abb. 34; Summe ohne Phloridzin und Flavonole).

Ein Sortenunterschied wurde bei den Flavonolen deutlich: `Rewena` hatte in allen Varianten geringere Gehalte als `Golden Delicious` (Abb. 34; Flavonole).

Auch der Gehalt an acylierten Flavonoiden war bei `Rewena` geringer als bei `Golden Delicious`, gleichzeitig wurde die Abnahme mit dem Abstand der ersten beiden Positionen (3 und 18 cm) vor allem bei `Golden Delicious` deutlich (Abb. 35; acylierte Flavonoide).

Bei den Flavanonen zeigte sich ein gegensätzliches Bild. Bei `Rewena` waren deutlich höhere Gehalte bei einer gleichmäßig abnehmenden Dynamik mit der Position nachweisbar. Bei `Golden Delicious` war eine Abnahme von 3 cm Abstand zu 18 cm messbar, zwischen den drei weiter von der Veredlungsstelle entfernten Positionen waren aber keine Unterschiede im Flavanongehalt vorhanden (Abb. 35; Flavanone).

Bei Betrachtung der monomeren Flavan-3-ole war bei `Golden Delicious` kein klarer Effekt durch die Stickstoffstufen aufzeigbar und nur ein deutlich höherer Gehalt in der am nächsten an der Veredlungsstelle sitzenden Position, bei 3 cm, nachweisbar (Abb. 35; monomere Flavanole).

Für die Proanthocyanidine ließ sich diese Aussage übernehmen. Die Gehalte an Proanthocyanidinen gingen bei 'Rewena' in N2 und N3 mit zunehmender Distanz von der Veredlungsstelle leicht zurück, blieben bei N1 aber gleich (Abb. 35; Proanthocyanidine).

Insgesamt war eine deutliche Abnahme bei einer Reihe von Phenylpropanoiden mit zunehmender Distanz von der Veredlungsstelle nachweisbar. Dieser Effekt war besonders in den ersten 18 cm evident, setzte sich bei einigen Stoffgruppen aber auch darüber hinaus fort.

3.3.4.2.2 MM106

Beim Genotyp MM106 wurden vergleichbare Untersuchungen angestellt, allerdings ohne den Einfluss der Stickstoffdüngung zu eruieren. Gleichzeitig handelte es sich bei der Unterlage um

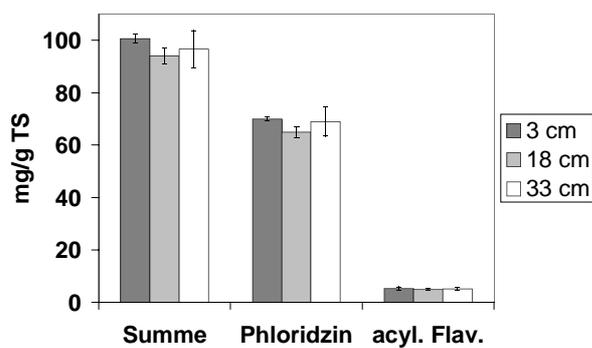


Abb. 36: Gesamtgehalt, Gehalt an Phloridzin und acylierten Flavonoiden in Abhängigkeit vom Abstand zur Stammbasis beim Genotyp MM106

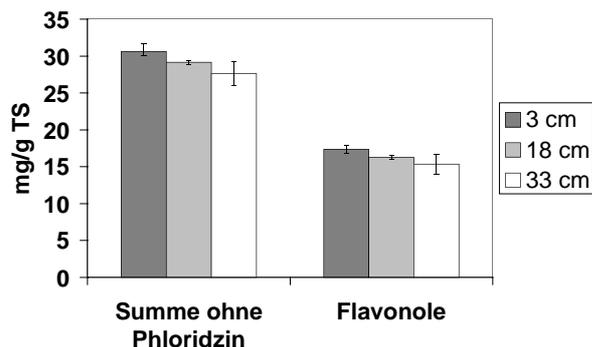


Abb. 37: Gehalt an Phenylpropanoiden ohne Phloridzin und Flavanolgehalt in Abhängigkeit vom Abstand zur Stammbasis beim Genotyp MM106

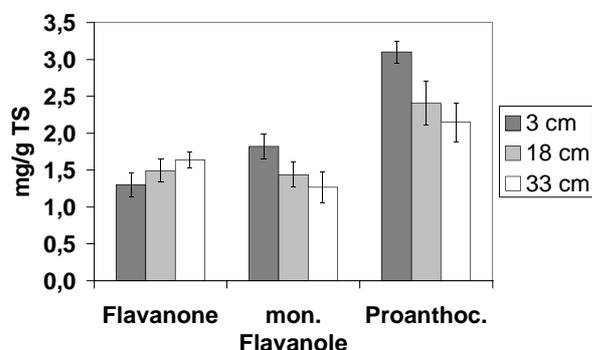


Abb. 38: Gehalte an Flavanonen, monomeren Flavanolon und Proanthocyanidinen in Abhängigkeit vom Abstand zur Stammbasis beim Genotyp MM106

wurzelechte Bäume. Somit konnten bei diesen Daten Veredlungseffekte ausgeschlossen werden.

Bei MM106 zeichneten sich bei der Summe der löslichen Phenylpropanoide, beim Phloridzin und den acylierten Flavonoiden sehr undeutliche Positionseffekte ab (Abb. 36).

Die Summe ohne Phloridzin und die Flavanole zeigten eine leichte Abhängigkeit von der Position. Beide nahmen mit zunehmender Distanz von der Stammbasis ab (Abb. 37).

Ebenso verhielten sich die monomeren Flavan 3-ole und Proanthocyanidine (Abb. 38). Bei diesen beiden Substanzklassen war die Abnahme im Gehalt mit Zunahme des Abstands von der Stammbasis am gravierendsten.

Der Gehalt an Flavanonen verhielt sich bei MM106 gegenläufig und stieg mit zunehmender Distanz von der Stammbasis an (Abb. 38).

3.3.5 Veränderte Gehalte an Phenylpropanoiden nach Infektion

Zur Untersuchung des Einflusses des Pathogens auf den Phenylpropanoidstoffwechsel wurden die Bäume in standardisierter Form verwundet und mit dem Pathogen *Phytophthora cactorum* inokuliert (Kap. 2.8). Das Pathogen wurde zuvor auf V8-Agar vermehrt und mit dem Medium auf die frische Wunde gebracht. Als Kontrollen dienten Verwundungen, die mit reinem V8-Agar behandelt wurden. Die Verwundung und Inokulation wurde mit der Korkbohrermethode vorgenommen, die in Kapitel 2.8 genau beschrieben ist. Die Probennahme wurde 4 Wochen nach Inokulation vorgenommen.

3.3.5.1 MM106

In Tabelle 15 sind die Gehalte an den unterschiedlichen Phenylpropanoidklassen der V8-Kontrolle dargestellt. Die Veränderungen, die sich durch die Infektion mit *Phytophthora cactorum* ergaben, wurden als prozentualer Gehalt der V8-Kontrolle in Abb. 39 graphisch dargestellt.

Durch die Behandlung mit dem V8-Medium kam es zu einer Abnahme in der Reaktionszone gegenüber der Umgebungszone um 36 mg/g TS bezogen auf alle Phenylpropanoiden (Tab. 15). Dies wurde verursacht durch geringere Gehalte an allen untersuchten Gruppen außer der Kaffeesäurederivate (Tab. 15). Hauptverluste traten beim Phloridzin (-26 mg/g TS), bei den Flavonolen (-6 mg/g TS) und bei den acylierten Flavonoiden (-1,2 mg/g TS) auf (Tab. 15).

Durch das Pathogen kam es im Vergleich zur V8-Mediumkontrolle zu einem höheren Gehalt bei einer Reihe von Phenylpropanoiden in der Reaktionszone: Phloridzin, Flavonole, acylierte Flavonoide, Flavanone und *p*-Cumarsäurederivate waren in deutlich höherer Konzentration nachweisbar (Abb. 39). Auch die Flavan 3-ole und Proanthocyanidine waren in der Reaktionszone nach Pathogenbefall angereichert (Abb. 39, 8 und 9).

Nur bei den acylierten Flavonoiden und *p*-Cumarsäurederivaten war eine Akkumulation sowohl in der Reaktionszone als auch in der Umgebungszone nachweisbar (Abb. 39). Für das Phloridzin, die Flavonole, Flavanone und Proanthocyanidine ließ sich neben der Akkumulation in der Reaktionszone eine Gehaltsverminderung in der Umgebungszone nach Infektion zeigen (Abb. 39).

Die monomeren Flavan 3-ole reicherten sich in der Reaktionszone nach Infektion an, aber auch in der Umgebungszone kam es zu einer leichten Zunahme im Gehalt. Umgekehrt konnte für die Kaffeesäurederivate eine Akkumulation für die Umgebungszone aber keine Gehaltsveränderung für die Reaktionszone nachgewiesen werden (Abb. 39).

Für die Gesamtsumme, die vor allem von den Hauptbestandteilen Phloridzin und den Flavonolen bestimmt wurde, zeigte sich nach Infektion ebenfalls eine Akkumulation in der Reaktionszone und eine Gehaltsverminderung in der Umgebungszone (Abb. 39).

Tab. 15: MM106, Gehalte an unterschiedlichen Phenylpropanoiden nach Behandlung mit dem Kontrollmedium V8; Werte stellen 100%-Bezugsgröße für Abb. 39 dar

	V8-Kontrolle			
	Umgebungszone = 100 %		Reaktionszone = 100 %	
	mg/g TS	s	mg/g TS	s
1 Gesamtsumme	111,2	14,9	75,1	16,2
2 Phloridzin	77,4	10,3	51,1	12,7
3 Flavonole	20,8	1,7	14,5	3,3
4 acylierte Flavonoide	3,5	0,8	2,3	0,4
5 Flavanone	2,9	0,6	2,0	0,4
6 <i>p</i> -Cumarsäurederivate	2,1	0,7	1,5	0,3
7 Kaffeesäurederivate	0,6	0,5	0,8	0,1
8 Catechin + Epicatechin	1,7	0,4	1,4	0,1
9 Proanthocyanidine	0,7	0,1	0,6	0,2
10 Phloretin	0,4	0,2	0,2	0,0

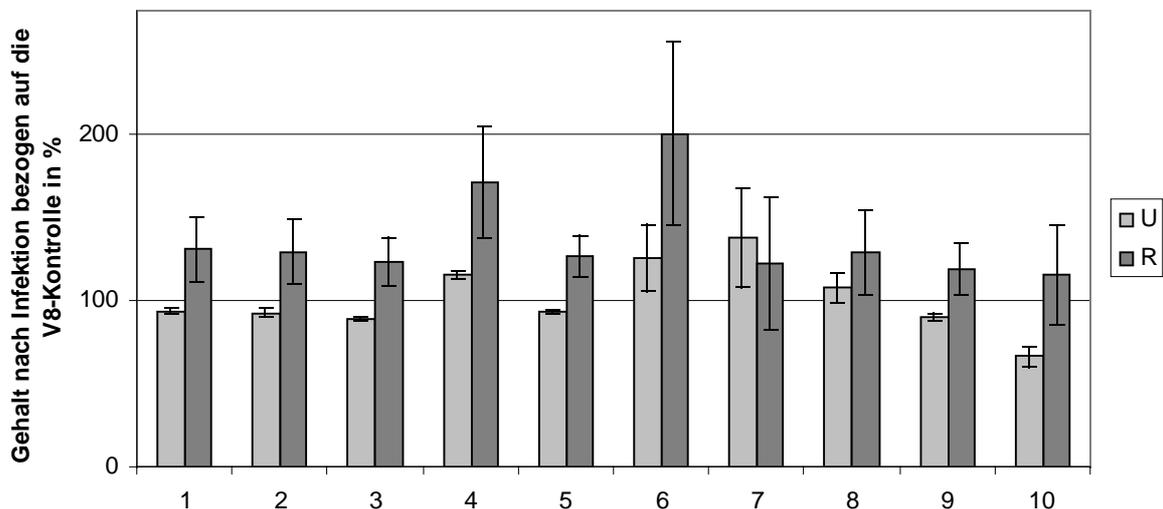


Abb. 39: MM106; Prozentualer Gehalt an Phenylpropanoiden nach Infektion; Bezugsgröße (100%) sind die einzelnen Gehalte nach Behandlung mit dem Kontrollmedium V8 (siehe Tab. 15); Bezeichnung ebenfalls nach Tab. 15

3.3.5.2 `Topaz`

Nach der Behandlung mit dem Kontrollmedium (V8) kam es bei `Topaz` zu einem deutlichen Unterschied zwischen den beiden untersuchten Zonen. Die Gesamtsumme sank von 94,9 mg/g TS in der Umgebungszone auf 69,0 mg/g TS in der Reaktionszone (Tab. 16; Nr. 1). Dieser Effekt basierte auf geringeren Gehalten an Phloridzin (Tab. 16; 2), acylierten Flavonoiden (4), Favanonen (5) und an Proanthocyanidinen (9) in der Reaktionszone.

Die Gesamtsumme an Phenylpropanoiden stieg nach Infektion in der Reaktionszone auf einen Gehalt von 116 % gegenüber der V8-Kontrolle, sank in der Umgebungszone hingegen auf 91 % der Kontrolle ab (Abb. 40; Nr. 1).

Für die Kaffeesäurederivate wurde bei der V8-Kontrolle eine höhere Konzentration in der Reaktionszone nachgewiesen als in der Umgebungszone (Tab. 16; Nr. 7). Dieser Effekt wird nach Infektion mit dem Pathogen noch verstärkt. Eine Zunahme auf 167 % in der Umgebungszone und auf 209 % in der Reaktionszone war nachweisbar (Abb. 40, Nr. 7).

Die *p*-Cumarsäurederivate verhielten sich identisch: Ohne Infektion waren bei der V8-Mediumkontrolle mit 0,04 mg/g TS in der Reaktionszone und 0,02 mg/g TS in der Umgebungszone sehr geringe Gehalte vorhanden. Nach der Infektion stiegen die Gehalte auf 0,14 mg/g TS in der Reaktionszone und 0,08 mg/g TS in der Umgebungszone an, was zu den enormen prozentualen Gehaltszunahmen von fast 400 % führte (Abb. 40; 6). Auffällig war der sehr geringe Anteil an Hydroxyzimtsäuren am Gesamtgehalt.

Tab. 16: 'Topaz', Gehalte an unterschiedlichen Phenylpropanoiden nach Behandlung mit dem Kontrollmedium V8; Werte stellen 100%-Bezugsgröße für Abb. 40 dar

	V8-Kontrolle			
	Umgebungszone = 100 %		Reaktionszone = 100 %	
	mg/g TS	s	mg/g TS	s
1 Gesamtsumme	94,9	15,1	69,0	5,1
2 Phloridzin	74,6	11,3	54,8	3,9
3 Flavonole	10,1	2,2	6,9	1,0
4 acylierte Flavonoide	4,5	0,7	3,0	0,4
5 Flavanone	2,6	0,5	1,8	0,1
6 <i>p</i> -Cumarsäurederivate	0,0	0,0	0,0	0,0
7 Kaffeesäurederivate	0,3	0,1	0,5	0,1
8 Catechin + Epicatechin	0,6	0,2	0,5	0,1
9 Proanthocyanidine	0,5	0,2	0,4	0,1
10 Phloretin	0,4	0,1	0,1	0,1

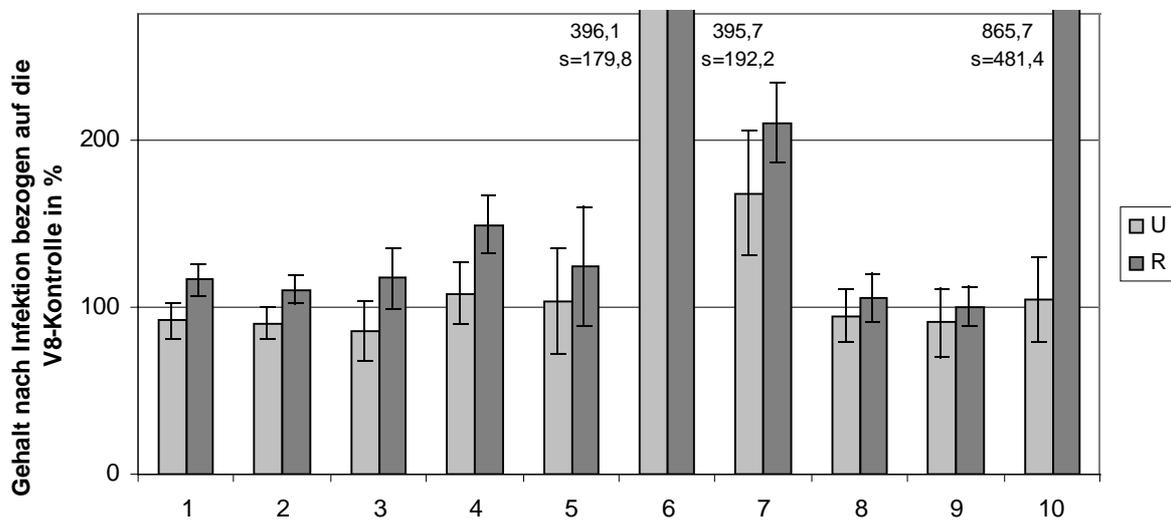


Abb. 40: 'Topaz'; Prozentualer Gehalt an Phenylpropanoiden nach Infektion; Bezugsgröße (100%) sind die einzelnen Gehalte nach Behandlung mit dem Kontrollmedium V8 (siehe Tab. 16); Bezeichnung ebenfalls nach Tab. 16

Nach Infektion wurde die induzierte Substanz 2 (Abb. 8 und Tab. 10) in 'Topaz' nachgewiesen (Abb. 41). Sie konnte mit 0,44 mg/g TS nach Infektion in der Reaktionszone in der doppelten Konzentration wie in der Umgebungszone und in den untersuchten Zonen nach V8-Kontrollbehandlungen nachgewiesen werden.

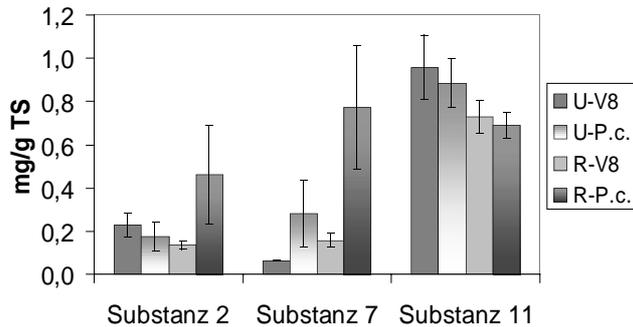


Abb. 41: Gehalt an den Substanzen 2, 7 und 11 in der Phloemkambialschicht von 'Topaz' nach Infektion (P.c.) und nach Medienkontrollbehandlung (V8); U= Umgebungszone, R= Reaktionszone

Ein ähnliches Verhalten zeigte die ebenfalls stimulierte Substanz 7 (Abb. 41).

Im Gegensatz zur deutlichen Reaktion nach Infektion der Substanzen 2 und 7 wurde für die Substanz 11 ein Gehaltsrückgang in der Reaktionszone im Vergleich zur Umgebungszone gezeigt (Abb. 41).

3.3.5.3 Modifikationen durch N-Versorgung

Um den Einfluss der Stickstoffversorgung des Apfels auf dessen Abwehrpotential gegen *Phytophthora* zu untersuchen, wurden 4-jährige Veredlungen der Genotypen 'Rewena', 'Golden Delicious' und wurzelechte Bäume des Genotyps M9 über 2 Jahre mit unterschiedlichen Stickstoffgaben gedüngt.

Die Bäume wurden wie in Kapitel 2.8 beschrieben inokuliert. Das in diesem Versuch eingesetzte Pathogen war der Stamm Pt8, der uns von der BBA fälschlicherweise als *Phytophthora cactorum* zur Verfügung gestellt wurde. In späteren molekularbiologischen Untersuchungen wurde dieser Stamm jedoch als *Phytophthora citricola* identifiziert (siehe Kapitel 2.4, 2.5 und 3.1).

Die Versuchsdauer war wie bei den anderen Versuchen 4 Wochen. Die Bäume befanden sich in der Winterruhe (Dezember bis Januar).

3.3.5.3.1 `Rewena`

Vergleich der beiden Rindenzonen nach V8-Behandlung

Sowohl in der Stickstoffstufe N1 als auch in N3 waren in den Reaktionszonen deutlich geringere Gehalte an Phenylpropanoiden nachweisbar (Tab. 17). Beim Vergleich zwischen Umgebungs- und Reaktionszonen bezüglich der Phenylpropanoidgehalte unterschieden sich die Stickstoffstufen deutlich. Die Gehaltsunterschiede waren bei Phloridzin, Flavonolen und acylierten Flavonoiden in der Stickstoffstufe N3 deutlich höher. Die Summe an Phenylpropanoiden unterschied sich um 21,5 mg/g TS in der Stickstoffstufe N1, in der Stickstoffstufe N3 um 35,3 mg/g TS (Tab. 17). Bei beiden Stickstoffstufen ließ sich eine Akkumulation von Kaffeesäurederivaten in der Reaktionszone nachweisen (Tab. 17).

Herausragendes Ergebnis dieses Versuchs waren die deutlichen Unterschiede in den Gehalten an Phenylpropanoiden in Abhängigkeit von der Stickstoffversorgung. Beim Vergleich der Zonen war ein deutlich höherer Gehalt an Phenylpropanoiden in der Stickstoffstufe N1 nachweisbar (Tab. 17). Aus den Werten zeigte sich, dass die Umgebungszone von N3 nur rund 85 % des Gesamtphenylpropanoidgehalts der Umgebungszone von N1 aufwies. Bei der Reaktionszone erreichte N3 nur rund 72 % der Gesamtphenylpropanoide von N1 (Tab. 17).

N3 zeigte einen nur 50 %-igen Gehalt an Kaffeesäurederivate in der Reaktionszone im Vergleich zu N1. In der Umgebungszone sank der Anteil sogar auf 37 %. Für Catechin und Epicatechin konnten keine deutlichen Gehaltsunterschiede zwischen den Stickstoffstufen nachgewiesen werden (Tab. 17).

Tab. 17: 'Rewena', Gehalte an unterschiedlichen Phenylpropanoidklassen nach Behandlung mit dem Kontrollmedium V8; Werte stellen 100%-Bezugsgröße für die Abb. 42 und Abb. 43 dar

V8-Kontrollbehandlung		N1				N3			
		U = 100 %		R = 100 %		U = 100 %		R = 100 %	
		mg/g TS	s						
1	Gesamtsumme	162,4	40,2	140,9	23,7	137,4	15,5	102,1	27,2
2	Phloridzin	104,5	28,3	88,5	18,9	91,4	10,3	67,8	17,6
3	Flavonole	26,2	6,3	23,2	3,9	22,9	2,6	16,0	4,4
4	acylierte Flavanoide	12,1	2,0	10,6	0,9	9,8	2,2	6,2	1,7
5	Flavanone	12,3	2,8	11,3	1,7	7,4	4,1	7,4	2,9
6	p-Cumarsäurederivate	1,6	0,6	1,5	0,4	1,3	0,7	0,8	0,1
7	Kaffeesäurederivate	1,7	0,4	2,2	0,3	0,6	0,4	1,1	0,3
8	Catechin + Epicatechin	0,6	0,1	0,7	0,1	0,8	0,3	0,7	0,2
9	Proanthocyanidine	2,2	0,5	2,0	0,4	2,0	0,5	1,4	0,6
10	Phloretin	0,3	0,1	0,2	0,1	0,4	0,0	0,2	0,1

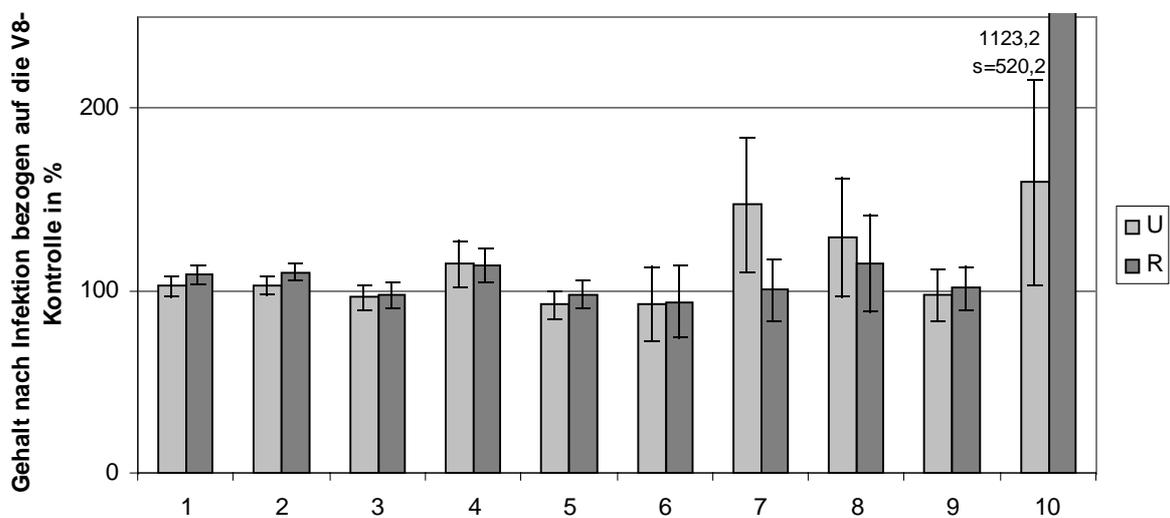


Abb. 42: Veränderung in der Stickstoffstufe N1 von 'Rewena' durch Infektion in Bezug auf die V8-Kontrolle in % ; Bezugsgröße (100%) sind die einzelnen Gehalte nach Behandlung mit dem Kontrollmedium V8 (siehe

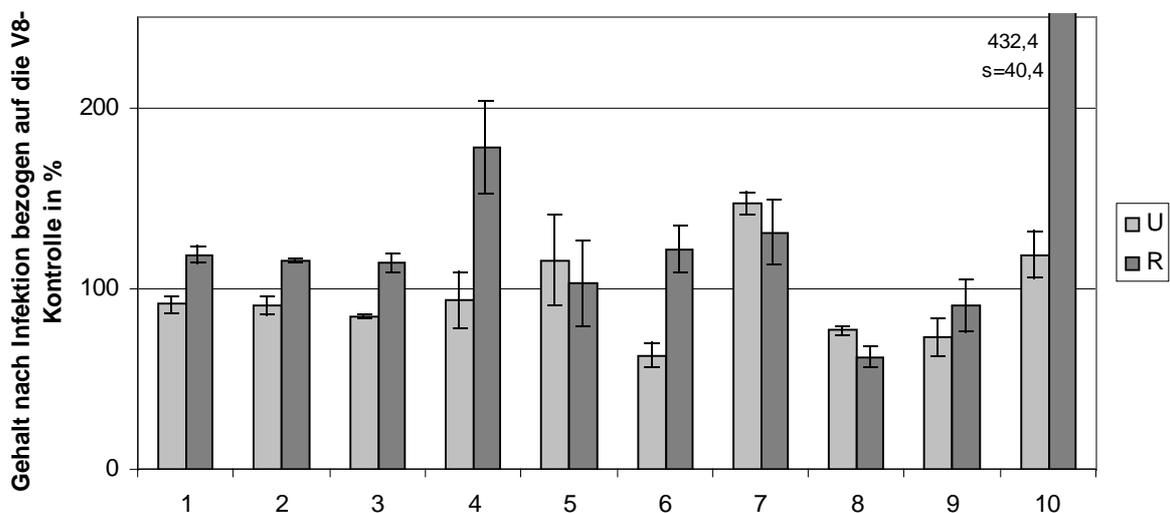


Abb. 43: Veränderung in der Stickstoffstufe N3 von 'Rewena' durch Infektion in Bezug auf die V8-Kontrolle in % ; Bezugsgröße (100%) sind die einzelnen Gehalte nach Behandlung mit dem Kontrollmedium V8 (siehe Tab. 17)

Veränderungen durch Infektion

In den Abbildungen 42 (N1) und 43 (N3) ist die Reaktion auf die Infektion dargestellt. Dabei stellen die in Tabelle 17 aufgeführten Werte die 100 %-Bezugsebene dar, weil die Behandlung mit dem V8-Medium ohne Pathogen als die direkte Kontrolle der Behandlung mit dem Pathogen auf V8-Medium zu betrachten ist.

Der Gesamtphenylpropanoidgehalt veränderte sich nach Infektion in der Stickstoffstufe N1 kaum. Der leichten Akkumulation in der Reaktionszone von N1 (Abb. 42; 1) stand eine deutliche Akkumulation in der Reaktionszone von N3 (Abb. 43; 1) gegenüber. In absoluten Werten akkumulierten in N3 6,2 mg/g TS Gesamtphenylpropanoide mehr als in N1. Während die Umgebungszone von N1 keine Veränderung zeigte, führte die Infektion in N3 zu einer Abnahme im Gehalt an Phenylpropanoiden in der Umgebungszone (Abb. 43; 1).

In der Stickstoffstufe N1 kam es zu einer Akkumulation von Phloridzin, acylierten Flavonoiden und Phloretin in der Reaktionszone (Abb. 42; 2,4,10). In der Umgebungszone akkumulierten dagegen neben den acylierten Flavonoiden die Kaffeesäurederivate und das Phloretin. Für die monomere Flavan 3-ole konnte nur eine tendenzielle Anreicherung nachgewiesen werden (Abb. 42; 8).

Für die Stickstoffstufe N3 wurde eine Akkumulation von Phloridzin, Flavonolen, acylierten Flavonoiden, Hydroxyzimtsäuren und Phloretin in der Reaktionszone gezeigt (Abb. 43; 2,3,4,6,7,10).

Bei den Gehalten an Catechin und Epicatechin sowie an Proanthocyanidinen wurde ein Rückgang nach Infektion nachgewiesen (Abb. 43; 8 und 9). Dieser Effekt bestätigte sich auch für die Umgebungszone. Neben einem Rückgang an *p*-Cumarsäurederivaten in der Umgebungszone wurde dies auch für das Phloridzin und die Flavonole gezeigt (Abb. 43; 2, 3 und 6).

In der Umgebungszone der Stickstoffstufe N1 konnte für keine Substanzklasse außer dem Phloretin ein anderes Akkumulationsverhalten als in der Reaktionszone nachgewiesen werden (Abb. 42). Bei Betrachtung der Umgebungszone der Stickstoffstufe N3 fällt hingegen auf, dass sich die Gehalte von Phloridzin, Flavonolen, *p*-Cumarsäurederivaten, Catechin und Epicatechin und Proanthocyanidinen nach Infektion deutlich verringerten (Abb. 43).

3.3.5.3.2 `Golden Delicious`

Vergleich der beiden Rindenzonen nach V8-Behandlung

Wie bei der Sorte `Rewena` konnten auch für `Golden Delicious` deutliche Unterschiede zwischen den Rindenzonen nachgewiesen werden. Während in der Stickstoffstufe N1 die Umgebungszone 28,1 mg/g TS mehr Phenylpropanoide als die Reaktionszone enthielt, verringerte sich diese Differenz zwischen den Zonen in N3 auf 20,8 mg/g TS (Tab. 18).

Die Gehaltsunterschiede zwischen den Zonen beim Phloridzin betragen (im Gegensatz zu `Rewena` (6,6 mg/g TS, Tab. 17)) nur 1,0 mg/g TS. Im Gegensatz dazu waren die Differenzen zwischen den Zonen bei den Flavonolen, acylierten Flavonoiden und Proanthocyanidinen in der Stickstoffstufe N1 deutlich höher als in N3. Bei den Flavanonen, Kaffeesäurederivaten, Catechin und Epicatechin zeigte sich ein größerer Unterschied zwischen den Rindenzonen in N3 (Tab. 18).

Eine Akkumulation in der Reaktionszone konnte ausschließlich bei den Kaffeesäurederivaten für beide Stickstoffstufen gezeigt werden (Tab. 18). In der Stickstoffstufe N1 kam es ansonsten zu keiner Akkumulation einer bestimmten Phenylpropanoidklasse. In N3 dagegen war zusätzlich eine Gehaltszunahme bei den monomeren Flavan 3-olen in der Reaktionszone nachweisbar (Tab. 18). Für alle anderen Substanzklassen wurden für die Reaktionszonen deutlich geringere Gehalte als für die Umgebungszone gezeigt (Tab. 18).

Tab. 18: 'Golden Delicious', Gehalte an unterschiedlichen Phenylpropanoidklassen nach Behandlung mit dem Kontrollmedium V8; Werte stellen 100%-Bezugsgröße für die Abb. 44 und Abb. 45 dar

V8-Kontrollbehandlung		N1				N3			
		U = 100 %		R = 100 %		U = 100 %		R = 100 %	
		mg/g TS	s	mg/g TS	s	mg/g TS	s	mg/g TS	s
1	Gesamtsumme	166,7	20,2	138,6	14,5	145,0	14,0	124,2	6,8
2	Phloridzin	106,1	15,1	88,9	11,0	95,4	5,6	79,2	2,0
3	Flavonole	31,3	4,0	25,3	3,4	23,2	3,0	19,2	3,2
4	acylierte Flavonoide	15,6	1,2	12,4	1,1	13,4	5,2	12,7	1,0
5	Flavanone	3,3	0,4	2,8	0,4	5,1	2,7	2,8	0,1
6	p-Cumarsäurederivate	3,0	1,0	2,2	0,4	2,1	1,2	2,2	0,5
7	Kaffeesäurederivate	1,0	0,4	1,8	1,0	0,9	0,3	2,7	0,4
8	Catechin + Epicatechin	1,1	0,2	1,0	0,4	0,8	0,3	1,4	0,5
9	Proanthocyanidine	3,1	0,2	2,3	0,4	2,2	0,8	2,0	0,2
10	Phlorethin	0,4	0,1	0,2	0,1	0,6	0,3	0,2	0,1

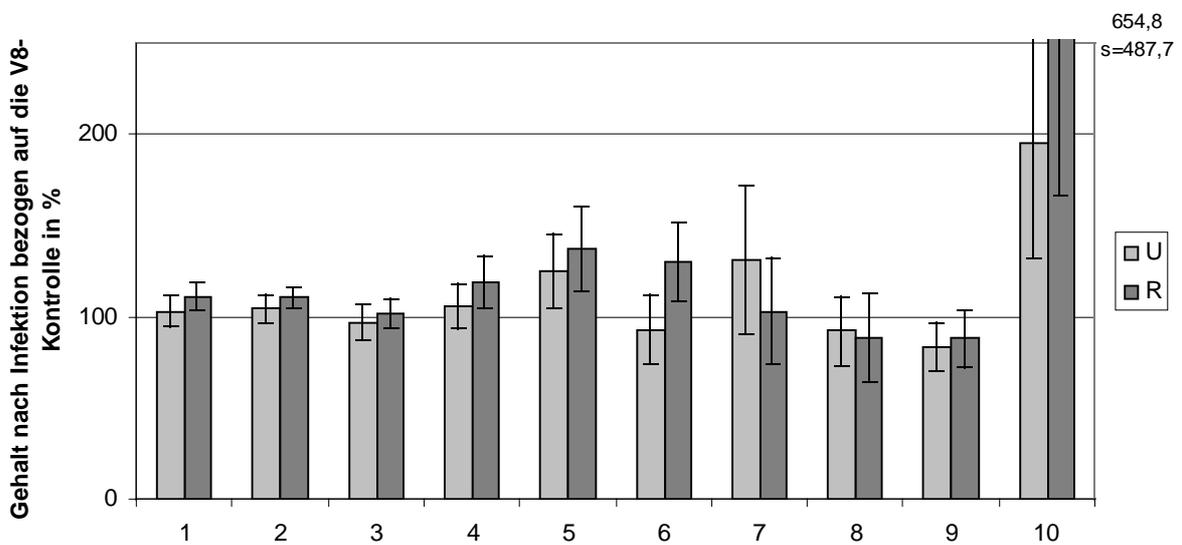


Abb. 44: Veränderung in der Stickstoffstufe N1 von 'Golden Delicious' durch Infektion in Bezug auf die V8-Kontrolle in % ; Bezugsgröße (100%) sind die einzelnen Gehalte nach Behandlung mit dem Kontrollmedium V8 (siehe Tab. 18)

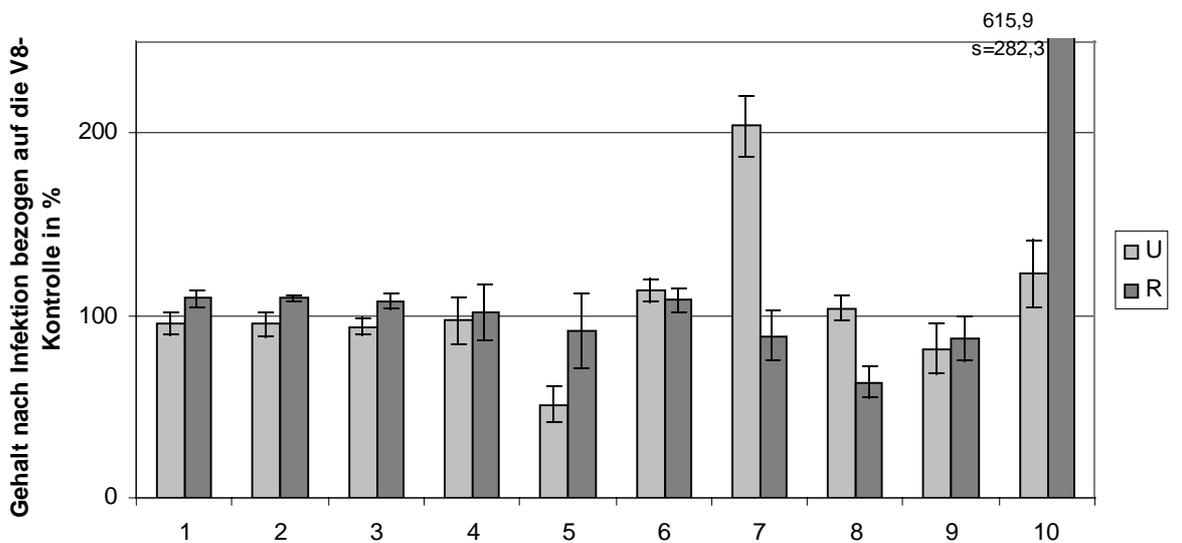


Abb. 45: Veränderung in der Stickstoffstufe N3 von 'Golden Delicious' durch Infektion in Bezug auf die V8-Kontrolle in % ; Bezugsgröße (100%) sind die einzelnen Gehalte nach Behandlung mit dem Kontrollmedium V8 (siehe Tab.18)

Effekte der unterschiedlichen Stickstoffstufen N1 und N3

Auch für die Sorte 'Golden Delicious' konnten, wie bereits für 'Rewena' beschrieben, deutlich geringere Gehalte an Phenylpropanoiden in der Rinde der Bäume der Stickstoffstufe N3 im Vergleich zu N1 nachgewiesen werden (Tab. 18). Dies traf auf den Gesamtgehalt an Phenylpropanoiden (-10 %), auf Phloridzin (-10 %) und Flavonole (-25 %) für den Vergleich sowohl der Umgebungszonen als auch der Reaktionszonen zu (Tab. 18). Die prozentualen Abnahmen für diese Substanzen waren im Gegensatz zu 'Rewena' in beiden Zonen identisch.

Diese Abnahme in N3 wurde für die Flavanone und *p*-Cumarsäurederivate in der Umgebungszone nachgewiesen, in der Reaktionszone jedoch konnten identische Gehalte in beiden Stickstoffstufen gefunden werden (Tab. 18). Acylierte Flavonoide, Kaffeesäurederivate, Catechin und Epicatechin wurden in der Reaktionszone von N3 in höheren Gehalten als in der Reaktionszone von N1 detektiert (Tab. 18).

Veränderungen durch Infektion

In den Abbildungen 44 (N1) und 45 (N3) sind die prozentualen Veränderungen nach Infektion dargestellt. 100 %-Basis sind wiederum die Gehalte der Kontrollbehandlung V8 (Tab. 18).

Nach Infektion war sowohl in N1 als auch in N3 eine Akkumulation von Phenylpropanoiden in der Reaktionszone nachweisbar (Abb. 44 und 45; 1). Während in der Umgebungszone der Stickstoffstufe N1 ebenfalls eine tendenzielle Gehaltszunahme gezeigt wurde, nahm der Gehalt in der Umgebungszone von N3 tendenziell ab. Dieser Effekt konnte in N1 auch für das Phloridzin (2), die acylierten Flavonoide (4) und die *p*-Cumarsäurederivate (6), in N3 für das Phloridzin (2) und die Flavonole (3) gezeigt werden (Abb. 44 und 45).

Für die acylierten Flavonoide (4) konnte eine Akkumulation nur in der Reaktionszone der Stickstoffstufe N1 nachgewiesen werden (Abb. 44).

Ein bedeutender Unterschied zwischen den Stickstoffstufen zeigte sich bei den Flavanonen (5). Während für N1 eine Akkumulation in beiden Rindenzonen sichtbar wurde (Abb. 44), ließ sich in N3 in der Umgebungszone nur ein Gehalt von etwa 50 %, in der Reaktionszone von etwa 90 % nachweisen (Abb. 45).

Die Hydroxyzimtsäuren (6 und 7) akkumulierten in der Stickstoffstufe N3 in der Umgebungszone (Abb. 45), was für N1 nicht nachweisbar war (Abb. 44).

Bei den Flavan 3-olen Catechin und Epicatechin (8) wurde in der Reaktionszone von N3 ein Rückgang auf 60 %, in der Reaktionszone von N1 ein Rückgang auf etwa 90 % festgestellt (Abb. 44, Abb. 45). In der Umgebungszone von N3 kam es zu einer tendenziellen Anreicherung, bei reduzierter Stickstoffversorgung (N1) nahm der Gehalt tendenziell ab.

Bei den Proanthocyanidinen zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Stickstoffstufen und es kam in beiden Zonen jeweils zu einem Rückgang (Abb. 44, Abb. 45; 9).

Auch das Aglykon Phloretin verhielt sich in beiden Stickstoffstufen sehr ähnlich. In den Reaktionszonen kam es zu Akkumulationen von über 600 %, während in den Umgebungs- zonen diese in N1 mit 195 % und in N3 mit 120 % deutlich schwächer ausfielen (Abb. 44, Abb. 45; 10).

3.3.5.3.3 M9

Vergleich der beiden Rindenzonen nach V8-Behandlung

Beim Vergleich der Umgebungszonen mit den Reaktionszonen der beiden untersuchten Stickstoffstufen N1 und N3 zeigten sich bei M9 in N1 18,7 mg/g TS, in N3 28,0 mg/g TS weniger Phenylpropanoide in den Reaktionszonen (Tab. 19). Dies ging vor allem auf die niedrigeren Gehalte an Phloridzin (2) und Flavonolen (3) zurück. Der Rückgang an Phenylpropanoiden in der Reaktionszone bezogen auf den Gehalt in der Umgebungzone fiel mit einer um 10 mg/g TS stärkeren Abnahme in N3 deutlich stärker aus als in N1. Gemeinsam ist beiden die deutliche Abnahme in der Reaktionszone im Vergleich zur Umgebungzone (Tab. 19).

In N1 konnte eine tendenzielle Akkumulation von Kaffeesäurederivaten, in N3 von Kaffeesäurederivaten und *p*-Cumarsäurederivaten in der Reaktionszone gezeigt werden (Tab. 19). Alle anderen Substanzen gingen in den Reaktionszonen deutlich zurück (Tab. 19).

Effekte der unterschiedlichen Stickstoffstufen N1 und N3

Auch für M9 konnten deutliche Gehaltsunterschiede zwischen den Stickstoffstufen gezeigt werden. Die deutlich geringeren Phenylpropanoidgehalte in den Rinden der stärker mit Stickstoff versorgten Pflanzen (N3) konnten in der Umgebungzone mit 13 %, in der Reaktionszone sogar mit 22 % geringeren Gehalten als in N1 gezeigt werden (Tab. 19). Für das Phloridzin lagen diese Verluste bei 7 % bzw. 16 %, für die Flavonole bei 22 % bzw. 34 %, für die acylierten Flavonoide bei 33 % bzw. 37 % und für die Flavanone bei nur 2 % bzw. 12 % (Tab. 19).

Tab. 19: M9, Gehalte an unterschiedlichen Phenylpropanoidklassen nach Behandlung mit dem Kontrollmedium V8; Werte stellen 100%-Bezugsgröße für die Abb. 46 und Abb. 47 dar

V8-Kontrollbehandlung		N1				N3			
		U = 100 %		R = 100 %		U = 100 %		R = 100 %	
		mg/g TS	s						
1	Gesamtsumme	147,6	15,8	128,9	15,0	128,8	13,0	100,8	28,0
2	Phloridzin	94,2	13,6	82,3	7,5	87,2	10,6	68,9	19,6
3	Flavonole	30,8	1,9	26,7	4,6	24,0	3,9	17,6	6,1
4	acylierte Flavonoide	4,6	0,4	3,8	0,8	3,1	0,4	2,4	0,8
5	Flavanone	4,7	1,1	4,0	1,5	4,6	1,4	3,5	1,4
6	p-Cumarsäurederivate	5,5	0,5	4,9	0,9	2,5	2,0	3,0	1,2
7	Kaffeesäurederivate	0,6	0,1	0,7	0,6	0,3	0,3	0,7	0,5
8	Catechin + Epicatechin	1,4	0,3	1,3	0,5	1,4	0,2	0,7	0,7
9	Proanthocyanidine	2,8	0,1	2,6	0,8	2,3	0,5	1,2	1,2
10	Phloretin	0,4	0,2	0,3	0,1	0,9	0,2	0,6	0,5

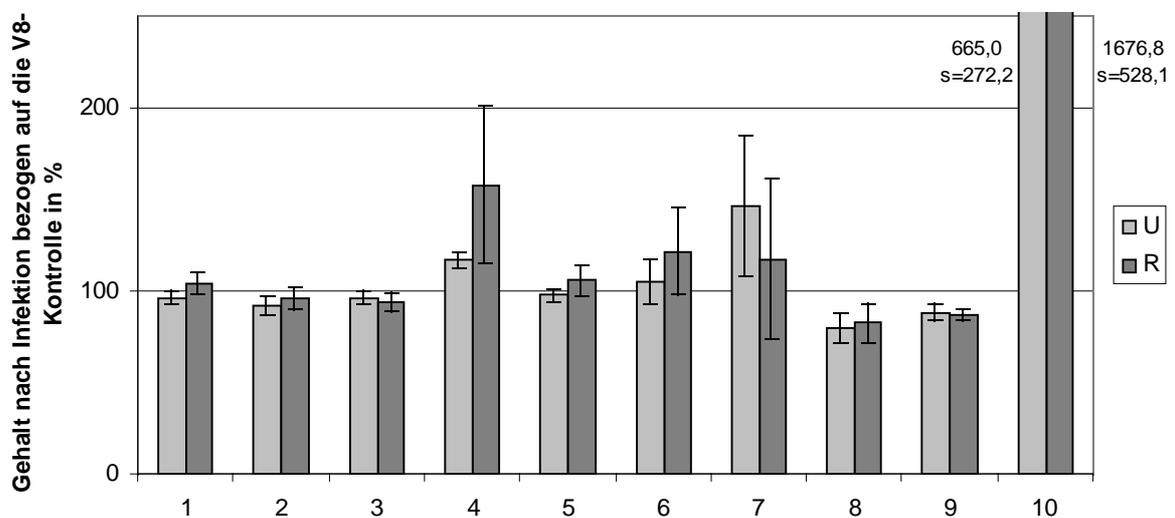


Abb. 46: Veränderung in der Stickstoffstufe N1 von M9 durch Infektion in Bezug auf die V8-Kontrolle in %; Bezugsgröße (100%) sind die einzelnen Gehalte nach Behandlung mit dem Kontrollmedium V8 (siehe Tab. 19)

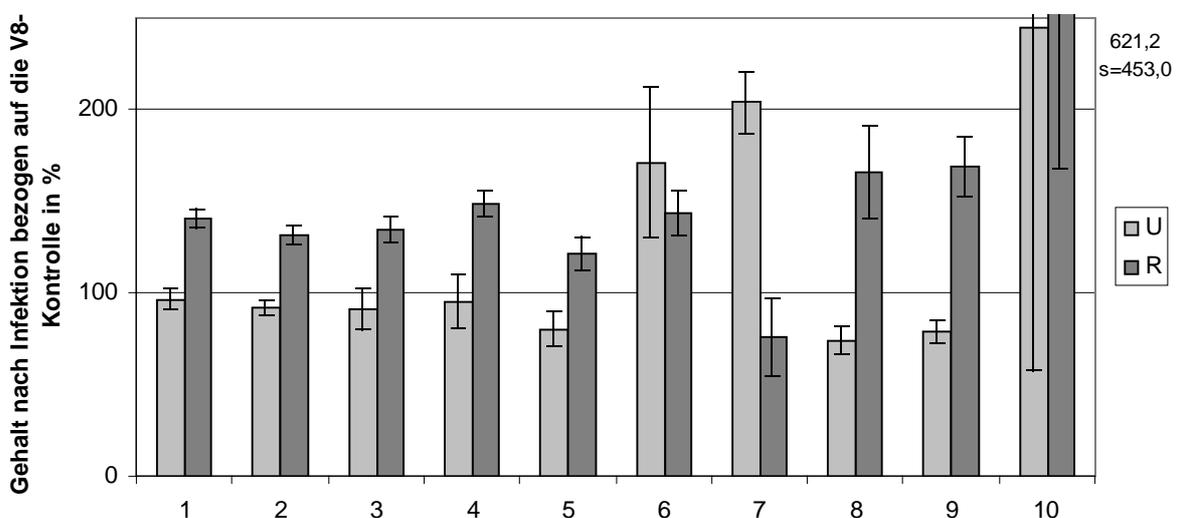


Abb. 47: Veränderung in der Stickstoffstufe N3 von M9 durch Infektion in Bezug auf die V8-Kontrolle in %; Bezugsgröße (100%) sind die einzelnen Gehalte nach Behandlung mit dem Kontrollmedium V8 (siehe Tab. 19)

Veränderungen durch Infektion

Durch die Infektion kam es in der Stickstoffstufe N1 in der Summe aller Phenylpropanoide zu keiner deutlichen Akkumulation (Abb. 46; 1). Die leichte Tendenz einer Akkumulation in der Reaktionszone ging auf Zunahmen im Gehalt an acylierten Flavonoiden (Abb. 46; 4 (+2,2 mg/g TS)), Hydroxyzimtsäurederivaten (Abb. 46; 6 und 7) und einer deutlichen Zunahme an Phloretin (Abb. 46; 10 (+4,5 mg/g TS)) zurück. Phloretin, Kaffeesäurederivate und acylierte Flavonoide akkumulierten auch in der Umgebungszone von N1 (Abb. 46; 4, 7, 10). Für Catechin, Epicatechin und die Proanthocyanidine wurden nach Infektion in N1 Rückgänge um 15 bis 25 % gemessen (Abb. 46; 8, 9).

Für die Stickstoffstufe N3 wurden sehr deutliche Reaktionen auf die Infektion gemessen (Abb. 47). In der Reaktionszone wurde eine Akkumulation um 41 mg/g TS auf einen Gehalt von 140 % der V8-Behandlung nachgewiesen (Abb. 47; 1). Diese Reaktion wurde mit ähnlichen Akkumulationsraten getragen vom Phloridzin (2), den Flavonolen (3), den acylierten Flavonoiden (4), den Flavanonen (5) und den *p*-Cumarsäurederivaten (6). Der Beitrag von Catechin, Epicatechin und den Proanthocyanidinen war mit Akkumulationsraten von 166 % und 168 % deutlich höher (Abb. 47, 8, 9).

Phloretin zeigte einen Anstieg um 2,3 mg/g TS oder 620 % in der Reaktionszone, wurde aber auch in der Umgebungszone deutlich angereichert (Abb. 47; 10).

In der Umgebungszone wurden neben dem Phloretin ausschließlich die *p*-Cumarsäurederivate (6) und Kaffeesäurederivate (7) deutlich angereichert (Abb. 47). Desweiteren verringerte sich der Gehalt an Flavanonen (5), Catechin und Epicatechin (8) und Proanthocyanidinen (9) nach Infektion in der Umgebungszone um 20 % (Abb. 47). Rückgänge konnten auch für den Gehalt an Phloridzin (2), Flavonolen (3) und acylierten Flavonoiden (4) in der Umgebungszone nach Infektion gezeigt werden (Abb. 47). All die beschriebenen Gehaltsveränderungen führten zu einer tendenziellen Verringerung der Phenylpropanoidgehalte in der Umgebungszone von N3 (Abb. 47; 1).

3.3.5.3.4 Substanzen 2, 7 und 11

Bei den Untersuchungen wurden drei Substanzen gefunden, die als Substanzen 2, 7 und 11 im Kapitel 3.3.2 mit ihren UV-Spektren charakterisiert sind. Besonders für die Substanzen 2 und 7 wurde eine starke Induktion nach Infektion gezeigt.

In den Abbildungen 48 bis 53 sind die Gehalte dieser Substanzen graphisch dargestellt. Die Balkenabfolge im Diagramm entspricht für die ersten beiden Balken einem Vergleich der Umgebungszone nach Kontrollbehandlung (V8) und Infektion (P.c.), in den letzten beiden Balken einem Gehaltsvergleich der beiden Behandlungen in der Reaktionszone.

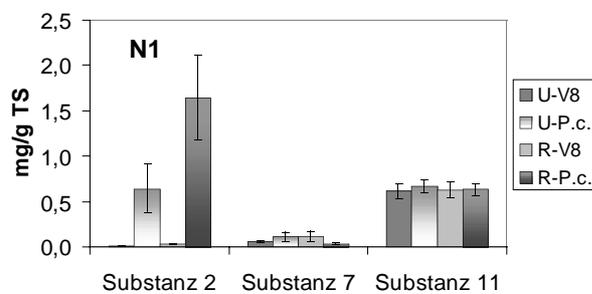


Abb. 48: Gehalte in 'Rewena' (N1) der Substanzen 2, 7 und 11

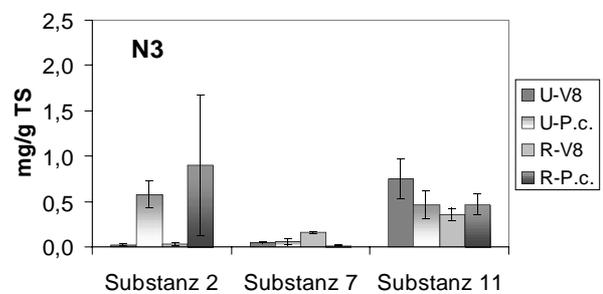


Abb. 49: Gehalte in 'Rewena' (N3) der Substanzen 2, 7 und 11

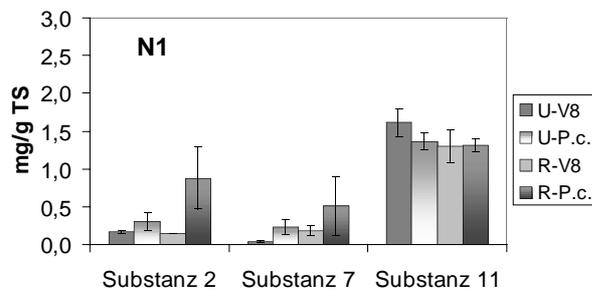


Abb. 50: Gehalte in 'Golden Delicious' (N1) der Substanzen 2, 7 und 11

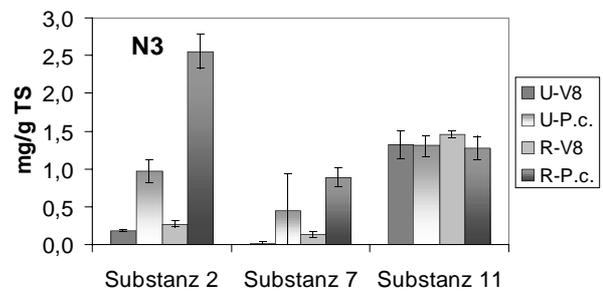


Abb. 51: Gehalte in 'Golden Delicious' (N3) der Substanzen 2, 7 und 11

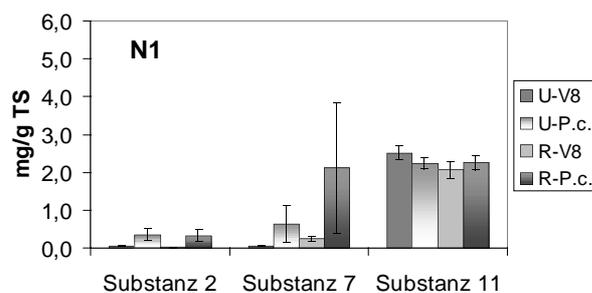


Abb. 52: Gehalte in M9 (N1) der Substanzen 2, 7 und 11

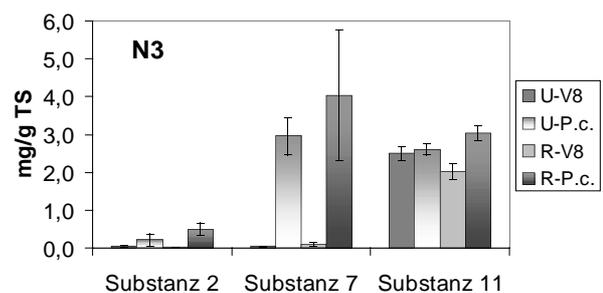


Abb. 53: Gehalte in M9 (N3) der Substanzen 2, 7 und 11

Substanz 2

Für die Substanz 2 wurde eine deutliche Akkumulation in den Genotypen `Rewena` und `Golden Delicious` gezeigt (Abb. 48 - 51). Dabei fiel einerseits auf, dass die Akkumulation nicht auf die Reaktionszone begrenzt war und dass andererseits sich für `Rewena` in der Stickstoffstufe N1 eine stärkere Gehaltszunahme nachweisen ließ als für die Stickstoffstufe N3 (Abb. 48, Abb. 49). Dieser Effekt durch die Stickstoffversorgung wurde für `Golden Delicious` in umgekehrter Abhängigkeit nachgewiesen (Abb. 50, Abb. 51). Für die Unterlage M9 fiel die Akkumulation erheblich geringer aus und erreichte maximal einen Gehalt von 0,5 mg/g TS (Abb. , Abb. 53).

Substanz 7

Dagegen wurden für die Substanz 7 bei M9 die stärksten Akkumulationen nach Infektion gezeigt, die bei der stärker mit Stickstoff versorgten Variante N3 speziell in der Umgebungszone (Abb. 53) deutlich über der Stickstoffstufe N1 (Abb.) lagen.

Für `Golden Delicious` konnte ebenfalls eine positiv mit der Stickstoffgabe korrelierte Akkumulation nachgewiesen werden, die aber in den Gehalten deutlich hinter M9 zurückblieb (Abb. 50, Abb. 51).

Für `Rewena` konnte zum einen ein nur sehr geringer Gehalt der Substanz 7, zum anderen kein Effekt durch die Infektion gezeigt werden (Abb. 48, Abb. 49).

Substanz 11

Bei der Substanz 11 wurde ausschließlich für M9 in der Stickstoffstufe N3 in der Reaktionszone eine Wirkung durch Infektion nachgewiesen. Nur hier kam es zu einer leichten Akkumulation nach Infektion (Abb. 53).

Alle anderen Ergebnisse (Abb. 48, Abb. 49, Abb. 50, Abb. 51, Abb.) ließen keinen Rückschluss auf eine Veränderung nach Infektion zu.

3.3.5.4 Veränderungen im Phenylpropanoidstoffwechsel beim Genotyp M9 durch erhöhte Kohlendioxid-Konzentrationen in der Luft

Um den Einfluss der Ressource Kohlenstoff bei unterschiedlich mit Stickstoff versorgten Pflanzen auf den Phenylpropanoidstoffwechsel zu untersuchen, wurden Bäume des Genotyps M9 zwei Jahre in den Klimakammern des Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit (GSF in Neuherberg) unter zwei unterschiedlichen Kohlendioxidkonzentrationen kultiviert. Dazu wurde das Klima in den Kammern in beiden Varianten gleich gehalten. Ausschließlich der Gehalt an Kohlendioxid wurde verändert. In der Variante mit ambientem Kohlendioxidgehalt wurde über die Vegetationsperiode mit 400 ppm, in der Variante mit erhöhtem Kohlendioxidgehalt mit 700 ppm CO₂ begast. In die beiden unterschiedlichen CO₂-Regime wurden Bäume der unterschiedlichen Stickstoffstufen N1, N2 und N3 (siehe Kapitel 2.7) eingebracht. Die Bäume wurden so über zwei Vegetationsperioden konditioniert.

Im Winter 2001/2002 wurden die Pflanzen mit der Korkbohrermethode mit *Phytophthora cactorum* inokuliert (Stamm BBA 64197, Nachinokulation mit Iso 2). Der Infektionsversuch wurde in den Gewächshäusern des Fachgebiets Obstbau unter ambienter Kohlendioxidkonzentration durchgeführt.

6 Wochen nach der Erstinokulation wurde eine Zweitinokulation vorgenommen, die allerdings nicht zu einer sichtbaren Neuinfektion führte. Dabei wurden die Infektionsstellen mit einem Skalpell erneut verwundet.

Nach 9 Wochen war in den Kontrollvarianten im Gegensatz zu den mit *Phytophthora cactorum* inokulierten Wunden Kalluswachstum nachweisbar. Der nekrotische Ring, der sich bei den inokulierten Wunden zeigte, war mit etwa 1 mm Breite über alle Varianten identisch.

Die Reaktionszonen wurden auf Phenylpropanoide untersucht.

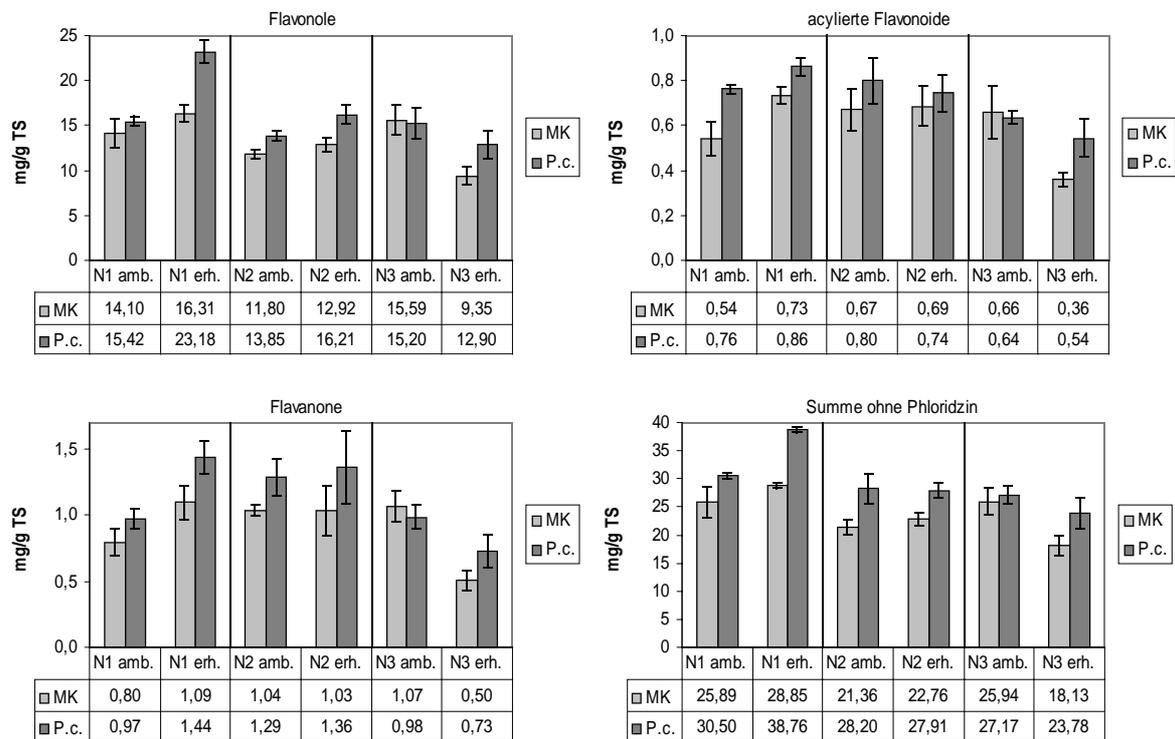


Abb. 54: Gehalte an Flavonolen, acylierten Flavonoiden, Flavanonen und der Gesamtsumme ohne Phloridzin in der Rinde von M9 nach Kohlendioxidbehandlung; MK: Kontrolle mit Medium MK; P.c.: mit *Phytophthora cactorum* inokulierte Variante; amb.: 400 ppm CO₂; erh.: 700 ppm CO₂

CO₂-Einfluss in der Stickstoffstufe N1

Die Versuchsglieder der mit 700 ppm Kohlendioxid versorgten Pflanzen zeigten in den Kontrollen (MK) leicht erhöhte Gehalte an Flavonolen, acylierten Flavonoiden und Flavanonen im Vergleich zu den ambient mit Kohlendioxid versorgten Pflanzen (Abb. 54). Die Gesamtsumme an Phenylpropanoiden ohne Phloridzin zeigte nur einen sehr geringen Unterschied in der Kontrolle MK (Abb. 54).

Im Gegensatz dazu kam es nach Infektion zu einer deutlichen Akkumulation von Flavonolen und Flavanonen in der 700 ppm-CO₂-Variante (Abb. 54). Leichte Anreicherungen nach Infektion waren auch in der mit 400 ppm CO₂ konditionierten Variante gegenüber der MK-Kontrolle nachweisbar, allerdings fiel die Reaktion auf die Infektion erheblich schwächer aus. Durch die erhöhte Kohlendioxidkonzentration kam es zu einer deutlich stärkeren Akkumulation von Phenylpropanoiden nach Inokulation mit *Phytophthora cactorum* in der Stickstoffstufe N1 (Abb. 54).

CO₂-Einfluss in der Stickstoffstufe N2

In der Stickstoffstufe N2 war eine erhöhte Akkumulation von Flavonolen nach der Infektion bei den Bäumen, die mit erhöhter Kohlendioxidkonzentration begast wurden, aufzeigbar (Abb. 54; Flavonole). Ansonsten waren keine Unterschiede zwischen den Kohlendioxidvarianten innerhalb der Stickstoffstufe N2 vorhanden.

Eine Akkumulation nach Infektion war bei beiden CO₂-Regimen nachweisbar (Abb. 54).

CO₂-Einfluss in der Stickstoffstufe N3

Durch die Konditionierung unter erhöhter Kohlendioxidkonzentration kam es in der Kontrollvariante MK zu einer deutlichen Verringerung im Gehalt an Flavonolen, acylierten Flavonoiden und Flavanonen. Auch die Gesamtsumme ohne Phloridzin zeigte einen deutlich geringeren Gehalt nach Konditionierung mit erhöhtem Kohlendioxidgehalt (Abb. 54).

Durch die Inokulation kam es unter erhöhtem Kohlendioxidgehalt zu einer deutlichen Akkumulation an verschiedenen Phenylpropanoiden gegenüber MK. Im Gegensatz dazu war in den ambient mit Kohlendioxid versorgten Bäumen keine Anreicherung nach Infektion gegenüber MK in der Stickstoffstufe N3 nachweisbar (Abb. 54).

Zusammenfassung der CO₂-Ergebnisse

In N1 konnte eine Steigerung des Phenylpropanoidgehalts und eine verstärkte Akkumulation nach Infektion bei 700 ppm-CO₂-Konditionierung nachgewiesen werden. Die Variante der Stickstoffstufe N3 verhielt sich dazu gegenläufig: Bei erhöhtem Kohlendioxidgehalt waren in den Kontrollen deutlich geringere Gehalte gefunden worden. Nach Infektion kam es in N3 in der mit 700 ppm konditionierten Variante zur deutlichen Akkumulation von Phenylpropanoiden, in der mit 400 ppm konditionierten Variante hingegen zu keiner Akkumulation. In der Stickstoffstufe N1 folgte nach beiden CO₂-Konditionierungen eine Akkumulation nach Infektion.

Unterschiede zwischen den Stickstoffstufen

Unter ambientem Kohlendioxidgehalt konditionierte Pflanzen zeigten keine deutlichen Unterschiede zwischen den Stickstoffstufen.

Im Gegensatz dazu nahm der Gehalt an Phenylpropanoiden mit steigender Stickstoffgabe in der Variante mit erhöhtem Kohlendioxid deutlich ab. Dies traf sowohl für die Kontrollvarianten als auch für die inokulierten Varianten zu (Abb. 54).

4 Diskussion

4.1 Phenylpropanoidgehalte im intakten Rindengewebe unterschiedlicher Genotypen

Um den Einfluss der Phenylpropanoide auf die Abwehrreaktion unterschiedlicher Apfelsorten und Unterlagen gegen *Phytophthora cactorum* zu untersuchen, war es zunächst wichtig den Gehalt an Phenylpropanoiden im intakten Rindengewebe zu bestimmen.

In den Ergebnissen dieser Untersuchungen (Abb. 13) wurden klare Unterschiede zwischen den einzelnen Sorten und Unterlagen nachgewiesen. Der Gesamtgehalt an Phenylpropanoiden in der intakten Phloemkambialschicht ist nicht als eindeutiger Marker für die Anfälligkeit gegenüber *Phytophthora cactorum* zu betrachten, weil die als tolerant bezeichnete Unterlage M9 (ALEXANDER und STEWART 2001) den geringsten Gehalt an Phenylpropanoiden enthielt. Gleichzeitig zeigte sich aber für die sehr anfällige Sorte 'Topaz' ebenfalls ein deutlich geringerer Gehalt an Phenylpropanoiden als in den Sorten 'Golden Delicious' und 'Rewena' und der Unterlage MM106. Bei Betrachtung des Phloridzingehalts, der von ALT und SCHMIDLE (1980) als bedeutend für die Abwehr gegen *Phytophthora cactorum* diskutiert wurde, zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Sorten und der Unterlage MM106. Die tolerante Unterlage M9 besaß den geringsten Gehalt (Abb. 13). Dies steht im Widerspruch zu ALT und SCHMIDLE (1980), die den Phloridzingehalt im Rindengewebe als Marker für die Abwehrfähigkeit diskutiert haben. Eine Beteiligung von Phloridzin an der Abwehr gegen *Phytophthora cactorum* kann aber nicht ausgeschlossen werden, weil Phloridzin über mehrere Reaktionsschritte als Vorstufe von sehr reaktiven *o*-Chinonen gilt (Abb. 55) (RAA und OVEREEM 1968) und sowohl Phloridzin als auch dem Aglykon Phloretin in der Pathogenabwehr gegen *Venturia inaequalis* eine wichtige Rolle zugeschrieben wird (ELSTNER et al. 1996; HUNTER und HULL 1993; NOVEROSKE et al. 1964a; NOVEROSKE et al. 1964b).

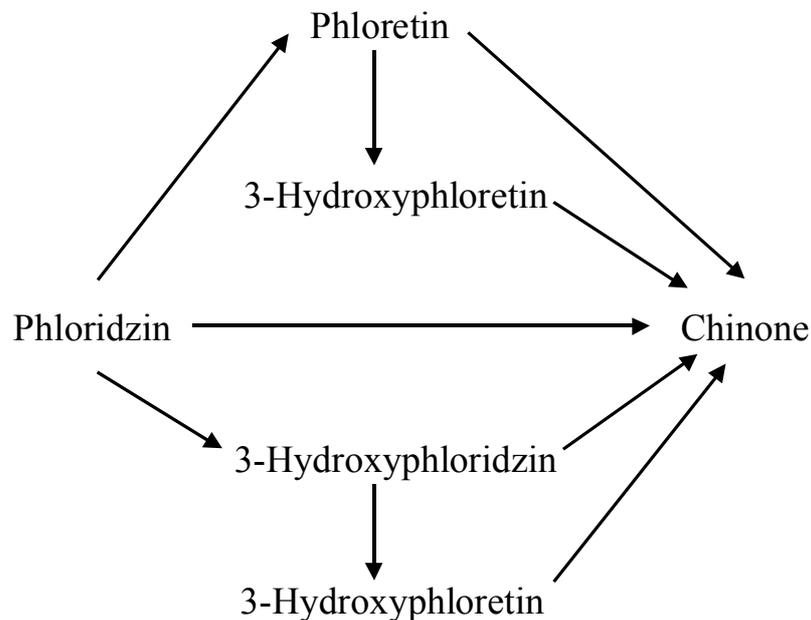


Abb. 55: Bildung von Chinonen aus Phloridzin nach HUNTER (1975) und RAA und OVEREEM (1968)

Der im Vergleich zu den anderen Genotypen nur 50 %-ige Gehalt an Flavonolen bei der sehr anfälligen Sorte 'Topaz' legte den Gedanken nahe, dass der Gehalt an Flavonolen für die Abwehrfähigkeit gegen *Phytophthora cactorum* von zentraler Bedeutung ist. Dies steht im Widerspruch zu ALT und SCHMIDLE (1980) und SCHWINN (1965), die zum einen einen nur sehr schwachen inhibierenden Effekt auf das *in-vitro*-Mycelwachstum, zum anderen sogar eine leichte Förderung des Wachstums von *Phytophthora cactorum* festgestellt haben.

Der hohe Gehalt an Flavanonen in der unverwundeten Phloemkambialschicht von 'Rewena' basierend auf dem erheblich höheren Gehalt an Naringenin 7-glucosid im Vergleich zu den anderen untersuchten Genotypen (Abb. 13) macht eine mögliche Umsteuerung innerhalb des Phenylpropanoidstoffwechsels deutlich. Als Erklärung könnte ein enzymatisch höher regulierter Gehalt an Naringenin 7-glucosid in Frage kommen. Vorstellbar wäre eine Flavanonanreicherung in frühen Stufen der Phenylpropanoidbiosynthese um auf Veränderungen möglichst flexibel reagieren zu können.

Besonders hervorzuheben ist, dass beide Substanzen im Rahmen dieser Arbeit für die Apfelrinde erstmals nachgewiesen wurden. Eriodictyol 7-glucosid wurde im Apfelblatt von RÖMMELT et al. (2003) ausschließlich nach Hemmung der Flavanon 3-hydroxylase durch den Wachstumsregulator Prohexadion-Ca festgestellt

Von besonderem Interesse war die Beobachtung, dass die Unterlage MM106 konstitutiv 2 bis 5-mal höhere Gehalte an Catechin, Epicatechin und Proanthocyanidinen in der Phloemkambialschicht aufzuweisen hatte als die anderen untersuchten Genotypen (Abb. 13). Dies war beim Vergleich der Untersuchungen nach Verwundung von besonderer Bedeutung, worauf im nächsten Kapitel ausführlich eingegangen wird.

Der Phloridzingehalt der Rinde liegt nach früheren Arbeiten in einem Bereich von 5,8 % bis 12 % der Trockenmassen (ALT und SCHMIDLE 1980; LOCKARD und SCHNEIDER 1982; MARTIN und WILLIAMS 1967; WILLIAMS 1966). Die hohen Phloridzingehalte von 12 % konnten in keinem Fall gemessen werden. Der Phloridzingehalt schwankte ohne Verwundung je nach Genotyp zwischen 5,5 % und 8,0 % (Abb. 13). Nach Infektion wurde ein Maximalwert von 10,6 % erreicht (Tab. 18).

Für andere Phenylpropanoide sind aus der Literatur keine Vergleichswerte für die Rinde bekannt. Beim Vergleich der Gehalte in der Rinde mit Werten aus dem Apfelblatt (MAYR 1995; MAYR et al. 1996) lässt sich zeigen, dass Phloridzin, Flavonole und Flavanole in beiden Geweben in sehr ähnlichen Konzentrationen vorliegen.

4.2 Reaktion des Rindengewebes auf Verwundung

Als Reaktion auf die Verwundung mit dem Korkbohrer wurde wegen der Wundreaktion ein generell geringerer Gehalt an Phenylpropanoiden in der Reaktionszone als in der Umgebungszone nachgewiesen (Abb. 14, 15 und 16). Nur die Flavanole Catechin und Epicatechin und die Derivate der Kaffeesäure konnten entweder in gleicher oder in höherer Konzentration gefunden werden. Dieses Resultat ließ sich für alle untersuchten Genotypen und auch für die unterschiedlichen Stickstoffversorgungen zeigen. Wie COUTTS (1977) und RAYNER und BODDY (1988) feststellten, kommt es in Folge von Verwundung zu einer erhöhten Konzentration reaktiver Sauerstoffspezies, die wiederum mit der Produktion von antimikrobiellen Phenolen gekoppelt ist. Nach ELSTNER et al. (1994) sind Phenole von besonderer Bedeutung für die Wundheilung, weil sie zur Bildung struktureller Barrieren des Melanintyps und zur Superoxidproduktion benötigt werden. Eine Anreicherung im Gesamtgehalt an Phenylpropanoiden wurde in der direkten Umgebung der Verwundung, der Reaktionszone nicht nachgewiesen, was durch die nach 4 Wochen fortgeschrittene Wundreaktion zu erklären ist. Die Gehalte an oxidierten Melaninen wurden nicht untersucht. Es ist aber davon auszugehen, dass ein

Großteil der Phenylpropanoide im Rahmen erster Wundverschlussprozesse von der Pflanze verwendet wurde. Die erhöhten Gehalte an Catechin, Epicatechin und Kaffeesäuren machen aber deutlich, dass durch die Verwundung eine besondere Aktivierung des Phenylpropanoidstoffwechsels stattgefunden haben muss. Während die Kaffeesäuren im Phenylpropanoidstoffwechsel als frühe Metabolite zu betrachten sind, stellen Catechin und Epicatechin eher späte Metabolite dar (FORKMANN und HELLER 1999; Abb. 2). Wenn man von einer gezielten Regulation in der Reaktionszone ausgeht, lässt sich postulieren, dass diese drei Metabolite für die Wundreaktion von besonderer Bedeutung sind. Es kann aber auch eine Verlagerung aus der Umgebungszone als mögliche Ursache für die Verschiebungen in den Gehalten betrachtet werden.

Bei einem Vergleich der konstitutiv in der Phloemkambialschicht vorhandenen Gehalte mit den Gehalten der Umgebungszone nach Verwundung fiel besonders ins Auge, dass sich für die Unterlage MM106 und die Sorte `Topaz` kaum Unterschiede zeigten. Während es bei den Sorten `Rewena`, `Golden Delicious` und der Unterlage M9 zu erheblich höheren Gehalten an Phenylpropanoiden in der Umgebungszone nach Verwundung kam, scheinen `Topaz` und MM106 auf Verwundung kaum mit Akkumulationen zu reagieren.

In Tabelle 20 sind zur einfacheren Vergleichsmöglichkeit die Intensitäten der Akkumulationen dargestellt.

Tab. 20: Akkumulation von Phenylpropanoiden nach Verwundung, Vergleich unverwundete und verwundete Phloemkambialschicht (nach Abb. 13, 14 und 15) ; „+++“= starke Akkumulation, „++“= Akkumulation, „+“= leichte Akkumulation, „0“=kein Effekt, „-“=Gehaltsrückgang, „--“=starker Gehaltsrückgang

	MM106	`Topaz`	`Rewena`		`Golden Delicious`		M9	
			N1	N3	N1	N3	N1	N3
Gesamtsumme	0	0	0	+	++	++	+++	+++
Phloridzin	0	0	+	++	++	++	+++	+++
Flavonole	0	0	0	0	0	-	+++	++
acylierte Flavonoide	-	+	++	++	++	++	+++	++
Flavanone	++	0	+	+	0	+	+++	++
Catechin und Epicatechin	++	0	0	+	+	+	+++	+++
Proanthocyanidine	--	0	++	++	+++	+++	+++	+++

Aus der Tabelle sind drei besonders zu diskutierende Ergebnisse zu entnehmen:

1. Die Sorte `Topaz` zeigt keine deutliche Reaktion auf Verwundung.
2. Die Unterlage M9 reagiert auf Verwundung mit sehr starker Akkumulation von nahezu allen Klassen von Phenylpropanoiden.
3. Besonders bei Betrachtung der Flavonole fällt auf, dass nur bei der Unterlage M9 Akkumulationen nachweisbar sind.

Dass die Sorte `Topaz` und die Unterlage MM106 auf Verwundung nicht mit deutlichen Akkumulationen von Phenylpropanoiden reagieren, ist besonders interessant weil zum einen die Unterlage MM106 nach zahlreichen Quellen als besonders anfällig für *Phytophthora cactorum* eingestuft wird (ALT 1978; BROWN und HENDRIX 1980; JEFFERS und ALDWINCKLE 1986; JEFFERS und ALDWINCKLE 1988; JULIS et al. 1978; McINTOSH 1975; L. PLATZGUMMER mündlich 2001; TIDBALL 1990; UTKEHDE 1986), zum anderen auch für die Edelsorte `Topaz` von starken Ausfällen durch das Pathogen berichtet wurde (LARDSCHNEIDER et al. 2002; MORNAU et al. 2002). Dies unterstützt den Gedanken, dass die Fähigkeit zur Akkumulation von Phenylpropanoiden in der Rinde nach Verwundung als wichtiger Abwehrfaktor des Apfels gegen *Phytophthora cactorum* betrachtet werden kann. Auch die besonders starke Akkumulationsfähigkeit der nach ALEXANDER und STEWART (2001), ALT (1978; 1982) und nach der mündlichen Aussagen von L. PLATZGUMMER (2001) als tolerant einzustufenden Unterlage M9 stützt diesen Gedanken im Umkehrschluss besonders.

Dass Flavonole für die Abwehrfähigkeit wichtig sind, wird für die Unterlage M9 durch die nachgewiesene deutliche Akkumulation nach Verwundung gestützt. Bei keinem anderen untersuchten Genotyp konnte eine Akkumulation an Flavonolen nach Verwundung nachgewiesen werden. Für die Sorte `Golden Delicious` in der Stickstoffstufe N3 (Tab. 20) war sogar eine Reduktion im Gehalt festzustellen. Gleichzeitig waren für diese Bäume nach Infektion große Nekrosenflächen gemessen worden (Abb. 27 und 28).

4.3 Wirt-Parasit-Interaktionen

4.3.1 Chitinaseaktivität in der Rinde von Apfel

Die Chitinaseaktivitäten wurden mit Werten von 2 bis 20 U/g TS in der Rinde des Apfels nachgewiesen (Abb. 18). Diese im Vergleich zu Kartoffelblättern mit Aktivitäten von 136 U/g TS bis zu 1555 U/g TS (PLESSL 2002) geringen Werte in der Apfelinde lassen sich durch die unterschiedlich aktiven Gewebe erklären. Die gemessenen Werte an Kartoffelblättern stammen aus der Vegetationsperiode mit voll entwickelten und photosynthetisch aktiven Blattorganen. Die Untersuchungen beim Apfel gehen auf Rindengewebe von Bäumen zurück, die sich physiologisch in der Dormanz befanden.

In den Stickstoffstufen N2 und N3 der gegen Apfelschorf (*Venturia inaequalis*) anfälligen Sorte 'Golden Delicious' kam es zu einer Aktivitätssteigerung durch die Pathogenbehandlung (Abb. 18). Dies weist auf eine Aktivierung der Abwehr hin, wie sie PLESSL (2002) für die *Phytophthora infestans* anfällige Kartoffelsorte 'Indira' zeigen konnte. Die deutlich geringer anfällige Kartoffelsorte 'Bettina' zeigte keine deutlichen Unterschiede zwischen den infizierten und den nichtinfizierten Varianten (PLESSL 2002). Gleiches wurde für die Chitinaseaktivitäten der gegen *Venturia inaequalis* resistenten Apfelsorte 'Rewena' nach Infektion mit *Phytophthora cactorum* festgestellt (Abb. 18).

Eine Erklärung für die geringen Aktivitäten der Chitinase nach Infektion lässt sich aus der fehlenden Zielgerichtetheit einer Chitinaseinduktion ableiten, weil der Oomycet *Phytophthora cactorum* kein Chitin in seiner Zellwand besitzt (DICK 1990, KUMAR und RZHETSKY 1996).

Im Apfelblatt wurde die Aktivierung von systemisch erworbener Resistenz (SAR) nach Infektion mit dem Erreger des Feuerbrandes (*Erwinia amylovora*) innerhalb weniger Stunden nachgewiesen (VENISSE et al. 2002). Dabei konnte ein Aktivitätssteigerung der Chitinase im Blatt der Unterlage MM106 nach 24 h beobachtet werden. Interessant ist, dass bereits nach 72 h eine Abnahme der Aktivität der Chitinase festgestellt wurde. Vermutlich ist zu dem Zeitpunkt der Messungen in dieser Arbeit, 28 d nach Infektion, die Abwehrreaktion bereits zum Stillstand gekommen. Das Aufrechterhalten von SAR über den langen Zeitraum von 28 d ist durch die Ergebnisse in Frage zu stellen. Die Ergebnisse stehen in Einklang mit DEMPSEY et al. (1999), wonach SAR bis zu einer Woche nachweisbar ist. BRISSET et al. (2000) wiesen im Gegensatz dazu ein Aufrechterhalten der SAR im Apfelblatt über 17 d nach. Diese Ergebnisse

lassen es durchaus denkbar erscheinen, dass sich eine Aktivitätssteigerung der Chitinase auch nach 28 d noch hätte nachweisen lassen können.

4.3.2 β -1,3-Glucanaseaktivität in der Rinde von Apfel

Die starke Streuung der Werte für die Glucanaseaktivität in der Rinde der Sorte 'Golden Delicious' (Abb. 19) lässt den Schluss zu, dass keine koordinierte Induktion der Glucanaseaktivität abzulaufen scheint. Die Werte für die Sorte 'Rewena' dagegen sind einheitlicher und höher (Abb. 19). Bei 'Rewena' zeigt die Glucanaseaktivität keine Reaktion auf die Infektion mit *Phytophthora cactorum*. Auch gibt es keine Unterschiede der reinen Kontrollverwundungen gegenüber der infizierten Variante, was den Schluss nahelegt, dass entweder keine Reaktion durch die unterschiedlichen Behandlungen eintritt, oder dass allein die Verwundung schon zur vollen Aktivierung der Glucanaseaktivität ausreicht. Die gemessenen Werte bei 'Rewena' zwischen 60 und 90 U/g TS liegen im Bereich der in Kartoffelblättern nachgewiesenen Werten. Dort wurden Umsätze zwischen 13 und 198 U/g TS gemessen (PLESSL 2002). Eine Induktion wie sie PLESSL (2002) nach Infektion mit *Phytophthora infestans* bei der anfälligen Sorte 'Indira' nachweisen konnte, wurde für Apfel nicht bestätigt.

Sowohl die nicht koordinierte Reaktion bei der Sorte 'Golden Delicious' als auch die einheitlichen Werte bei der Sorte 'Rewena' stehen im Widerspruch zu der von BRISSET et al. (2000) nachgewiesenen Steigerung der β -1,3-Glucanaseaktivität bei Apfel durch Acibenzolar-S-methyl, die zeigt, dass der Apfel generell induzierbar ist. Es muss aber betont werden, dass sich die Resultate von BRISSET et al. (2000) auf das Blatt bezogen. Dies kann auch als mögliches Indiz gewertet werden, dass entweder die Apfelfrinde nicht induzierbar ist oder dass der physiologische Zustand der Dormanz eine Induktion verhindert.

Wie bei der Chitinaseaktivität diskutiert, kann auch der Zeitpunkt der Messung, 28 d nach Infektion, für die nicht nachweisbare Induktion der Glucanaseaktivität durch Infektion mit *Phytophthora cactorum* verantwortlich sein.

4.3.3 Wirkung des gereinigten Kulturfiltrats

Das gereinigte Kulturfiltrat des *Phytophthora cactorum*-Stammes Iso 2 löste in Tabakblättern Nekrosen aus (Abb. 21-23), wie es nach der Infiltration von Elicitinen oder elicitinethal-

tenden Kulturfiltraten häufig beobachtet wurde (BAILLIEUL et al. 1996; BECKER et al. 2000; BINET et al. 1998; CAPASSO et al. 1999; HEISER et al. 1999; KELLER et al. 1996; KOEHL et al. 2003; MILAT et al. 1991; RICCI et al. 1989). Diese hypersensitive Reaktion geht mit einer Reihe physiologischer Prozesse einher, die im Tabakblatt (HEISER et al. 1999), an Tabakzellkulturen (KOEHL et al. 2003) und an Eichen (Elicitin Quercinin) (Brummer et al. 2002) genauer untersucht wurden. Dabei konnte gezeigt werden, dass Membranstrukturen zerstört wurden und ein 'oxidative burst' für den Zelltod verantwortlich war. Die gezeigten Nekrosen in Tabakblättern (Abb. 21-23) sind Indiz für die biologische Aktivität des gereinigten Kulturfiltrats, das auch für die Arbeiten an der Apfelrinde verwendet wurde.

In der Rinde von 'Topaz' wurden Reaktionen im Phenylpropanoidstoffwechsel nach Behandlung mit dem Kulturfiltrat hervorgerufen (Abb. 24). Die Anreicherung von Chlorogensäure und Epicatechin (Abb. 24) in der Rinde nach Behandlung mit dem Kulturfiltrat wurde auch bei Kontrollverwundungen nachgewiesen (Abb. 14) und ist möglicherweise allein auf die Verwundung zurückzuführen. Die Akkumulationen der Substanzen 2, 7 und 11 (Abb. 24) traten nach der Behandlung mit dem gereinigten Kulturfiltrat in den vorgestellten Untersuchungen erstmals auf. Diese Anreicherungen der Substanzen 2 und 7 konnten auch nach Infektion mit *Phytophthora cactorum* gezeigt werden (Abb. 41; Abb. 48-53). Offensichtlich spielen diese Substanzen für die Interaktion der Pflanze mit dem Pathogen eine wichtige Rolle. Interessant ist, dass die Pflanze auf die Infiltration mit dem gereinigten Kulturfiltrat sehr selektiv reagiert. Es wurden außer diesen Akkumulationen keine weiteren Veränderungen im Phenylpropanoidstoffwechsel nachgewiesen.

Von MEZZETTI et al. (1994) wurden die Veränderungen der Plasmamembran von Apfelzellen der Genotypen MM106 und MM111 untersucht. Zellmembranen des anfälligen Genotyps MM106 wurden im Gegensatz zu den Zellmembranen des Genotyps MM111 von dem Elicitin Cactorein nicht in ihrem elektrochemischen Potential verändert.

Die Veränderungen des Membranpotentials bei Apfelzellen durch das Elicitin Cactorein (MEZZETTI et al. 1992; 1994) und die gezeigten Veränderungen im Phenylpropanoidstoffwechsel sprechen gegen die Theorie von BRUCE (1996), dass Elicitine nur für Interaktionen mit *Nicotiana tabacum* und *Raphanus sativus* von Bedeutung seien.

Die Veränderungen im Gehalt an Chlorogensäure und Epicatechin legen dar, dass das Kulturfiltrat mit dem enthaltenen Elicitin eine Reaktion in der Rinde des Apfelbaumes auslösen kann. Die identische Reaktion nach Infektion ist ein Indiz für eine klar reproduzierbare Interaktion zwischen dem Pathogen und der Pflanze, die wahrscheinlich auf das im

Kulturfiltrat enthaltene Elicitin zurückzuführen ist. Besonders beachtet werden muß, dass es sich bei der untersuchten Interaktion um Partner einer kompatiblen Wirt-Parasit-Interaktion handelte. Der Pathogenstamm Iso2 wurde von der Apfelsorte 'Topaz' isoliert und löste dort bis zu 7 % Baumausfälle aus (LARDSCHNEIDER et al. 2002; MORNAU et al. 2002). Die ebenfalls kompatible Wirt-Parasit-Interaktion des Gummibaums (*Hevea brasiliensis*) und *Phytophthora palmivora* untersuchten CHURNGCHOW und RATTARASARN (2000). Sie wiesen neben der Wirkung des gereinigten Elicitins auf Tabak auch Nekrosenbildung durch das Elicitin Palmivorein am Blatt des Gummibaums nach. Auch Palmivorin gehört wie das Cactorein zu den α -Elicitinen. In Tabakzellkulturen wurde eine Aktivierung der Phenylalaninammoniumlyase durch Behandlung mit dem Elicitin Megaspermin festgestellt (DOREY et al. 1999). Eine Aktivierung von Genen, die für Enzyme des Phenylpropanoidmetabolismus codieren, konnte ebenfalls gezeigt werden (BECKER et al. 2000; SASABE et al. 2000). MILAT et al. (1991) und DUBERY et al. (1994) wiesen nach Elicitinbehandlung von Tabakzellkulturen die Akkumulation von Capsidiol und anderen Sesquiterpenoiden nach.

Dass Elicitine in der Lage sind, systemisch induzierte Resistenz auszulösen wurde vielfach berichtet (BONNET et al. 1996; DUBERY et al. 1994; PONCHET et al. 1999; RICCI et al. 1989; 1992). Meist wurden dabei aber inkompatible Wirt-Parasit-Beziehungen untersucht. Mit den vorliegenden Ergebnissen konnte nachgewiesen werden, dass durch die Vorbehandlung mit dem gereinigten Kulturfiltrat in der Stickstoffstufe N1 eine deutliche Reduktion der Nekrosenflächen nach einer folgenden Infektion erreicht werden konnte (Abb. 25). In N1 führt eine Vorbehandlung mit dem Kulturfiltrat nach 7 Tagen zu erhöhter Abwehrfähigkeit gegenüber einer Neuinfektion mit *Phytophthora cactorum*. Interessanterweise trat dieser Effekt in der Stickstoffstufe N3 nicht auf. Es kann davon ausgegangen werden, dass entweder die erhöhte Stickstoffdüngung den Effekt der SAR-Ausbildung unterbunden hat, oder aber zumindest so stark abschwächte, dass keine Reaktion auf das Pathogen zu beobachten war (Abb. 25). BONNET et al. (1996) zeigten die Ausbildung von SAR in Tabak mit Schutzraten bei der Infektion nach Elicitinbehandlung von bis zu 90 %. Allerdings wurde die SAR-Ausprägung nur für Tabak bewiesen. Im Gegensatz dazu konnten sie bei einer Reihe von anderen Arten, die auf Elicitinbehandlung nicht mit Nekrotisierung reagierten, keine SAR-Ausbildung durch das Elicitin aufzeigen.

4.3.4 Bedeutung der Position der Infektion am Stamm für die Pathogenese

Bei Infektionen in unterschiedlichen Stammhöhen wurde ein Effekt durch die Position der künstlichen Infektion auf die vom Pathogen gebildete Nekrosenfläche festgestellt. Dabei nahm die Nekrosenfläche mit zunehmendem Abstand von der Stammbasis zu (Abb. 28-32). Dieser Zusammenhang war zum einen sortenabhängig (Abb. 29-31), zum anderen auch durch die Stickstoffdüngung beeinflussbar (Abb. 32). Bei starker Stickstoffdüngung (N3) wurde der Zusammenhang zwischen der gebildeten Nekrosenfläche und der Position der Infektion verstärkt.

Der Zusammenhang zwischen Nekrosengröße und der Position der Infektion am Stamm wurde von GUPTA und SINGH (1979) erstmals beschrieben. Eine Untersuchung der Ursache dieses Effektes wurde bisher jedoch nicht vorgenommen. Als möglichen Grund der unterschiedlichen Anfälligkeiten in Abhängigkeit der Entfernung zur Stammbasis wurde untersucht, ob der Gehalt an Phenylpropanoiden für diesen Effekt verantwortlich sein könnte. So konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein Zusammenhang zwischen der Konzentration an Phenylpropanoiden und der Position am Stamm dergestalt nachgewiesen werden, dass mit zunehmender Entfernung von der Stammbasis eine Abnahme im Gehalt an Phenylpropanoiden feststellbar war (Abb. 34-38). Gleichzeitig konnte eine Verringerung des Gehalts an Phenylpropanoiden durch stärkere Stickstoffdüngung gezeigt werden (Abb. 34, 35). Die Veränderungen im Gehalt an Phenylpropanoiden durch Position und Stickstoffdüngung decken sich mit den Veränderungen der Nekrosenflächen. Sowohl bei weiterer Entfernung der Infektion von der Stammbasis als auch durch höhere Stickstoffdüngung kam es zu größeren Nekrosenflächen. Gleichzeitig führte eine weitere Entfernung von der Stammbasis und eine Erhöhung der Stickstoffdüngung zu einer Verringerung im Phenylpropanoidgehalt.

Dieser Zusammenhang ist als Indiz zu werten, dass Phenylpropanoide in der Rinde des Apfels eine bedeutende Rolle bei der Abwehr gegen *Phytophthora cactorum* spielen. Hierin ist eine Parallele zur Abwehr von *Venturia inaequalis* zu sehen, für die MAYR et al. (1997) Phenylpropanoide verantwortlich machten.

In Untersuchungen zur Problematik der Veredlungsunverträglichkeit bei Kirschen wiesen TREUTTER und FEUCHT (1991) Akkumulationen von Flavan 3-olen und von den beiden Flavonoide Genistein und Prunin (Naringenin 7-glycosid) über der Veredlungsstelle nach. Sie führten diesen Effekt auf Veredlungsstress zurück. In der Arbeit von TREUTTER und FEUCHT

(1991) wurde im Gegensatz zu den vorliegenden Untersuchungen nur der Bereich von 0 - 4 cm über der Veredlungsstelle auf Phenylpropanoide analysiert. In Übereinstimmung mit den höchsten Gehalten bei Kirschen sehr nah an der Veredlungsstelle konnte für Apfel der höchste Gehalt an Phenylpropanoiden in 3 cm Entfernung von der Veredlungsstelle festgestellt werden (Abb. 34, 35). Dass der Effekt des abnehmenden Gehalts an Phenylpropanoiden mit zunehmendem Abstand von der Veredlungsstelle nicht allein auf Veredlungseffekte zurückzuführen ist, wurde mit Untersuchungen an unveredelten Bäumen der Unterlage MM106 gezeigt (Abb. 36, 37, 38). Ein Einfluss der Veredlung kann nicht ausgeschlossen werden. Die vorgestellten Daten zeigen aber, dass ein Zusammenhang zwischen dem Gehalt an Phenylpropanoiden und der Entfernung zur Stammbasis bzw. zur Veredlungsstelle unabhängig von einem möglichen Veredlungseinfluss besteht.

Im Rahmen von Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Stickstoffformen und Applikationsmethoden auf die Stärke des Befalls der Apfelunterlage MM106 mit *Phytophthora cactorum* wurde nachgewiesen, dass in den Varianten mit Düngung signifikant höhere Infektionen und signifikant höhere Baumausfallraten zu verzeichnen waren (UTKHEDE und SMITH 1995). Diese Stickstoffeffekte decken sich mit dem Einfluss der Stickstoffdüngung auf die Nekrosenflächen (Abb. 34, 35). Die Infektionsmethoden wichen aber bei den Untersuchungen stark voneinander ab. Während UTKHEDE und SMITH (1995) Sporensuspensionen auf den unverwundeten Wurzelansatz applizierten, wurden die Bäume in der vorliegenden Arbeit mittels der Korkbohrermethode gezielt verwundet. Dass die Ergebnisse beider Untersuchungen ein ähnliches Resultat hervorgebracht haben, führt zu dem Schluss, dass die Infektionsmechanismen selbst nicht der ausschlaggebende Grund für einen stärkeren Befall nach höherer Stickstoffdüngung darstellen, sondern dass endogene Faktoren, wie beispielsweise der Phenylpropanoidgehalt, für die Entwicklung von zentraler Bedeutung sind. Im Gegensatz dazu wurde von SCHWINN (1965) festgestellt, dass bei einem *in-vitro*-Testsystem zur Untersuchung der Anfälligkeit gegen *Phytophthora cactorum* mit Zweigen von Apfelbäumen die Borkendicke als mechanische Barriere den entscheidenden Abwehrfaktor für eine Infektion darstellt. Gleichzeitig war aber *Phytophthora cactorum* in der Lage, an der Stammbasis unabhängig von vorheriger mechanischer Verletzung unterschiedliche Genotypen zu infizieren. Die Ergebnisse von SCHWINN (1965) und UTKHEDE und SMITH (1995) lassen mit den vorliegenden Ergebnissen den Schluss zu, dass die Borkendicke nicht der die Infektion bestimmende Faktor sein kann, dass andererseits die Stickstoffdüngung einen wichtigen

Einfluss auf die Infektion (UTKEHDE und SMITH 1995) und auf die Pathogenese als solche hat (Abb. 34, 35).

Der Effekt der Stickstoffdüngung auf den Phenylpropanoidmetabolismus wird in Kapitel 4.3.6 separat diskutiert.

4.3.5 Phenolgehalt nach Infektion

Als Reaktion auf die Infektion mit *Phytophthora cactorum* wurde eine Akkumulation von Phloretin vor allem in der Reaktionszone, teilweise auch in der Umgebungszone nachgewiesen (Abb. 40-47). Dieser Effekt konnte nur für die Unterlage MM106 nicht bestätigt werden (Abb. 39). Nach diesem Ergebnis ist die Unterlage MM106 möglicherweise nicht in der Lage, aus Phloridzin das zur Bildung von *o*-Chinonen wichtige Phloretin (HUNTER 1975; NOVEROSKE et al. 1964; RAA und OVEREEM 1968) (Abb. 55) freizusetzen. Dies kann als Ursache für die von BROWN und HENDRIX (1980), JEFFERS und ALDWINCKLE (1988), JULIS et al. (1978), McINTOSH (1975) und UTKEHDE (1986) berichtete hohe Anfälligkeit der Unterlage MM106 gegenüber *Phytophthora cactorum* gewertet werden. Auch die in den anderen Genotypen nachgewiesenen Akkumulationen der Substanzen 2 und 7 (Abb. 41, 48-53) konnte für die Unterlage MM106 nicht gezeigt werden.

Im Gegensatz dazu wurde bei 'Topaz' (Abb. 41), 'Rewena' (Abb. 48, 49) und 'Golden Delicious' (Abb. 50, 51) eine Akkumulation der Substanz 2 festgestellt. Der Gehalt an der Substanz 7 erhöhte sich ebenfalls nach Infektion, wobei die Anreicherung auf die Genotypen 'Topaz' (Abb. 41), 'Golden Delicious' (Abb. 50, 51) und M9 (Abb. , 53) beschränkt war. Auch nach der Behandlung mit dem gereinigten Kulturfiltrat von *Phytophthora cactorum*, welches das Elicitin Cactorein enthielt, konnte bei 'Topaz' eine Akkumulation der Substanzen 2 und 7 festgestellt werden (Abb. 24). Für die nach Elicitinbehandlung ebenfalls induzierte Substanz 11 (Abb. 24) wurde bei allen Genotypen nach Infektion aber keine Akkumulation gezeigt (Abb. 41, 48-53). Für die Substanzen 2 und 7 ist von einer spezifischen Antwort der Pflanze auf das Pathogen oder auf im gereinigten Kulturfiltrat enthaltene Substanzen zu sprechen. Weil aber speziell die als hochanfällig einzustufende Sorte 'Topaz' (LARDSCHNEIDER et al. 2002; MORNAU et al. 2002) bei den Infektionsversuchen mit der Ausbildung der größten Nekrosenflächen reagierte und gleichzeitig die Substanzen 2 und 7 deutlich akkumulierten, scheint ein direkter kausaler Zusammenhang mit einer effektiven Abwehr gegen das Pathogen eher unwahrscheinlich. Zusätzlich wäre eine genauere Charakterisierung der Substanzen und

eine Testung der Wirkung auf das Pathogen für weitere Aussagen nötig. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit wegen des geringen Gehaltes im Gewebe und wegen des großen Bedarfs an infiziertem Material nicht weiter untersucht.

Im Rindengewebe der Unterlage MM106 war nach Infektion eine Akkumulation von Phloridzin, Flavonolen, Flavanonen und Flavanolen in der Reaktionszone um die Infektion nachweisbar (Abb. 39). Gleichzeitig war diese Akkumulation in der Reaktionszone meist mit einer Gehaltsverringerung in der Umgebungszone verbunden, was auf einen möglichen Verlagerungseffekt hindeuten könnte. LAVOLA und JULKUNEN-TIITTO (1994) gehen davon aus, dass niedermolekulare phenolische Glycoside innerhalb der Pflanze verlagert werden können. Der Gehalt an *p*-Cumarsäurederivaten nahm bei MM106 (Abb. 39) und 'Topaz' (Abb. 40) nach Infektion in beiden untersuchten Zonen zu, ein Effekt der sonst nur noch bei der Unterlage M9 in der Variante N3 zu beobachten war (Abb. 47). Auch die Kaffeesäurederivate, die den anderen Teil der nachgewiesenen Hydroxyzimtsäurederivate in der Rinde des Apfels darstellen, wurden in 'Topaz' in beiden Zonen akkumuliert (Abb. 40). Diese Akkumulation von Kaffeesäurederivaten konnte in den beiden untersuchten Zonen auch für die mit unterschiedlicher Stickstoffdüngung behandelten Genotypen 'Rewena', 'Golden Delicious' und M9 gezeigt werden. Während die Akkumulationen von Kaffeesäurederivaten in der Stickstoffstufe N1 auf die Umgebungszonen begrenzt war und sehr moderat ausfielen (Abb. 42, 44, 46), konnten in der Stickstoffstufe N3 für 'Golden Delicious' (Abb. 45) und M9 (Abb. 47) für die Umgebungszonen Akkumulationen auf einen Gehalt von 200 % der Vergleichskontrollen festgestellt werden. Für die Reaktionszonen waren keine Effekte aufzeigbar. Allein die Sorte 'Rewena' steigerte den Gehalt an Kaffeesäurederivaten nach Infektion sowohl in der Reaktions- als auch in der Umgebungszone (Abb. 43; 56). Die Akkumulationen von Hydroxyzimtsäurederivaten nach Infektion deuten auf eine Aktivierung des Schlüsselenzyms des Phenylpropanoidmetabolismus, der Phenylalaninammoniumlyase, hin. Eine Aktivierung der Phenylalaninammoniumlyase nach Infektion mit Pathogenen wurde an Apfel nachgewiesen (VENISSE et al. 2002). An Tabak wurde dies nach Infektion oder Behandlung mit Elicitinen ebenfalls gezeigt (BECKER et al. 2000; SASABE et al. 2000). Auch die Akkumulation von Chlorogensäure nach Infektion ist bei Tabak bekannt (SHADLE et al. 2003).

Kaffeesäurederivate dürften wegen der wenigen Biosyntheseschritte zwischen dem Phenylalanin und der Kaffeesäure und der möglichen Bildung von *o*-Chinonen über Phenoloxidasen (ELSTNER et al. 1996; HUNTER 1975; NOVEROSKE et al. 1964a; RAA und OVEREEM 1968)

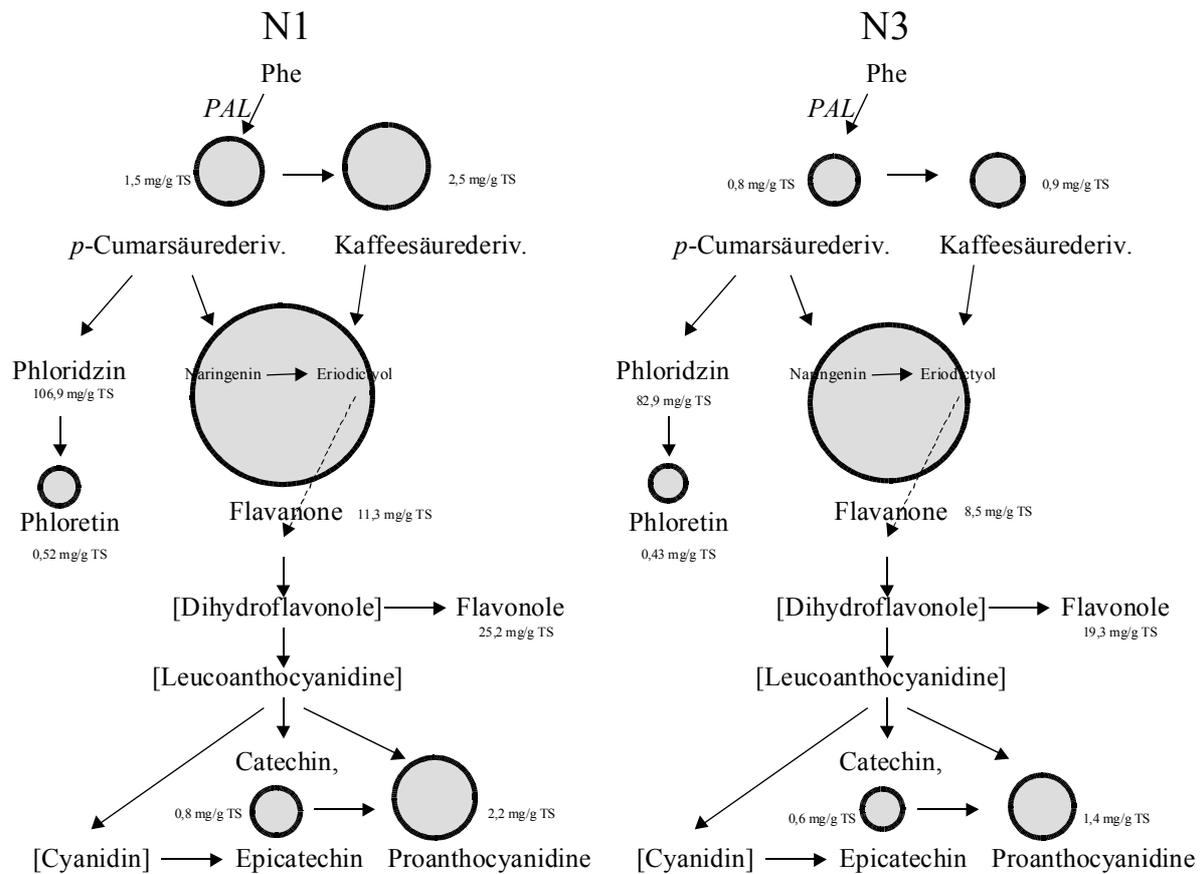


Abb. 56: Graphischer Vergleich der Gehalte an Phenylpropanoiden der Bastkambialschicht der Stickstoffstufen N1 und N3 von 'Rewena'; Umgebungszone nach Infektion mit *Phytophthora cactorum*.

von besonderer Bedeutung für die Abwehr sein. MICHAŁEK et al. (1999) zeigten eine Aktivierung der PAL, die mit einem Anstieg im Gehalt an Chlorogensäure und monomeren und polymeren Flavanolen einherging. Eine Verlagerung von Kaffeesäurederivaten aus der Umgebungszone in die Zone der aktiven Abwehr ist bei den verhältnismäßig kleinen Molekülen denkbar. In der Reaktionszone könnte damit eine Unterstützung der Biosynthese von Flavanolen erreicht werden. Gleichzeitig könnten Kaffeesäurederivate direkt über die Bildung hochreaktiver *o*-Chinone zur Abwehr beitragen.

Bei Betrachtung der Ergebnisse an der Unterlage M9 in der Stickstoffstufe N3 (Abb. 47) fiel eine ausschließlich in dieser Variante aufgetretene Akkumulation von monomeren Flavanolen und Proanthocyanidinen in der Reaktionszone auf. Durch diese starke Akkumulation nach Infektion ist M9 in der Lage auch in der Reaktionszone der Stickstoffstufe N3 die Gehalte, die für die Reaktionszone der Stickstoffstufe N1 gemessen wurden, zu erreichen. Allein M9 konnte in der Stickstoffstufe N3 nach Infektion den Gehalt an Phenylpropanoiden

von 100,8 mg/g TS auf 141,6 mg/g TS in der Reaktionszone erhöhen. Dieser Effekt wird von vielen Stoffklassen getragen, wie in Abb. 47 ersichtlich ist. Die starke Akkumulationsfähigkeit in der Reaktionszone und die zusätzliche Akkumulation von Hydroxyzimtsäurederivaten in der Umgebungszone sind als möglicher Grund der hohen Toleranz der Unterlage M9 zu bewerten. Die Toleranz muss hierbei als gute Abwehrfähigkeit interpretiert werden. M9 war auch der einzige Genotyp, für den sowohl in der Umgebungs- als auch in der Reaktionszone eine Akkumulation von Phloretin nach Infektion von über oder nahezu 200 % gezeigt werden konnte (Abb. 46, 47).

4.3.6 Effekte durch Veränderungen der Ressource Stickstoff auf Gehalte an Phenylpropanoiden in der Rinde

Durch erhöhte Stickstoffdüngung (N3) wurde eine Gehaltsminderung an Phenylpropanoiden in der Rinde ausgelöst (Tab. 17-19; Abb. 56). Beim Genotyp 'Golden Delicious' wird dieser Effekt durch Substanzen des gesamten Phenylpropanoidstoffwechsel getragen. Die Kaffeesäurederivate nahmen im Verhältnis zu den anderen Substanzen durch erhöhte Stickstoffdüngung überproportional ab (Tab. 18; Abb. 56). Dieser Effekt ist auf 'Rewena' beschränkt.

Erhöhte Versorgung mit Nährstoffen führte auch bei Eukalyptussämlingen zu einem geringeren Gehalt an phenolischen Inhaltsstoffen und kondensierten Tanninen (LAWLER et al. 1997), wenngleich BEZEMER et al. (2000) für das Gras *Poa annua* uneinheitliche Effekte durch die Stickstoffdüngung auf den Gehalt an Phenolen zeigen konnten. An Birkenämlingen war der Effekt der Verringerung im Gehalt an Phenylpropanoiden durch erhöhte Versorgung mit Nährstoffen auf die Substanzklassen der Proanthocyanidine und Flavonoide begrenzt (LAVOLA und JULKUNEN-TIITTO 1994). Für einfache phenolische Glycoside wiesen sie keine eindeutige Reaktion nach. Dies deckt sich mit dem uneinheitlichen Verhalten des Gehaltes an Hydroxyzimtsäurederivaten in der Rinde des Apfels (Tab. 17-19). LAVOLA und JULKUNEN-TIITTO (1994) gehen davon aus, dass niedermolekulare phenolische Glycoside leichter innerhalb der Pflanze transportiert werden können und zusätzlich einen schnelleren Stoffwechselumsatz als andere Metabolite des Phenylpropanoidstoffwechsels besitzen. Dies dürfte besonders auch für Hydroxyzimtsäuren zutreffen. Es wird als möglich angesehen, dass mobile Sekundärmetabolite wie einfache phenolische Glycoside und Hydroxyzimtsäurederivate nicht immer, wie nach der CNBH vorauszusehen, auf Kohlenstoff- oder Nährstoffstress reagieren, weil ihre

Produktion Teil eines aktiven metabolomischen Pools darstellt (BRYANT et al. 1991; JULKUNEN-TIITTO et al. 1993; REICHARDT et al. 1991).

Bei Untersuchungen an *Pinus palustris* wurde eine Zunahme im Gesamtgehalt an Polyphenolen und kondensierten Tanninen unter Bedingungen mit geringem Stickstoffgehalt im Boden nachgewiesen (PRITCHARD et al. 1997). Die Düngung von 120 Jahre alten Buchen mit Ammoniumnitrat verursachte eine Abnahme im Gehalt an phenolischen Inhaltsstoffen im Blatt (BALSBERG PAHLSSON 1992). Im Gegensatz dazu war eine Zunahme im Gehalt an freien Aminosäuren und der Gesamtstickstoffkonzentration im Blatt feststellbar. Diese Ergebnisse durch Stickstoffeinfluss auf den Phenylpropanoidgehalt decken sich mit den Resultaten in der Apfelrinde.

An Fichtensämlingen zeigten MUZIKA und PREGITZER (1992), dass sich eine Stickstoffdüngung in einem geringeren Gesamtgehalt an Phenylpropanoiden niederschlägt. Bei der genaueren Betrachtung der Einzelsubstanzen war aber ein uneinheitliches Bild bezüglich der Gehaltsverminderung festzustellen. Auch in der Apfelrinde war keine einheitliche Abnahme bzw. Zunahme bei Betrachtung der einzelnen Substanzklassen über die unterschiedlichen Genotypen zu finden (Tab. 17-19). Folglich kommt es durch erhöhte Stickstoffdüngung nicht zu einer einheitlichen Down-Regulation über den gesamten Phenylpropanoidstoffwechsel hinweg. Vielmehr weisen die gezeigten Ergebnisse darauf hin, dass unterschiedliche und komplexe Regulationsmechanismen innerhalb des Phenylpropanoidstoffwechsels für die unterschiedlichen Gehalte verantwortlich sein könnten.

Der Gedanke, dass Phenylpropanoide Produkte eines unterdrückten Primärstoffwechsels sind und Wachstum bei zusätzlichem Stickstoff favorisiert wird (MUZIKA und PREGITZER 1992), kann mit den Ergebnissen in der Apfelrinde in Einklang gesehen werden, weil für Apfel bei den hohen Stickstoffstufen starkes Wachstum gezeigt werden konnte (RÜHMANN et al. 2002), welches mit einer Reduktion in den Gehalten an Phenylpropanoiden einherging (Tab. 17-19). Ebenfalls eine deutliche Abnahme in der Konzentration von Flavonoiden und kondensierten Tanninen mit steigender Stickstoffdüngung konnten KESKI-SAARI und JULKUNEN-TIITTO (2003) für die ersten echten Blätter von Birkensämlingen zeigen. Gleichzeitig variierte aber der Gehalt an phenolischen Säuren und hydrolysierbaren Tanninen. Die Variation im Gehalt an phenolischen Säuren kann mit der Variation im Gehalt an Hydroxyzimtsäurederivaten in der Apfelrinde durch unterschiedliche Stickstoffdüngung verglichen werden (Tab. 17-19).

In Beeren von *Vitis vinifera* wurde eine Gehaltsverringering von Resveratrol durch Stickstoffdüngung gezeigt (BAVARESCO et al. 2001). Ebenso konnten AWAD et al. (2000) eine

Abnahme von Flavonoiden in der Fruchtschale von Äpfeln mit steigender Stickstoffdüngung nachweisen. Bleibt man bei Untersuchungen an *Malus domestica*, so decken sich die abnehmenden Gehalte an Phenylpropanoiden in der Rinde mit Ergebnissen in Blättern mikrovermehrter Pflanzen, die unterschiedlich mit Stickstoff versorgt waren. Sowohl LUX-ENDRICH et al. (2000) als auch RÜHMANN et al. (2002) und RÜHMANN und TREUTTER (2003) zeigten bei erhöhtem Stickstoffangebot im Kulturmedium einen Rückgang im Gehalt an Phenylpropanoiden in den Blättern mikrovermehrter Pflanzen. Auch in den Blättern von Bäumen der Unterlage M9 konnte der Stickstoffeffekt mit einer deutlichen Abnahme im Phenylpropanoidgehalt *in-vivo* bestätigt werden (RÜHMANN et al. 2002).

4.3.7 Einfluss der Stickstoffdüngung und der Kohlendioxid-Gehaltsveränderungen auf die Pathogenabwehr

Veränderungen im Gehalt an Phenylpropanoiden durch Stickstoffdüngung

In Abb. 32 und 33 wurde der Zusammenhang zwischen Stickstoffdüngung und Nekrosenfläche dargestellt. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine höhere Versorgung mit Stickstoff mit einem stärkeren Schadbild in Verbindung gebracht werden kann. Dies bestätigt Ergebnisse von UTKHEKE und SMITH (1995). Gleichzeitig war eine deutliche Reduktion im Gehalt an Phenylpropanoiden durch die höhere Versorgung mit Stickstoff aufzeigbar (Abb. 42-47 und Tab. 17-19). Durch die Infektion kam es zum Teil zur Akkumulationen von Phenylpropanoiden, wobei der Effekt der Akkumulation bei den Bäumen der Stickstoffstufe N3 höher ausfiel (Abb. 42-47). Besonders die hohe Akkumulation nach Infektion bei der Unterlage M9 in N3 kann unter Berücksichtigung, dass M9 als toleranter Genotyp gilt, als wichtiger Resistenzfaktor betrachtet werden (Abb. 47).

Ein Effekt, der in den drei Genotypen 'Rewena', 'Golden Delicious' und M9 in der Stickstoffstufe N3 zu beobachten war, ist die im Verhältnis zu den anderen Substanzklassen überproportionale Akkumulation von Kaffeesäurederivaten speziell in der Umgebungszone nach Infektion (Abb. 43, 45, 47, 56).

Es ist vorstellbar, dass Kaffeesäurederivate direkt für die Pathogenabwehr benötigt werden, gleichzeitig aber auch für den weiteren Phenylpropanoidstoffwechsel von zentraler Bedeutung sind. Die Pflanze reagiert in N3 stärker als in N1, weil der Gehalt in N1 ohne Pathogen schon deutlich höher ist (Tab. 17-19), also speziell bei einer Aktivierung in N3 Nachholbedarf in der Synthese besteht.

Chlorogensäure, der wichtigste Vertreter der Kaffeesäurederivate in der Rinde, wird als Vorstufe von Flavanolen diskutiert (MICHALEK et al. 1999). Ein möglicher Zusammenhang zwischen Flavanolen und Kaffeesäurederivaten zeigte sich besonders in der Stickstoffstufe N3 bei der Unterlage M9 (Abb. 47). Einer erhöhten Biosynthese in der Umgebungszone an Kaffeesäurederivaten steht eine deutlich überproportionale Akkumulation an Flavanolen und Proanthocyanidinen in der Reaktionszone gegenüber. Eine mögliche schnelle Verlagerung der Kaffeesäurederivate aus der Umgebungszone zur Unterstützung der Biosynthese von für die Abwehr wichtigen Flavanolen in der Reaktionszone kann postuliert werden. Auch dieser Mechanismus ist als mögliche Ursache für das gute Abwehrverhalten von M9 zu diskutieren. Dass dieser Effekt nur in N3 zu beobachten war, könnte dadurch erklärt werden, dass in N1 schon das Maximum in die Abwehr investiert wurde und eine direkte Umstellung nicht mehr möglich war. Bei Tabak, der mit einer Überexpression von Phenylalaninammoniumlyase ausgestattet wurde, war eine Akkumulation von Chlorogensäure festzustellen (SHADLE et al. 2003). Gleichzeitig konnte eine stark verringerte Anfälligkeit gegen die Infektion des Pilzes *Cercospora nicotianae* nachgewiesen werden. Im Rückschluss wurde an Tabak auch eine Aktivierung der Phenylalaninammoniumlyase und anderer im Phenylpropanoidstoffwechsel nachgelagerter Enzyme wie die Kaffeesäure-*O*-Methyltransferase nach Vireninfection oder Behandlung mit pilzlichen Elicitoren gezeigt (JAECK et al. 1992; PELLEGRINI et al. 1993, 1994). Die Produktion von erhöhten Gehalten an Chlorogensäure wurde an Tabak auch von HOWLES et al. (1996) an Phenylalaninammoniumlyase überexprimierenden Tabakpflanzen gezeigt. Diese Ergebnisse legen zusammen mit den Ergebnissen in der Rinde des Apfels den Schluss nahe, dass speziell Kaffeesäurederivate wie die Chlorogensäure eine besondere Bedeutung nach Aktivierung des Phenylpropanoidstoffwechsels und Pathogeninfektion besitzen.

Der Effekt von luxuriöser Versorgung mit Stickstoff und der Ausbildung von größeren Nekrosenflächen, wie in Abb. 32 und 33 gezeigt, findet seine Entsprechungen bei RÜHMANN et al. (2002), wo deutlich stärkerer Befall mit *Venturia inaequalis* an M9 mit steigender Stickstoffdüngung gezeigt wurde. Auch der Effekt auf den Gehalt an Phenylpropanoiden ist eindrucksvoll belegt.

Veränderungen im Gehalt an Phenylpropanoiden durch Kohlendioxid-Behandlung

Die in Abb. 54 dargestellten Ergebnisse zeigen bei moderater Stickstoffversorgung N1, dass die erhöhte Kohlendioxidkonzentration nach Verwundung und Behandlung mit dem Kontrollmedium MK zu leichten Gehaltszunahmen bei den Flavanonen und acylierten Flavonoiden

und zu nahezu gleichen Gehalten an Flavonolen und der Summe ohne Phloridzin führte. Nach Infektion verstärkte sich der Effekt der Akkumulation in der Variante mit erhöhter Kohlendioxidkonzentration deutlich.

PRITCHARD et al. (1997) wiesen bei *Pinus palustris* in einem Versuch mit Kohlendioxid- und Stickstoffvarianten nach, dass sich der Gehalt an Phenolen sowohl bei 365 ppm als auch bei 720 ppm mit steigender Stickstoffdüngung verringerte. Ebenso zeigten sie, dass die Varianten mit 720 ppm Kohlendioxid unabhängig von der Stickstoffdüngung insgesamt einen höheren Gehalt an Phenolen enthielt als die mit 365 ppm versorgte Variante. Dies steht im Widerspruch zu den hier gezeigten Daten in der Apfelrinde, wo nach Behandlung über 2 Vegetationsperioden mit 700 ppm Kohlendioxid nur in der stark mit Stickstoff versorgten Variante ein geringerer Gehalt an Phenylpropanoiden nachgewiesen wurde. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass bei dem hier vorgelegenen Versuchssystem Bedingungen getroffen worden sind, bei welchen sich Ressourcenverschiebungen zwischen Stickstoff und Kohlenstoff unmittelbar im Sekundärmetabolismus niederschlugen.

Die Erhöhung im Gehalt an Phenylpropanoiden in der Stickstoffstufe N1 durch erhöhten Kohlendioxidgehalt deckt sich mit den Ergebnissen von LAVOLA et al. (2000), die eine Zunahme der Allokation von Kohlenstoff in Richtung des Sekundärmetabolismus durch Behandlung mit erhöhten Kohlendioxidkonzentrationen an Birkensämlingen zeigten.

LAVOLA und JULKUNEN-TIITTO (1994) unterstützten ebenfalls mit Ergebnissen an Birkensämlingen die Hypothese, dass die Kohlenstoffallokation in Richtung Sekundärmetabolismus verschoben wird, sobald ein Überschuss entweder an Kohlenstoff oder an Nährstoffen vorliegt. Von dieser Hypothese ausgehend lässt sich bei Anwendung auf die vorliegenden Ergebnisse in der Apfelrinde postulieren, dass in der Stickstoffstufe N1 bei der Behandlung mit 700 ppm Kohlendioxid ein Überschuss an Kohlenstoff, dass andererseits bei der Stickstoffstufe N3 mit 300 ppm Kohlendioxid ein Stickstoffüberangebot vorgelegen haben könnte. Beide Überschusssituationen würden die Allokation von Kohlenstoff in den Phenylpropanoidstoffwechsel erklären, was aber nur bei 700 ppm Kohlendioxid und limitierenden Stickstoffbedingungen nachgewiesen wurde.

4.3.8 Einordnung der Ergebnisse nach Veränderung der Ressourcen Stickstoff und Kohlendioxid in bestehende Wachstumshypothesen

Carbon-Nutrient-Balance-Hypothese (CNBH) (BRYANT et al. 1983)

Stickstoff

Die vorgestellten Ergebnisse zeigen eine Down-Regulation des Gehaltes an Phenylpropanoiden bei hoher Stickstoffversorgung. Phenylpropanoide werden als auf Kohlenstoff basierende Abwehrmetabolite betrachtet. Nach der CNBH führt eine geringe Verfügbarkeit an Nährstoffen zu verringerter Nährstoffkonzentration im Gewebe und geringerem Wachstum. Dies führt trotz einer geringeren Photosyntheserate zu einem Überangebot an Kohlenhydraten, was wiederum eine erhöhte Investition in auf Kohlenstoff basierende Abwehrmetabolite ermöglicht (BRYANT et al. 1983). Das bei erhöhter Stickstoffversorgung festgestellte stärkere Wachstum (RÜHMANN und TREUTTER 2003) benötigt mehr Kohlenstoffreserven, die wiederum nicht mehr für die Produktion von auf Kohlenstoff basierenden Abwehrmetaboliten zur Verfügung stehen. Genau dieser Effekt zeigte sich durch die erhöhte Stickstoffdüngung auf den Gehalt an Phenylpropanoiden in der Rinde des Apfels. Die Ergebnisse unterstützen damit die CNB-Hypothese von BRYANT et al. (1983).

Kohlendioxid

Nach Infektion verstärkte sich der Effekt der Akkumulation an Phenylpropanoiden in der Variante mit erhöhter Kohlendioxidkonzentration deutlich. Dies lässt sich im Sinne der „carbon-nutrient balance“-Hypothese (CNBH) (BRYANT et al. 1983) so interpretieren, dass die Ressource Kohlenstoff nicht für das Wachstum allein ausgeschöpft werden kann und es über eine Akkumulation von Kohlenhydraten zu einer Anreicherung von Phenylpropanoiden kommt. Die Akkumulationsfähigkeit wurde durch die erhöhte Kohlendioxidkonzentration verstärkt (Abb. 54). Im Gegensatz dazu lassen sich die Ergebnisse nach luxuriöser Stickstoffversorgung und erhöhter Kohlendioxidkonzentration als eine Förderung des Primärstoffwechsels deuten, die sich andererseits in einem deutlich geringeren Gehalt an Phenylpropanoiden niederschlug.

Growth-Differentiation-Balance-Hypothese (GDBH) (HERMS und MATTSON 1992)

Stickstoff

Die GDBH verabschiedet sich von der Betrachtung, dass allein die Ressourcenverfügbarkeit für die Erklärung unterschiedlicher Sekundärstoffgehalte und Abwehrpotentiale in den Geweben genügen. HERMS und MATTSON 1992 machen den Trade-off, also die Steuerung der Verteilung der Ressourcen, zwischen reinen Wachstumsprozessen und Differenzierungsprozessen für die unterschiedliche Stärke in der Abwehr verantwortlich. Dabei betrachten sie als Wachstumsprozesse vor allem die Prozesse, die mit Zellteilung und Zellvergrößerung zu tun haben. Differenzierungsprozesse sind chemische und morphologische Veränderungen, die zur Zellreife und Zellspezialisierung führen. Abwehrfähigkeit stellt einen klaren Differenzierungsprozess dar. Nach ihrer Hypothese werden bei luxuriöser Ressourcenverfügbarkeit Differenzierungsprozesse dem Wachstum untergeordnet. Andererseits stehen bei geringer Ressourcenverfügbarkeit Differenzierungsprozesse wie die Abwehr im Vordergrund.

Bei Apfel konnte der Zusammenhang zwischen erhöhter Wachstumsrate, verringertem Phenylpropanoidgehalt und erhöhter Anfälligkeit gegen *Venturia inaequalis* bereits belegt werden (RÜHMANN et al. 2002). Auch die Ergebnisse für die Interaktion zwischen dem Pathogen *Phytophthora cactorum* und dem Apfelbaum zeigen einen Zusammenhang zwischen der verstärkten Abwehrfähigkeit (Abb. 32, 33) und einem erhöhten Gehalt an Phenylpropanoiden unter einer moderaten Stickstoffversorgung (Tab. 17-19), die im Vergleich zu einer luxuriösen Stickstoffversorgung zu deutlich geringerem Wachstum führt.

Kohlendioxid

Im Rahmen der „growth differentiation balance“-Hypothese (GDBH) (HERMS und MATTSON 1992) sind die Pflanzen bei erhöhter Kohlendioxidkonzentration in einem Bereich anzusiedeln, in dem ein Ungleichgewicht zwischen Wachstumsmöglichkeiten und Ressourcenverfügbarkeit besteht. Durch den Kohlenstoffüberhang kann die Pflanze zur benötigten Abwehr Kohlenstoffreserven für die Abwehr des Pathogens einsetzen. Es kann also nach Infektion bei erhöhter Kohlendioxidkonzentration in der Stickstoffstufe N1 mehr Energie in Differenzierungsprozesse wie die Aktivierung der Abwehr investiert werden.

Bei Betrachtung der Ergebnisse nach hoher Stickstoffversorgung N3 (Abb. 54) wird erkenntlich, dass sich die Bedingungen umgekehrt haben. Durch die höhere Kohlendioxidverfügbarkeit kommt es zu einer Verringerung im Gehalt an Phenylpropanoiden. Dieser Widerspruch zur N1-Variante lässt sich aber auf Basis der GDBH (HERMS und MATTSON 1992)

dadurch erklären, dass bei der hohen Stickstoffversorgung die Ressource Kohlenstoff als limitierender Faktor zu betrachten ist. Dann nämlich käme die Veränderung von erhöhter Kohlendioxidkonzentration zu ambients Kohlendioxidkonzentration einer Ressourcenverknappung gleich, die wie oben angeführt zu vermehrten Differenzierungsprozessen führen könnte. Zu dieser Theorie muss aber angeführt werden, dass einer Verknappung der Ressource Kohlenstoff eine vermehrte Investition in kohlenstoffreiche Verbindungen des Phenylpropanoidmetabolismus widersprüchlich gegenübersteht. Dies kann als Indiz gewertet werden, dass die Regulation zwischen Wachstum und Differenzierungsprozessen unabhängig von der Ressource, die in den Mangel gerät, erfolgt. Man kann davon ausgehen, dass die Pflanze nur das Ergebnis, nämlich die Verschiebung des Gleichgewichts, feststellt, was wiederum unabhängig von der limitierenden Ressource zu einer Umstellung der internen Ressourcenverteilung zwischen Wachstums- und Differenzierungsprozessen führt.

Zentrale Hypothese des Sonderforschungsbereich 607 „Wachstum und Parasitenabwehr“

Die zentrale Hypothese des Sonderforschungsbereich 607 lautet:

„Unabhängig vom Typus einwirkender Faktorenszenarien reguliert die Pflanze ihre Stoffallokation auf eine Weise, dass Steigerung in Wachstum und Konkurrenzverhalten zu Einschränkungen der Stress-, insbesondere der Pathogen-Abwehr führt.“

Durch erhöhten Kohlendioxidgehalt kam es unter limitierenden Stickstoffbedingungen zu einer Anreicherung von Metaboliten des Sekundärstoffwechsels nach Infektion mit *Phytophthora cactorum*, was für eine verstärkte Abwehrfähigkeit spricht. Unter luxuriöser Stickstoffversorgung und erhöhtem Kohlendioxidgehalt konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden.

Durch die auf das Wachstum fördernd wirkende luxuriöse Stickstoffdüngung kann in Synthese mit den hier vorgelegten Ergebnissen folgende Aussage gemacht werden:

Die Steigerung des Wachstums durch erhöhte Stickstoffversorgung beim Apfel führt zu einer verringerten Stoffallokation in den Phenylpropanoidmetabolismus und damit zu Einschränkungen der Pathogenabwehr gegen *Phytophthora cactorum* in der Rinde des Apfels.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion zwischen dem Pathogen *Phytophthora cactorum* und seinem Wirt *Malus domestica* auf unterschiedlichen Ebenen untersucht. Neben dem Einfluss von Infektionen auf die Aktivität von Chitinasen und β -1,3-Glucanasen lag der Fokus besonders auf der Untersuchung von Veränderungen im Phenylpropanoidstoffwechsel, weil die Bedeutung von Phenylpropanoiden in der Abwehr gegen *Phytophthora cactorum* bisher ungeklärt war.

Für die Interaktion von Pathogenen der Gattung *Phytophthora* mit ihren Wirtspflanzen wird den Elicitinen eine besondere Bedeutung bei der Ausbildung systemischer Resistenz und für die Pathogenität zugeschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Kulturfiltrat von *Phytophthora cactorum* gereinigt und die Wirkung der elicitinenthaltenden Lösung auf den Phenylpropanoidstoffwechsel in der Rinde des Apfels untersucht. Dabei konnten Anreicherungen im Gehalt dreier Substanzen gezeigt werden, die auch nach Infektion akkumuliert wurden.

Bei den Untersuchungen der PR-Proteine nach Infektion der Rinde mit *Phytophthora cactorum* wurde keine Reaktion nachgewiesen.

Bei der Untersuchung des Phenylpropanoidgehalts in der Rinde von *Malus domestica* konnte ein Zusammenhang zwischen der Entfernung von der Stammbasis und dem Gehalt ermittelt werden. Die Abnahme im Gehalt an Phenylpropanoiden mit zunehmender Distanz von der Stammbasis korrelierte mit der Symptomausprägung nach künstlicher Infektion mit *Phytophthora cactorum*.

Nach Infektion wurden moderate Akkumulationen von Phenylpropanoiden in der Umgebung der Infektionen festgestellt, wobei besonders die Akkumulation von Phloretin als allgemeine Abwehrreaktion gezeigt wurde. Die Akkumulationen der unterschiedlichen Stoffklassen waren genotypabhängig und ließen keine einheitliche Interpretation durch Verschiebungen innerhalb des Phenylpropanoidstoffwechsels zu.

Besonderen Schwerpunkt bildete die Untersuchung der Reaktion des Phenylpropanoidstoffwechsels auf unterschiedliche Ressourcenverfügbarkeit der Bäume.

Der Einfluss der das Wachstum stark determinierenden Ressource Stickstoff wurde intensiv untersucht. Dabei konnten starke Verschiebungen im Gehalt an Phenylpropanoiden in Abhängigkeit der Stickstoffversorgung gezeigt werden. Moderate Stickstoffversorgung führte im Gegensatz zu luxuriöser Stickstoffversorgung zu deutlich höheren Gehalten an Phenyl-

propanoiden in der Rinde des Apfelbaumes. Damit zeigte sich die Bedeutung der Ressource Stickstoff für den Trade-off zwischen Primär- und Sekundärmetabolismus der Pflanze. Der Zusammenhang zwischen den durch unterschiedliche Stickstoffversorgung veränderten Gehalten an Phenylpropanoiden und der Pathogenabwehr von *Malus domestica* gegen *Phytophthora cactorum* konnte durch stärkeren Befall unter luxuriöser Versorgung mit der Ressource Stickstoff nachgewiesen werden.

Durch gesteigerte Kohlenstoffverfügbarkeit konnte unter moderater Stickstoffversorgung eine höhere Akkumulationsfähigkeit nach Infektion in der Rinde gezeigt werden. Luxuriöse Stickstoffversorgung führte bei gesteigerter Kohlenstoffverfügbarkeit zu einer Verringerung im Gehalt an Phenylpropanoiden bei den Kontrollen ohne Infektion. Nach Infektion konnte eine stärkere Akkumulation unter gesteigerter Kohlenstoffverfügbarkeit nachgewiesen werden.

Die Akkumulation von Phenylpropanoiden in der Rinde nach Infektion mit *Phytophthora cactorum* wurde erstmals nachgewiesen.

6 Literaturverzeichnis

- Aldwinckle H S, Polach F J, Molin W T, Pearson R C (1975):** Pathogenicity of *Phytophthora cactorum* isolates from New York apple trees and other sources. *Phytopathology* 65:989-994.
- Alexander B J R, Stewart A (2001):** Glasshouse screening for biological agents of *Phytophthora cactorum* on apple (*Malus domestica*). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, Vol.29:159-169.
- Alt D (1978):** Untersuchungen über Ursachen und Formen der Resistenz an Arten und Sorten des Apfels gegen *Phytophthora cactorum* (Leb. And Cohn) Schroet.. Dissertation. Heidelberg.
- Alt D (1983):** Untersuchungen über den Einfluß der Temperatur auf die Infektion von *Phytophthora cactorum* an der Apfelsorte 'Cox Orange' in Anhängigkeit von den Unterlagen M9 und M11. *Angewandte Botanik* 57:69-76.
- Alt D, Schmidle A (1980):** Untersuchungen über mögliche Resistenzfaktoren des Apfels gegen *Phytophthora cactorum* (Leb. Et Cohn) Schroet.; *Angew. Botanik* 54, 139-156.
- Anand A, Zhou T, Trick H, Gill Bikram S, Bockus W, Muthukrishnan S (2003):** Greenhouse and field testing of transgenic wheat plants stably expressing genes for thaumatin-like protein, chitinase and glucanase against *Fusarium graminearum*. *Journal of Experimental Botany* 54(384):1101-1111.
- Avila F, Mmbaga M, Howard E (2003):** Association of a PR-10 protein in the resistance of *Cornus florida* to powdery mildew. *Phytopathology* 93(Suppl. 6):5.
- Awad M A, De Jager A, Dekker M, Jongen W, Van der Krol A, Van der Plas I (2000):** Flavonoids and chlorogenic acid levels in apple skin as affected by mineral nutrition and crop load. In: *Polyphenols Communications 2000*. eds: Martens S, Treutter D, Forkmann G.
- Baillieul F, Fritig B, Kaufmann S (1996):** Occurrence among *Phytophthora* species of a glycoprotein eliciting a hypersensitive response in tobacco and its relationship with elicitors. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 9(3):214-216.

- Balsberg Pahlsson A-M (1992):** Influence of nitrogen fertilization on minerals, carbohydrates, amino acids and phenolic compounds in beech (*Fagus sylvatica* L.) leaves. *Tree Physiology* 10:93-100.
- Bavaresco L, Pezzutto S, Ragga A, Ferrari F, Trevisan M (2001):** Effect of nitrogen supply on trans-resveratrol concentration in berries of *Vitis vinifera* L. Cabernet Sauvignon. *Vitis* 40(4): 229-230.
- Becker J, Nagel S, Tenhaken R (2000):** Clonig, expression and characterization of protein elicitors from the soyabean pathogenic fungus *Phytophthora sojae*. *Journal of Phytopathologie* 148:161-167.
- Behr L (1961):** Untersuchungen über die Resistenz und Anfälligkeit mehrerer Apfelsorten gegenüber *Phytophthora cactorum*, dem Erreger der Kragenfäule. *Wissenschaftliche Zeitung der Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg* 10:1249-1253.
- Bezemer T M, Jones H T, Newington J E (2000):** Effects of carbon dioxide and nitrogen fertilisation on phenolic content in *Poa annua* L.. *Biochemical Systematics and Ecology* 28:839-846.
- Binet M N, Bourque S, Lebrun-Garcia A, Chiltz A, Pugin A (1998):** Comparison of the effects of cryptogein and oligogalacturonides on tobacco cells and evidence of different forms of desensitization induced by these elicitors. *Plant Science* 137:33-41.
- Blein J P, Milat M L, Ricci P (1991):** Responses of cultured tobacco cells to cryptogein, a proteinaceous elicitor from *Phytophthora cryptogea*. *Plant Physiology* 95:468-491.
- Bohm B A (1993):** The minor flavonoids. In: "The flavanoids: advances in research since 1986". eds. Harborne J B. Chapman and Hall, London, 1993.
- Bolay A (1992):** Les dépérissements des arbres fruitiers dus à des champignons du genre *Phytophthora* en Suisse romande et au Tessin. 1. Nature et importance des dégâts, espèces identifiées. *Revue suisse Vitic. Arboric. Hortic.* 24: 281-292.
- Bonnet P, Bourdon E, Ponchet M, Blein J P, Ricci P (1996):** Aquired resistance triggered by elicitors in tobacco and other plants. *European Journal of Plant Pathology* 102:181-192.

- Borecki Z, Millikan D F (1969):** A rapid method for determining the pathogenicity and factors associated with pathogenicity of *Phytophthora cactorum*. Phytopathology 59:247-248.
- Börner H (1961):** Experimentelle Untersuchungen über die Bodenmüdigkeit beim Apfel (*Pirus malus* L.). Beitr. Biol. Pflanzen 36:97-137.
- Bradford M M (1976)** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72:248-254.
- Brasseur A, Angenot L (1986):** Le melange diphenylborate d'aminoethanol-PEG 400. Journal of Chromatography 351:351-355.
- Braun H, Nienhaus F (1959):** Fortgeführte Untersuchungen über die Kragenfäule des Apfels (*Phytophthora cactorum*). Phytopathologische Zeitschrift 36:169-208.
- Brisset M-N, Cesbron S, Thomson S V, Paulin J-P (2000):** Acibenzolar-S-methyl induces the accumulation of defense-related enzymes in apple and protects from fire blight. European Journal of Plant Pathology 106:529-536.
- Brouillard R, Dangles O (1993):** Flavonoids and flower colour. In: "The flavanoids: advances in research since 1986". eds. Harborne J B. Chapman and Hall, London, 1993.
- Brown E A, Hendrix F F (1980):** Efficacy and in vitro activity of selected fungicides for control of *Phytophthora cactorum* collar rot of apple. Plant Disease 64:310-312.
- Bruce R G, Ebert D, Gayler K R (1996):** Elicitins: proteins in search of a role? Australasian Plant Pathology 25:148-157.
- Brummer M, Arend M, Fromm J, Schlenzig A, Oßwald W F (2002):** Ultrastrukturelle Veränderungen und immunocytochemische Lokalisation des Elicitins Quercinin in *Quercus robur* L. Wurzeln, infiziert mit *Phytophthora quercina*. Physiological and Molecular Plant Pathology 61:109-120.
- Bryant J P, Chapin F S, Klein D R (1983):** Carbon/nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory. Oikos 40:357-368.

- Capasso R, Cristinzio G, Evidente A, Visca C, Ferranti P, Del Vecchio Blanco, Parente A (1999):** Elicitin 172 from an isolate of *Phytophthora nicotianae* pathogenic to tomato. *Phytochemistry* 50:703-709.
- Cavalier-Smith (1998):** A revised six-kingdom system of life. *Biological Reviews* 73:203-266.
- Challice J S, Williams A H (1970):** A comparative biochemical study of phenolase specificity in *Malus*, *Pyrus* and other plants. *Phytochemistry* 9: 1261-1269.
- Churngchow N, Rattarasarn M (2000):** The elicitin secreted by *Phytophthora palmivora*, a rubber tree pathogen. *Phytochemistry* 54:33-38.
- Coley P D, Bryant J P, Chapin F S (1985):** Resource availability and plant antiherbivore defense. *Science* 230(4728):895-899.
- Coutts M P (1977):** The formation of dry zones in the sapwood of conifers. II: The role of living cells in the release of water. *European Journal of Forest Pathology* 7:6-12.
- Coventry H S, Dubery I A (2001):** Lipopolysaccharides from *Burkholderia cepacia* contribute to an enhanced defensive capacity and the induction of pathogenesis-related proteins in *Nicotiana tabacum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 58(4): 149-158.
- Dick M W (1990):** Chapter 33. In: *Handbook of Protocista*. Eds Margulis et al.. <http://www.ucmp.berkeley.edu/chromista/oomycoata.html>.(22.01.2004)
- Dorey S, Kopp M, Geoffroy P, Fritig B, Kauffmann S (1999):** Hydrogen peroxide from the oxidative burst is neither necessary nor sufficient for hypersensitive cell death induction, phenylalanine ammonia lyase stimulation, salicylic acid accumulation, or scopoletin consumption in cultured tobacco cells treated with elicitin. *Plant Physiology* 121:163-171.
- Dubery I A, Meyer D, Bothma C (1994):** Purification and characterization of catorein, a phytotoxin secreted by *Phytophthora cactorum*. *Phytochemistry* 35(2):307-312.
- Egea C, Ahmed A S, Candela M, Candela M E (2001):** Elicitation of peroxidase activity and lignin biosynthesis in pepper suspension cells by *Phytophthora capsici*. *Journal of Plant Physiology* 158(2):151-158.

- Elstner E F, Oßwald W, Schneider I (1996):** Phytopathologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Elstner E F, Oßwald W, Volpert R, Schempp H (1994):** Phenolic antioxidants. *Acta Horticulturae* – Natural phenols in plant resistance 381:304-335.
- Erwin D C, Ribeiro O K (1996):** *Phytophthora* Diseases Worldwide. The American Phytopathological Society, APS Press. St. Paul, Minnesota (1996).
- Fagoaga C, Rodrigo I, Conejero V, Hinarejos C, Tuset J J, Arnau J, Pina J A, Navarro L, Pena L (2001):** Increased tolerance to *Phytophthora citriphora* in transgenic orange plants constitutively expressing a tomato pathogenesis related protein PR-5. *Molecular Breeding* 7: 175-185.
- Fleischmann F (2000):** Untersuchungen zur Resistenz von Kartoffeln gegen *Phytophthora infestans* mit Hilfe biochemischer Parameter. Dissertation am Lehrstuhl für Phytopathologie der TUM. Hieronymus Buchreproduktions GmbH, München.
- Forkmann G, Heller W (1999):** Biosynthesis of flavonoids. In: *Comprehensive Natural Products Chemistry*, Vol. 1. Hrsg.: Barton D, Nakanishi K. Elsevier Verlag, Amsterdam.
- Garcia P M D, Egea C, Candela M E (1998):** Defence response of pepper (*Capsicum annuum*) suspension cells to *Phytophthora capsici*. *Physiologia Plantarum* 103(4): 527-533.
- Groten K, Barz W (2000):** Elicitor-induced defence reactions in cell suspension cultures of soybean cultivars. *Journal of Bioscience* 55(9-10):718-730.
- Grunwald I, Ruorecht I, Schuster G, Kloppstech K (2003):** Identification of glutathione fluid proteases: The presence of pathogenesis related proteins in noninfected barley plants. *Physiologia Plantarum* 119(2):192-202.
- Gupta V K, Singh K (1979):** Factors affecting the development of the collar rot (*Phytophthora cactorum*) of apple. *Gartenbauwissenschaft* 44:29-32.
- Hakulinen J (1998):** Nitrogen-induced reduction in leaf phenolic level is not accompanied by increased rust frequency in a compatible willow (*Salix myrsinifolia*)-*Melampsora* rust interaction. *Physiologia Plantarum* 102:101-110.

- Harborne J B (1993):** The flavanoids: advances in research since 1986. Chapman and Hall, London.
- Harris D C (1986):** Methods for preparing, estimating and diluting suspensions of *Phytophthora cactorum* zoospores. Transactions of the British Mycological Society 86:482-486
- Harris D C (1989)** The significance of apple tree tissues for regeneration of *Phytophthora cactorum* in apple orchards. Journal of horticultural Science 64(4). 389-393
- Harris D C (1991)** The *phytophthora* disease of apple. Review article. Journal of Horticultural Science 66(5):513-544.
- Heiser I, Fromm J, Giefing M, Koehl J, Jung T, Oßwald W (1999):** Investigations on the action of *Phytophthora quercina*, *P.citricola* and *P.gonapodyides* toxins on tobacco plants. Plant Physiol. Biochem. 37(1):73-81.
- Hermes D A, Mattson W J (1992):** The dilemma of plants: to grow or defend. Quarterly Review of Biology 67:283-335.
- Herrmann K (1989):** Occurrence and content of hydroxycinnamic acid and hydroxybenzoic acid compounds in foods. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 28:315-347.
- Hoffmann-Sommergruber K (2002):** Pathogenesis related (PR) proteins identified as allergens. Biochemical Society Transactions 30(6):930-935.
- Howles P A, Sewalt V J H, Paiva N L, Elkind Y, Bate N J, Lamb C, Dixon R A (1996):** Overexpression of L-phenylalanine ammonia-lyase in transgenic tobacco plants reveals control points for flux into phenylpropanoid biosynthesis. Plant Physiology 112:1617-1624.
- Huet J C, Le Caer J P, Nepoulous C, Pernollet J C (1995):** The relationships between the toxicity and the primary and secondary structures of elicitinlike protein elicitors secreted by the phytopathogenic fungus *Pythium vexans*. Molecular Plant Microbe Interactions 8(2):302-310.
- Huet J C, Manison M, Pernollet J C (1993):** Amino acid sequence of the alpha-elicitin secreted by *Phytophthora cactorum*. Phytochemistry 34(5):1261-1264.

- Huet J C, Salle-Tourne M, Pernellet J C (1994):** Amino acid sequence and toxicity of the alpha-elicitin secreted with ubiquitin by *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 7(2):302-304.
- Hunter L D (1975):** Phloridzin and apple scab. *Phytochemistry* 14:1519-1522.
- Hunter M D, Hull L A (1993):** Variation in concentrations of phloridzin and phloretin in apple foliage. *Phytochemistry* 34(5):1251-1254.
- Jaeck E, Dumas B, Geoffroy P, Favet N, Inze D, Van Montagu M, Fritig B, Legrand M (1992):** Regulation of enzymes involved in lignin biosynthesis induction of a methyltransferase MRNAS during the hypersensitive reaction of tobacco to tobacco mosaic virus. *Molecular Plant Microbe Interactions* 5(4):294-300.
- Jeffers S N, Aldwinckle H S (1986):** Seasonal variation in extent of colonization of two apple rootstocks by five species of *Phytophthora*. *Plant Disease* 70(10):941-945.
- Jeffers S N, Aldwinckle H S (1988):** *Phytophthora* crown rot of apple trees: source of *Phytophthora cactorum* and *P. cambivora* as primary inoculum. *Phytopathology* 78:328-335.
- Jeffers S N, Aldwinckle H S, Burr T J, Arneson P A (1982):** *Phytophthora* and *Phytium* species associated with crown rot in New York apple orchards. *Phytopathology* 72:533-538.
- Jeffers S N, Wilcox W F (1990):** *Phytophthora* crown, collar, and root rots. 43-45 in: *Compendium of apple and pear diseases*. Eds: Jones A L, Aldwinckle H S. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota.
- Jeun Y C (2000):** Immunolocalisation of PR-protein P14 in leaves of tomato plants exhibiting systemic acquired resistance against *Phytophthora infestans* induced by pretreatment with 3-aminobutyric acid and preinoculation with Tobacco necrosis virus. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 107(4):352-367.
- Jeun Y C, Buchenauer H (2001):** Infection structures and localisation of the pathogenesis-related protein AP24 in leaves of tomato plants exhibiting systemic acquired resistance against *Phytophthora infestans* after pre-treatment with 3-aminobutyric acid or tobacco necrotic virus. *Journal of Phytopathology* 149(3-4):141-153.

- Jones A L, Aldwinckle H S (1990)** Compendium of apple and pear diseases. APS Press, The American Phytopathological Society, Minnesota USA
- Jones C G, Hartley S E (1999):** A protein competition model of phenolic allocation. *Oikos* 86:27-44.
- Julis A J, Clayton C N, Sutton T B (1978):** Detection and distribution of *Phytophthora cactorum* and *P. cambivora* on apple rootstocks. *Plant Disease Reporter* 62:516-520.
- Julkunen-Tiitto R, Tahvanainen J, Silvola J (1993):** Increased CO₂ and nutrient status changes affect phytomass and the production of plant defensive secondary chemicals in *Salix myrsinifolia* (Salisb.). *Oecologia* 95:495-498.
- Keller H, Blein J, Bonnet P, Ricci P (1996):** Physiological and molecular characteristics of elicitor-induced systemic acquired resistance in tobacco. *Plant Physiology* 204:480-489.
- Kelly S P, Bernard K (2002):** A beta 1-3 glucan, specific in marine algae, stimulates plant defence reactions and induces resistance against certain pathogens. *Phytopathology* 92 (Suppl. 6):108.
- Keski-Saari S, Julkunen-Tiitto R (2003):** Resource allocation in different parts of juvenile mountain birch plants: effect of nitrogen supply on seedling phenolics and growth. *Physiologia Plantarum* 118:114-126.
- Kirk P M, Cannon P F, David J C, Stalpers J A (eds.) (2001):** Dictionary of the fungi, 9th edition. CAB International. Wallingford.
- Koehl J (2002):** Aufreinigung und Charakterisierung der Elicitorine von *Phytophthora quercina*. Dissertation Lehrstuhl für Phytopathologie, TU-München, Herbert Utz Verlag, ISBN 3-8316-0171-2.
- Koehl J, Obwald W, Kohn H, Elstner E F, Heiser I (2003):** Different responses of two tobacco cultivars and their cell suspension cultures to quercinin, a novel elicitor from *Phytophthora quercina*. *Plant Physiology and Biochemistry* 41:261-269.
- Körber H (1980):** Überdauerung einiger *Phytophthora*-Arten im Boden. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 87:227-235.
- Kröber H, Karnatz A (1979)** Anfälligkeit von Apfelsorten gegenüber *Phytophthora cactorum* und ihre Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren. *Journal of Plant Diseases and Protection* 86(1):1-11

- Kumar S, Rzhetsky A (1996):** Evolutionary relationships of eukaryotic kingdoms. *J. Mol. Evol.* 42(2):183-193.
- Lardschneider E, Kelderer M, Casera C (2002):** Die Kragenfäule. *Obstbau Weinbau Fachmagazin des Beratungsrings (Südtirol)* 39(3):81-82.
- Latorre B A, Rioja M E, Wilcox WF (2001):** *Phytophthora* species associated with crown and root rot of apple in Chile. 85(6):603-606.
- Lavola A, Julkunen-Tiitto R (1994):** The effect of elevated carbon dioxide fertilization on primary and secondary metabolites in birch, *Betula pendula* (Roth). *Oecologia* 99:315-321.
- Lavola A, Julkunen-Tiitto R, de la Rosa T M, Lehto T, Aphalo P J (2000):** Allocation of carbon to growth and secondary metabolites in birch seedlings under UV-B radiation and CO₂ exposure. *Physiologia Plantarum* 109:260-267.
- Lawler I R, Foley W J, Woodrow I E, Cork S J (1997):** The effects of elevated CO₂ atmospheres on the nutritional quality of *Eucalyptus* foliage and its interaction with soil nutrient and light availability. *Oecologia* 109:59-68.
- Lever M (1972):** A new reaction for colometric determination of carbohydrates. *Analytical Biochemistry* 47:273-279.
- Lockard R G, Schneider G W (1981):** Phenols and the dwarfing mechanism in apple rootstocks. *Acta Horticultrae* 120:107-111.
- Lockard R G, Schneider G W, Kemp T R (1982):** Phenolic compounds in two size-controlling apple rootstocks. *Journal of the American Society for Horticultural Sciences* 107 (2): 183-186.
- Lux-Endrich A, Treutter D, Feucht W (2000):** Influence of nutrients and carbohydrate supply on the phenol composition of apple shoot cultures. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 60:15-21.
- MacCracken A R (1985):** The isolation of *Phytophthora* species from apple orchard soils. *Record of Agricultural Research* 31-36.
- Marbry T J, Markham K R, Thomas M B (1970):** The systematic identification of flavonoids. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

- Margna U (1977):** Control at the level of substrate supply – an alternative in the regulation of phenylpropamoid accumulation in plant cells. *Phytochemistry* 16:419-426.
- Martin G C, Williams M W (1967):** Comparison of some biochemical constituents of EM IX and XVI bark. *Hort Science* 2(4):154.
- Matheron M E, Young D J, Matejka J C (1988):** *Phytophthora* root and crown rot of apple trees in Arizona. *Plant Disease* 72:481-484.
- Matyssek R, Schnyder H, Elstner E F, Munch J C, Pretzsch H, Sandermann H (2002):** Growth and parasite defence in plants: the balance between resource sequestration and retention. *Plant Biology* 4:133-136.
- Mayr U (1995)** Einfluß des Phenolstoffwechsels beim Apfel (*Malus domestica*) auf das Resistenzpotential gegen Apfelschorf (*Venturia inaequalis*). Dissertation am Lehrstuhl für Obstbau, Technische Universität München.
- Mayr U, Michalek S, Treutter D, Feucht W (1997):** Phenolic compounds of apple and their relationship to scab resistance. *Journal of Phytopathology* 145:69-75.
- Mayr U, Treutter D, Feucht W (1996):** Phenolic compounds of apple fruit. *Erwerbsobstbau* 38:8-12.
- 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(5):1151-1155.
- McIntosh D L (1975):** Proceedings of the 1974 APDW Workshop on crown rot of apple trees. *Canadian Plant Disease Survey* 55:109-116
- McIntosh D L, Macswan I C (1966):** The occurrence of collar rot caused by *Phytophthora cactorum* in a planting of apple trees aged 1 to 7 years. *Plant Disease Reporter* 50:267-270.
- Mezzetti B, Capasso R, Evidente A, Hammerschlag F A, Zimmerman R H, Cristinzio G und Rosati P (1994):** Interaction of partially purified phytotoxins from *Phytophthora cactorum* on apple plasma membrane. *Journal of Phytopathology* 142:219-226.
- Mezzetti B, Zimmerman R H, Mischke C, Rosati P und Hammerschlag F A (1992):** Merocyanine 540 as an optical probe to monitor the effects of culture filtrates of *Phytophthora cactorum* on apple cell membranes. *Plant Science* 83:163-167

- Michalek S (1997):** Stimulierung der Phenolbiosynthese des Apfels (*Malus domestica*) im Hinblick auf Induzierte Resistenz. Dissertation am Lehrstuhl für Obstbau, Technische Universität München. Shaker Verlag.
- Michelek S, Mayr U, Treutter D, Lux-Endrich A, Gutmann M, Feucht W, Geibel M (1999):** Role of flavan-3-ols in resistance of apple trees to *Venturia inaequalis*. Acta Horticulturae 484:535-539.
- Mikes V, Milat M-L, Ponchet M, Ricci P, Blein J-P (1997):** The fungal elicitor cryptogein is a sterol carrier protein. Federation of European Biochemical societies Letters 416:190-192
- Milat M L, Ricci P, Bonnet P, Blein J P (1991):** Capsidiol and ethylene production by tobacco cells in response to cryptogein, an elicitor from *Phytophthora cryptogea*. Phytochemistry 30(7):2171-2173.
- Mornau M, Thurnbauer F, Treutter D (2002):** Baumausfälle an *Malus domestica* durch *Phytophthora cactorum* im Herbst 2001. Mitteilungen der BBA; Heft 390, Berlin 2002, Seite 430.
- Muzika R M, Pregitzer K S (1992):** Effect cot nitrogen fertilization on leaf phenolic production of grand fir seedlings. Trees 6:241-244.
- Muzika R M, Pregitzer K S, Hanover J W (1989):** Changes in terpene production following nitrogen fertilization of grand fir (*Abies grandis* (Dougl) Lindl.) seedlings. Oecologia 80:485-489.
- Nachit M, Feucht W (1976)** Die Eignung von phenolischen Säuren und Aminosäuren als Selektionskriterien für die Wüchsigkeit von *Malus*-Unterlagen. Mitteilungen Rebe und Wein, Obstbau und Fruchteverwertung 26: 199-204.
- Narasimhan K, Thulaseedharan A, Kothandaraman R (2000):** Detection of pathogenesis related proteins in *Hevea brasiliensis* infected by *Phytophthora meadii*. Indian Journal of Natural Rubber Research 13(1-2):30-37.
- Nespoulous C, Huet J C, Pernollet J C (1992):** Structure-function relationships of α and β elicitors, signal proteins involved in the plant-*Phytophthora* interaction. Plant 186:551-557.

- Noversoske R L, Kuc J, Williams E B (1964a):** Oxidation of phloridzin and phloretin related to resistance of *Malus* to *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 54:92-97.
- Noversoske R L, Williams E B, Kuc J (1964b):** β -Glycosidase and phenolase in apple leaves and their possible relation to resistance to *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 54:98-103.
- Okey E N, Duncan E J, Sirju-Charran G, Sreenvيسان T N (1997):** Zoospore germination and growth of *Phytophthora palmivora* in stem extracts as criteria for assessing cacao resistance to canker. *Mycological Research* 101(6):683-686.
- Panabières F, Ponchet M, Allasia V, Cardin L, Ricci P (1997):** Characterisation of border species among *Phythiaceae*: several *Pythium* isolates produce elicitors, typical from *Phytophthora* ssp.. *Mycological Research* 101:1459-1468.
- Pelligrini L, Geoffroy R, Fritig B, Legrand M (1993):** Molecular cloning and expression of a new class of ortho-diphenol-O-methyltransferases induced in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaves by infection or elicitor treatment. *Plant Physiology* 103:509-517.
- Pilch M, Rudnicki R M (1979)** Studies of the toxin of *Phytophthora cactorum* pathogenic to apple trees. *Phytopathologische Zeitschrift* 94:270-278
- Pleßl M (2002):** Einfluss erhöhter Ozon- und CO₂-Konzentrationen auf das Resistenzverhalten von Kartoffel gegenüber *Phytophthora infestans* und von Gerste gegenüber *Drechslera teres*. Dissertation am Lehrstuhl für Phytopathologie, Technische Universität München. Herbert Utz Verlag.
- Ponchet M, Pababières F, Milat M L, Mikes V, Montillet J L, Suty L, Trinantaphylides C, Tirilly Y, Blein J P (1999):** Are elicitors cryptograms in plant-Oomycete communications? *CMLS Cellular and Molecular Life Sciences* 56:1020-1047.
- Prachi, Sharma Tilak R, Singh Brij M (2002):** Salicylic acid induced insensitivity to culture filtrate of *Fusarium oxysporum* f.sp. *Zingiberi* in the calli of *Zingiber officinale* Roscoe. *European Journal of Plant Pathology* 108(1):31-39.
- Priestly C A (1960):** Seasonal changes in the carbohydrate resources of some six-year-old trees. *East Malling Research Station Annual Reports for 1959*:70-77.

- Pritchard S, Peterson C, Runion B G, Prior S, Rogers H (1997):** Atmospheric CO₂ concentration, N availability, and water status affect patterns of ergastic substance deposition in longleaf pine (*Pinus palustris* Mill.) foliage. *Trees* 11:494-503.
- Raa J, Overeem (1968):** Transformation reactions of phloridzin in the presence of apple leaf enzymes. *Phytochemistry* 7:721-731.
- Ramamoorthy V, Raguchander T, Samiyappan R (2002):** Induction of defense related proteins in tomato roots treated with *Pseudomonas fluorescens* PF1 and *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. *Plant and Soil* 239(1):55-68.
- Rayner A D M, Boddy L (1988):** Fungal decomposition of wood. Chichester, UK: John Willey and Sons.
- Reddy M K, Mahadevan A (1967):** Effect of phenolic compounds on cellulase. *Indian Phytopathology* 20:265-267.
- Reichardt P B, Chapin F S, Bryant J P, Mattes B R, Clausen T P (1991):** Carbon/nutrient balance as a predictor of plant defense in alaskan balsam poplar: Potential importance of metabolite turnover. *Oecologia* 88:401-406.
- Rep M, Dekker H L, Vossen J H, de Boer A D, Houtermann P M, Speijer D, Back J W, de Koster C G, Cornelissen B J C (2002):** Mass spectrometric identification of isoforms of PR proteins in xylem sap of fungus-infected tomato. *Plant Physiology* 130 (2):904-917.
- Ricci P, Bonnet P, Huet J C, Sallantin M, Beauvais-Cante F, Brunetaeau M, Billard V, Michel G, Pernollet J C (1989):** Structure and activity of proteins from athogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and aquired resistance to tobacco. *European Journal of Biochemistry* 183:555-563.
- Ricci P, Trentin F, Bonnet P, Venard P (1992):** Differential production of parasiticein, an elicitor of necrosis and resistance in tobacco, by isolates of *Phytophthora parasitica*. *Plant Pathology* 41:298-307.
- Römmelt S (2002):** Beteiligung phenolischer Verbindungen an der induzierten Resistenz von Apfel (*Malus domestica*) gegen Feuerbrand (*Erwinia amylovora*). Dissertation am Lehrstuhl für Obstbau, Technische Universität München. Shaker Verlag.

- Römmelt S, Zimmermann N, Rademacher W, Treutter D (2003):** Formation of novel flavonoids in apple (*Malus x domestica*) treated with the 2-oxoglutarat-dependent dioxygenase inhibitor prohexadione-Ca. *Phytochemistry* 64:709-716.
- Roth U, Friebe A, Schnabl H (2000):** Resistance induction in plants by brassinosteroid-containing extract of *Jychnis viscaria* L.. *Zeitschrift für Naturforschung* 55(7-8):552-559.
- Ruess F (2004):** `Topaz` und `Rubinola` - optimale Unterlagen. *Obstbau* 2:58-62.
- Rühmann S, Leser C, Bannert M, Treutter D (2002):** Relationship between growth, secondary metabolism, and resistance of apple. *Plant Biology* 4:137-143
- Rühmann S, Treutter D (2003):** Effect of N-Nutrition in apple on the response of its secondary metabolism to prohexadione-Ca treatment. *European Journal of Horticulture Science* 68(3):152-159.
- Salunkhe D K, Chavan J K, Kadam S S (1990):** Dietary tannins: consequences and remedies. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida. Seiten 131 ff.
- Sarapuu L (1964):** Phloridzin as a B-inhibitor and the seasonal dynamics of its metabolic products in apple shoots. *Soviet Plant Physiology* 11:520-525.
- Sasabe M, Takeuchi K, Kamoun S, Ichinose Y, Govers F, Toyoda K, Shiraishi T, Yamada T (2000):** Independent pathways leading to apoptotic cell death, oxidative burst and defense gene expression in response to elicitor in tobacco cell suspension culture. *European journal of Biochemistry* 267(16):5005-5013.
- Schnitzler J P, Jungblut T P, Heller W, Köfferlein M, Hutzler P, Heinzmann U, Schmelzer E, Ernst D, Langebartels C, Sandermann H (1996):** Tissue localisation of UV-B screening pigments and of chalcone synthase mRNA in needles of scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings. *New Phytologist* 132:247-258.
- Schubert R, Bahnweg G, Nechwatal J, Jung T, Cooke D E L, Duncan J M, Müller-Starck G, Langebartels C, Sandermann H, Oßwald W (1999):** Detection and quantification of *Phytophthora* species which are associated with root-rot diseases in European deciduous forests by species-specific polymerase chain reaction. *European Journal of Forest Pathology* 29:169-188.

- Schwinn F J (1965)** Untersuchungen zum Wirt-Parasit-Verhältnis bei Kragenfäule des Apfelbaumes (*Phytophthora cactorum*) und zu ihrer Bekämpfung. I. Versuche zur Frage der Wundinfektion und zur Grundlage der Sortenresistenz. Phytopathologische Zeitschrift 54:1-30
- Sewell G W F, Wilson J F (1973)** *Phytophthora* collar rot of apple: seasonal effects on infection and disease development. Ann. Appl. Biol. 74:149-158
- Sewell G W F, Wilson J F, Blake C M (1976):** *Phytophthora* crown rot of apple (*Phytophthora cactorum*). Report of the East Malling Research Station for 1973:118.
- Shadle G L, Wesley V W, Koth K L, Chen F, Lamb C, Dixon R A (2003):** Phenylpropanoid compounds and disease resistance in transgenic tobacco with altered expression of L-phenylalanine ammonia-lyase. Phytochemistry 64:153-161.
- Shim J O, Lee M W (1994)** Growth rate and colony morphology of progenies of zoospores and oospores of *Phytophthora cactorum* causing *Phytophthora* rots in apple trees. The Korean Journal of Mycology 22(4):281-285
- Soman K V, Midoro-Horiuti T, Ferreon J C, Goldblum R M, Brooks E G, Kurosky A, Braun W, Schein C H (2000):** Homology modeling and characterization of IgE binding epitopes of mountain cedar allergen Jun a 3. Biophysical Journal 79:1601-1609.
- Srivastava A K, Singh T, Jana T K, Arora D K (2001):** Induced resistance and control of charcoal rot in *Cicer arietinum* (chickpea) by *Pseudomonas fluorescens*. Canadian Journal of Botany 79(7):787-795.
- Suzui T, Hoshino Y (1979):** Collar rot of apple caused by *Phytophthora cambivora* (Petri) Buism. Ann. Phytopath. Soc. Japan 45:344-352.
- Ten Houten JG (1958):** Resistance trials against collar rot of apples caused by *Phytophthora cactorum*. Tijdschrift over Plantenziekten 65:422-431.
- Tevini M (1993):** UV-B radiation and ozone depletion. Effects on humans, animals, plants, microorganisms, and materials. Boca Raton, Florida, Seite:125.
- Tidball C J (1990):** *Phytophthora* root and stem rot of apple rootstocks from stool beds. Plant Disease 74(2):141-146.

- Treutter D (1989):** Chemical reaction detection of catechins and proanthocyanidins with 4-dimethylaminocinnamoaldehyd. *Journal of Chromatography* 467:185-193.
- Treutter D (1991):** Bedeutung von Catechinen und Proanthocyanidinen für Obstanbauer und Verbraucher: Eine Studie über die Analytik, das Vorkommen und die pflanzenphysiologische, phytopathologische und ernährungsphysiologische Bedeutung der kondensierten Tannine und ihrer monomeren Vorstufen. Habilitationsschrift. Technische Universität München.
- Treutter D (2001):** Biosynthesis of phenolic compounds and its regulation in apple. *Plant Growth Regulation* 34:71-89.
- Treutter D, Feucht W (1991):** Accumulation of phenolic compounds above the graft union of cherry trees. *Gartenbauwissenschaft* 56(3):134-137.
- Tsao P H, Guy S D (1977):** Inhibition of *Mortierella* and *Pythium* in a *Phytophthora* isolation medium containing hymexazol. *Phytopathology* 67:796-801.
- Utkhede R S (1986):** Biology and control of apple crown rot caused by *Phytophthora cactorum*: a review. *Phytoprotection* 67:1-13.
- Utkhede R S und Smith E M (1995):** Effect of nitrogen form and application method on incidence and severity of *Phytophthora* crown and root rot of apple trees. *European Journal of plant pathology* 101(3):283-289.
- Van Loon L C, Van Kammen A (1970):** Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var 'Samsun' and 'Samsun NN'. Changes in protein constitution after infection with TMV. *Virology* 40:199-211.
- Van Loon L C, Van Strien E A (1999):** The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55:85-97.
- Venisse J S, Malnoy M, Zaize M, Paulin J P, Brisset M N (2002):** Modulation of defense responses of *Malus* spp. During compatible and incompatible interactions with *Erwinia amylovora*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15(12) 1204-1212.
- Waterman P G, Mole S (1989):** Extrinsic factors influencing production of secondary metabolites in plants. In: Berndy E A (ed.): *Insect-Plant Interactions*. CRC-Press, Boca Raton, Florida.

- Williams A H (1960):** The distribution of phenolic compounds in apple and pear trees. In: Phenolics in plants in health and disease. ed: Pridham J B. Pergamon Press – Oxford – London – New York – Paris. 1960.
- Williams A H (1966):** Dihydrochalcones. In: Comparative Phytochemistry. Ed: Swain T. Academic Press, London, New York.
- Williams A H (1982):** Chemical evidence from the flavonoids relevant to the classification of *Malus* species. Botanical Journal of the Linnean Society 84:31-39.
- Wink M (1997):** Compartmentation of secondary metabolites and xenobiotics in plant vacuoles. Adv. Bot. Res. 25:141-169.
- Wirth S J, Wolf G A (1990):** Dye-labelled substrates for the assay and detection of chitinase and lysozyme activity. Journal for Microbiological Methods 12:197-205.
- Xie D-Y, Sharma S B, Dixon R A (2004):** Anthocyanidin reductase from *Medicago truncatula* and *Arabidopsis thaliana*. Arch. Biochem. Biophys. 422:91-102.
- Ziadi S, Poupard P, Brisset M-N, Paulin J-P, Simoneau P (2001):** Characterization in apple leaves of two subclasses of PR-10 transcripts inducible by acibenzolar-S-methyl, a functional analogue of salicylic acid. Physiological and Molecular Plant Pathology 59:33-43.

7 Danksagung

Dank gilt allen, die mich bei der Arbeit an dieser Dissertation unterstützt und begleitet haben. Besonderer Dank geht an meinen Doktorvater Prof. Treutter. Durch viele Diskussionen hat er mich immer wieder angestoßen „quer“ zu denken und doch noch einmal tiefer zu „graben“. Ein ganz herzlicher Dank geht an Dich, Dieter, für die Offenheit und Menschlichkeit, mit der Du dazu beigetragen hast, dass es trotz diverser Rückschläge immer wieder Spaß gemacht hat, weiterzuforschen.

Und für diesen Spaß am Forschen waren vor allem auch die Mitarbeiter und Freunde hier an unserem Fachgebiet verantwortlich.

Besonders herzlicher Dank geht an Dich, liebe Silke Peterek, für die gemeinsam durchgestandene Wegstrecke, für die angenehme Zusammenarbeit in „unserem Büro“ und viele Diskussionen, die immer wieder Entwicklungen angestoßen haben. Danke!

Ein herzliches Danke sage ich Dir, Marlene Kramler, für all das Wissen über Berta, Waldi und Co., das Du an mich weitergegeben hast und all die Arbeit, die Du mit mir und meinen Bäumchen hattest.

Liebe Rita Wimmer und liebe Maren Olbrich, Euch beiden danke ich herzlich für die Unterstützung bei der Probenaufarbeitung. So manche Analyse wäre ohne Eure Hilfe nicht möglich gewesen.

Dir, lieber Thorsten Strissel, danke ich für viele fachliche Diskussionen, für Dein offenes Ohr und Deine Unterstützung beim Durchsehen des Manuskripts dieser Arbeit.

An Euch alle, die ihr Mitarbeiter des Fachgebiets Obstbau seid, geht mein herzlichster Dank für die Offenheit und Unterstützung: Iva Puhl, Christof Leser, Carolin Ölschläger, Susanne Rühmann, Anja Härter, Inge Lemberger, Ingo Brauer, Vroni Müller,

Ein herzliches Dankeschön geht an Sie, Herr Feucht, für zahlreiche fruchtbare Diskussionen, für ihr immer offenes Ohr und so manche Weisheit, die ich vielleicht einmal an meine Kinder und Kindeskinde weitergeben werde. Und auch ein Dankeschön für eine Vorlesung im 3.Semester in der Sie mich auf chaotische Art und Weise für den Obstbau zu begeistern begannen.

Vielen Dank sage ich Dir, Frank Fleischmann, für die Unterstützung und Durchführung der Untersuchungen zum Elicitin, für Deinen Rat bei machem Problem und besonders auch für die Durchsicht des Manuskripts.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei Ihnen, Herr Prof. Schnyder und Herr Prof. Oßwald, für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes und für die Übernahme der Aufgaben als Prüfer der Dissertation bedanken.

Ein herzlicher Dank geht an Dich, Ulrike Präger, für den Austausch über das Leben in Promotionszeiten und die Durchsicht des Manuskripts.

Ein Dankeschön auch an Simone Seiler, Julia Koehl, Ingrid Heiser und alle am Lehrstuhl für Phytopathologie der TUM, die mich bei den Arbeiten über die Pathogenesis-related Proteins unterstützt haben.

Dank auch allen Freunden, die mich in dieser Zeit unterstützt haben, aber auch allen, die mich in irgendeiner Weise „geformt, gefördert, geheilt oder gehemmt haben“ (Spruch von Marlene Kramler). All das waren wichtige Lebenserfahrungen meiner Promotionszeit.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich an meine Eltern Monika Mornau und Heinz Mornau richten. Ihr habt mir vieles mitgegeben in dieses Leben, was es erst möglich gemacht hat, dass ich heute hier stehe. Dafür, und für die Unterstützung in den vergangenen Jahren ein herzliches Dankeschön.

Euch, meinen Geschwistern Ruth und Franz, und Dir, Johannes Nebelmeir, gilt ein ganz besonderer Dank fürs Dasein und für gemeinsame Wege, die mich heute hierher gebracht haben. Danke!

Allen die ich vergessen habe: Danke!

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft gilt mein Dank für die Finanzierung des Sonderforschungsbereichs 607 „Wachstum und Parasitenabwehr“, in dessen Rahmen die vorliegende Arbeit entstanden ist.