

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

# **Phenylpropanoidbiosynthese und Resistenz bei Weinreben (*Vitis vinifera* L.)**

**Judith Pfeiffer**

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. W. Schwab  
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. G. Forkmann  
2. Univ.-Prof. Dr. D. R. Treutter

Die Dissertation wurde am 17.07.07 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 16.09.07 angenommen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>v</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>vii</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>viii</b>
<b>A Einführung</b>	<b>1</b>
<b>A.1 Einleitung</b>	<b>2</b>
A.1.1 Weinrebe . . . . .	2
A.1.1.1 ‘Regent’ . . . . .	5
A.1.1.2 ‘Müller-Thurgau’ . . . . .	5
A.1.1.3 ‘Spätburgunder’ . . . . .	6
A.1.1.4 ‘Nero’ . . . . .	7
A.1.2 Phenylpropanoide in Weinreben . . . . .	7
A.1.2.1 Funktionen der Flavonoide und Stilbene in Pflanzen . . . . .	8
A.1.2.2 Polyphenole und Gesundheit . . . . .	9
A.1.2.3 Stilbene . . . . .	9
A.1.2.4 Flavonole . . . . .	9
A.1.2.5 Flavanole . . . . .	10
A.1.2.6 Anthocyane . . . . .	10
A.1.3 Biosynthese der Flavonoide und Stilbene . . . . .	11
A.1.3.1 Strukturgene der Flavonoid- und Stilbenbiosynthese . . . . .	11
A.1.3.2 Regulation der Flavonoidbiosynthese . . . . .	14
A.1.4 Zielsetzung der Arbeit . . . . .	15
<b>A.2 Material und allgemeine Methoden</b>	<b>16</b>
A.2.1 Pflanzenmaterial . . . . .	16
A.2.2 Molekularbiologische Methoden . . . . .	16
A.2.2.1 Chemikalien . . . . .	16
A.2.2.2 RNA-Extraktion . . . . .	17
A.2.2.3 Reverse Transkription . . . . .	18

## *Inhaltsverzeichnis*

A.2.2.4	Polymerase-Kettenreaktion . . . . .	18
A.2.3	Enzymologische Methoden . . . . .	19
A.2.3.1	Synthese von <sup>14</sup> C-markierten Flavonoidsubstraten . . . . .	19
A.2.3.2	Enzymtests . . . . .	20
<b>B</b>	<b>Klonierung und heterologe Expression von Genen der Phenylpropanoidbiosynthese</b>	<b>23</b>
<b>B.1</b>	<b>Einleitung – Gene und Enzyme der Phenylpropanoidbiosynthese</b>	<b>24</b>
B.1.1	Phenylalanin-Ammonia-Lyase . . . . .	24
B.1.2	Chalkonsynthase und Stilbensynthase . . . . .	24
B.1.3	Flavanon 3 $\beta$ -Hydroxylase und Anthocyanidinsynthase . . . . .	25
B.1.4	Leukoanthocyanidinreduktase und Anthocyanidinreduktase . . . . .	26
<b>B.2</b>	<b>Methoden für die Klonierung und heterologe Expression</b>	<b>27</b>
B.2.1	Methoden für die Klonierung . . . . .	27
B.2.1.1	RNA-Isolierung und cDNA-Synthese . . . . .	27
B.2.1.2	Generacer RACE . . . . .	27
B.2.1.3	Primer für die Klonierungen . . . . .	28
B.2.1.4	Spezielle PCR-Methoden . . . . .	30
B.2.1.5	Ligation und Transformation . . . . .	31
B.2.1.6	Sequenzierung und Sequenzanalyse . . . . .	33
B.2.2	Methoden für die heterologe Expression in Hefe . . . . .	33
B.2.2.1	Expressionsvektor und Hefetransformation . . . . .	33
B.2.2.2	Expression und Enzymextraktion . . . . .	33
B.2.2.3	Puffer und Medien für die Hefeexpression . . . . .	34
B.2.3	Nachweis der Enzymaktivität und Substratspezifität . . . . .	35
<b>B.3</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion – Klonierungen und heterologe Expression</b>	<b>37</b>
B.3.1	Klonierungen von Genen für Schlüsselenzyme der Phenylpropanoidbiosynthese . . . . .	37
B.3.1.1	Phenylalanin-Ammonia-Lyase . . . . .	37
B.3.1.2	Stilbensynthase . . . . .	39
B.3.1.3	Chalkonsynthase . . . . .	43
B.3.2	Klonierung zweier Dioxygenasen der Flavonoidbiosynthese . . . . .	43
B.3.2.1	Flavanon 3 $\beta$ -Hydroxylase . . . . .	43
B.3.2.2	Anthocyanidinsynthase . . . . .	45
B.3.3	Klonierung von Reduktasen der Flavanolbiosynthese . . . . .	47

## Inhaltsverzeichnis

B.3.3.1 Anthocyanidinreduktase . . . . .	47
B.3.3.2 Leukoanthocyanidinreduktase . . . . .	50
B.3.4 Schlussfolgerungen . . . . .	53
<b>C Induktion der Phenylpropanoidbiosynthese</b>	<b>55</b>
<b>C.1 Einleitung – Resistenzinduktion</b>	<b>56</b>
C.1.1 Induzierbare Resistenz bei Pflanzen . . . . .	56
C.1.2 Resistenzinduktoren . . . . .	57
C.1.3 Weinrebe und <i>Botrytis</i> . . . . .	59
<b>C.2 Methoden zur Analyse der Induktion</b>	<b>62</b>
C.2.1 Quantitative PCR zur Genexpressionsanalyse . . . . .	62
C.2.1.1 RNA-Extraktion und reverse Transkription . . . . .	62
C.2.1.2 qPCR Optimierung . . . . .	63
C.2.1.3 qPCR Auswertung . . . . .	68
C.2.2 Quantifizierung der Enzymaktivitäten . . . . .	68
C.2.2.1 Enzymaufarbeitung . . . . .	68
C.2.2.2 Enzymtests und deren Auswertung . . . . .	69
<b>C.3 Versuchsbeschreibungen</b>	<b>71</b>
C.3.1 Entwicklungsstadien Blatt und Frucht . . . . .	71
C.3.2 Versuchsbeschreibungen Prohexadion-Ca-Behandlung . . . . .	72
C.3.2.1 Versuche an Blättern von Freilandpflanzen mit ProCa und Pflanzenstärkungsmitteln . . . . .	72
C.3.2.2 Versuch an <i>in vitro</i> -Pflanzen . . . . .	73
C.3.3 Versuchsbeschreibungen <i>Aureobasidium</i> -Behandlungen . . . . .	73
C.3.3.1 Versuche an Weinkallus . . . . .	74
C.3.3.2 Versuche an <i>in vitro</i> -Pflanzen . . . . .	75
C.3.3.3 Versuche an Weinblüten . . . . .	75
<b>C.4 Ergebnisse und Diskussion – Induktionsversuche</b>	<b>77</b>
C.4.1 Optimierung der Testbedingungen für die Quantitative PCR . . . . .	77
C.4.2 Entwicklungsstadien Blatt und Frucht . . . . .	79
C.4.3 Versuche ProCa-Behandlung . . . . .	85
C.4.4 Versuche <i>Aureobasidium</i> -Behandlungen . . . . .	89
C.4.4.1 Kallus . . . . .	89
C.4.4.2 <i>in vitro</i> -Pflanzen . . . . .	98
C.4.4.3 Blüten . . . . .	101

*Inhaltsverzeichnis*

C.4.5 Vergleich und Diskussion aller Versuchsergebnisse . . . . .	111
<b>D Ausblick und Zusammenfassung</b>	<b>115</b>
<b>D.1 Ausblick</b>	<b>116</b>
D.1.1 Klonierung und heterologe Expression . . . . .	116
D.1.2 Induktion der Phenylpropanoidbiosynthese . . . . .	117
<b>D.2 Zusammenfassung (deutsch)</b>	<b>118</b>
<b>D.3 Abstract (English)</b>	<b>120</b>
<b>D.4 Publikationen</b>	<b>122</b>
<b>E Anhang</b>	<b>123</b>
<b>Tabellen</b>	<b>124</b>
<b>Literatur</b>	<b>129</b>
<b>Danksagung</b>	<b>148</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>149</b>

# Abbildungsverzeichnis

A.1	Grundstruktur eines Flavonoids . . . . .	8
A.2	Flavonoidbiosynthese im Wein . . . . .	12
B.1	Heterologe Expression der PAL aus <i>Vitis</i> : Aktivitätsnachweis mit photometrischem Enzymtest . . . . .	38
B.2	Heterologe Expression der PAL aus <i>Vitis</i> : Aktivitätsnachweis mit <sup>14</sup> C-markiertem Phenylalanin als Substrat . . . . .	38
B.3	Heterologe Expression der STS aus <i>Vitis</i> : Identifikation des Produkts Resveratrol in verschiedenen Laufmitteln . . . . .	40
B.4	Wirkung von ProCa und ProCa-Formulierung auf die Aktivität einer heterolog exprimierten STS aus <i>Vitis</i> . . . . .	41
B.5	Wirkung von verschiedenen Zusätzen auf die Aktivität einer heterolog exprimierten STS aus <i>Vitis</i> . . . . .	42
B.6	Heterologe Expression der CHS und STS aus <i>Vitis</i> : Aktivitätsnachweis mit p-Cumaroyl-CoA und Kaffeooyl-CoA als Substrat . . . . .	44
B.7	Heterologe Expression der FHT aus <i>Vitis</i> : Aktivitätsnachweis . . . . .	45
B.8	Heterologe Expression der ANS aus <i>Vitis</i> : Aktivitätsnachweis . . . . .	46
B.9	Heterologe Expression der ANR aus <i>Vitis</i> : Aktivitätsnachweis mit Anthocyanidin-Substraten . . . . .	48
B.10	Heterologe Expression der ANR aus <i>Vitis</i> : Aktivitätsnachweis mit methylierten Anthocyanidin-Substraten . . . . .	49
B.11	Heterologe Expression der LAR aus <i>Vitis</i> : Aktivitätsnachweis mit <sup>14</sup> C-DHQ und <sup>14</sup> C-ERI als Substrat . . . . .	51
B.12	Heterologe Expression der LAR aus <i>Vitis</i> : Aktivitätsnachweis mit <sup>14</sup> C-DHK und <sup>14</sup> C-DHM als Substrat . . . . .	52
C.1	Optimierung der PCR-Bedingungen für die Analyse der <i>ANR</i> -Genexpression . . . . .	78
C.2	Genexpression und Enzymaktivitäten in verschiedenen Blattstadien . . . . .	80
C.3	Genexpression und Enzymaktivitäten in verschiedenen Fruchtstadien . . . . .	83

## Abbildungsverzeichnis

C.4	Genexpression bei der Kombinationsbehandlung von ProCa und Pflanzenstärkungsmitteln . . . . .	86
C.5	Genexpression bei Freiland-Pflanzen nach ProCa-Behandlung .	87
C.6	Genexpression bei <i>in vitro</i> -Pflanzen nach ProCa-Behandlung .	88
C.7	<i>Botrytis</i> -Bonitur bei Weinkallussen nach <i>Aureobasidium</i> -Behandlung . . . . .	89
C.8	Genexpression und Enzymaktivität der STS und Stilbengehalt von Kallus ‘Nero’ nach verschiedenen Behandlungen . . . . .	90
C.9	Genexpression und Enzymaktivitäten von Kallus ‘Nero’ nach <i>Aureobasidium</i> -Behandlung . . . . .	91
C.10	Enzymaktivitäten von Kallus ‘Regent’ nach <i>Aureobasidium</i> -Behandlung . . . . .	94
C.11	Genexpression von Kallus ‘Regent’ nach <i>Aureobasidium</i> -Behandlung . . . . .	95
C.12	Enzymaktivitäten von Kallus ‘Regent’ nach verschiedenen Behandlungen . . . . .	96
C.13	Genexpressionen von Kallus ‘Regent’ nach verschiedenen Behandlungen . . . . .	96
C.14	Genexpression bei <i>in vitro</i> -Pflanzen nach <i>Aureobasidium</i> -Behandlung . . . . .	98
C.15	Genexpression und Enzymaktivitäten bei <i>in vitro</i> -Pflanzen nach <i>Aureobasidium</i> -Behandlung . . . . .	100
C.16	Enzymaktivitäten bei <i>in vitro</i> -Pflanzen nach <i>Aureobasidium</i> -Behandlung . . . . .	100
C.17	Enzymaktivitäten bei <i>Aureobasidium</i> -behandelten Blüten im Gewächshaus . . . . .	102
C.18	Genexpression bei <i>Aureobasidium</i> -behandelten Blüten ‘Müller-Thurgau’ im Gewächshaus . . . . .	103
C.19	Genexpression bei <i>Aureobasidium</i> -behandelten Blüten ‘Regent’ im Gewächshaus . . . . .	104
C.20	Enzymaktivitäten bei <i>Aureobasidium</i> -behandelten Blüten im Freiland . . . . .	106
C.21	Genexpression bei <i>Aureobasidium</i> -behandelten Blüten ‘Müller-Thurgau’ im Freiland . . . . .	107
C.22	Genexpression bei <i>Aureobasidium</i> -behandelten Blüten ‘Regent’ im Freiland . . . . .	108
C.23	Vergleich der Genexpression bei Blüten im Gewächshaus und im Freiland . . . . .	111

# Tabellenverzeichnis

B.1	Sequenzen der Primer für die Klonierungen . . . . .	29
C.1	Sequenzen der Primer für die quantitativen PCR-Analysen . .	64
C.2	Optimale Bedingungen für die quantitativen PCR-Analysen . .	67
E.1	Übersicht aller vollständig klonierten und heterolog exprimierten cDNAs von Genen der Phenylpropanoidbiosynthese . . . . .	124
E.2	R <sub>f</sub> -Werte verschiedener Flavonoide bei der Dünnschichtchroma- tographie . . . . .	125
E.3	Übersicht aller Versuche zur Induktion der Phenylpropanoidbio- synthese . . . . .	126



# Abkürzungsverzeichnis

4CL	4-Cumarat:CoA-Ligase
A	Adenin
Acc. Nr.	Accession Number (GenBank)
Afz	Afzelechin
ANR	Anthocyanidinreduktase
ANS	Anthocyanidinsynthase
BAW	DC-Laufmittel mit n-Butanol, Eisessig, Wasser
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
C	Cytosin
C4H	Cinnamat 4-Hydroxylase
Cat	Catechin
CAW	DC-Laufmittel mit Chloroform, Eisessig, Wasser
cDNA	complementary DNA
CHI	Chalkonisomerase
CHS	Chalkonsynthase
CIP	Calf Intestinal Phosphatase
CoA	Coenzym A (Acetylierung)
CTAB	Hexadecyl-trimethyl-ammonium-bromid
Cy	Cyanidin
DC	Dünnschichtchromatographie
DFR	Dihydroflavonol 4-Reduktase
DHK	Dihydrokaempferol
DHM	Dihydromyricetin
DHQ	Dihydroquercetin
DMAZA	4-Dimethylaminozimtaldehyd
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleotid-Triphosphate

## Abkürzungsverzeichnis

Dp	Delphinidin
dpm	Zerfälle pro Minute (decays per minute)
DTT	1,4-Dithio-DL-threitol
EA	Epiafzelechin
EC	Enzyme Commission Number
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGC	Epigallocatechin
EGME	Ethylenglykol-monomethylether
Epi	Epicatechin
ERI	Eriodictyol
EST	Expressed Sequence Tags
EtOAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
F3'5'H	Flavonoid 3'5'-Hydroxylase
F3'H	Flavonoid 3'-Hydroxylase
FHT	Flavanon 3 $\beta$ -Hydroxylase
FLS	Flavonolsynthase
FNR	Flavanon 4-Reduktase
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd 3-Phosphat Dehydrogenase
GC	Gallocatechin
Hepes	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N-(2-ethansulfonsäure)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid / -galactosid
Km	Kaempferol
KPi	Kaliumphosphat
LAR	Leukoanthocyanidinreduktase
LB	Medium nach Luri-Bertani
LCy	Leukocyanidin
LDp	Leukodelphinidin
LPg	Leukopelargonidin
mRNA	messenger RNA
Mv	Malvidin

## Abkürzungsverzeichnis

My	Myricetin
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotid
NAR	Naringenin
OD	Optische Dichte
OMT	<i>O</i> -Methyltransferase
PAL	Phenylalanin-Ammonia-Lyase
PCH	Medium für die <i>Aureobasidium</i> -Anzucht (plate count Hefen)
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Polyethylenglykol
Pg	Pelargonidin
PHF	Pentahydroxyflavanon
PKS	Polyketidsynthase
Pn	Paeonidin
ProCa	Prohexadion-Ca
Pt	Petunidin
PVP	Polyvinylpyrrolidon
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidon
QTL	Quantitative Trait Locus
Qu	Quercetin
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor
RACE	Rapid Amplification of cDNA Ends
RES	Resveratrol
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
<i>S. c.</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD	Standardabweichung
SOC	Medium antibiotikafrei, nicht selektiv
STS	Stilbensynthase
T	Thymin
TAP	Tobacco Acid Pyrophosphatase
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TUB	β-Tubulin
UFGT	Flavonoid 3- <i>O</i> -Glucosyltransferase
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactosid

**Teil A**

**Einführung**

# A.1 Einleitung

## A.1.1 Weinrebe

Die Weinrebe *Vitis vinifera* L. (vinifera = weintragend) gehört zur Familie Vitaceae, Ordnung Vitales, Unterklasse Rosidae, Klasse Magnoliopsida. Die Gattung *Vitis* umfasst neben der Kulturrebe etwa 60 Wildarten, zum Beispiel die heute noch in Europa vorkommenden Arten *V. silvestris* und *V. caucasica* oder die in Amerika beheimateten *V. riparia* und *V. labrusca* [8, 31, 75].

### Geschichte

Aus fossilen Funden ist bekannt, dass es Pflanzen mit dem Weinlaub ähnlichen Blätter bereits vor 130 Millionen Jahren gab. Es gibt zahlreiche Fossilien von Rebsamen, die auf ein Alter von bis zu 80 Millionen Jahren geschätzt werden [8, 75].

Erste Zeugnisse für die Verwendung von Weintrauben durch den Menschen und die Herstellung von Wein sind 5000–6000 Jahre alte Keramiken mit Weinresten aus Georgien, dem südlichen Mesopotamien und Ägypten [8, 31]. Schon früh war Wein auch kulturell bedeutsam, beispielsweise als Grabbeigabe. In der griechisch-römischen Götterwelt gab es den Gott des Weins, Dionysos bzw. Bacchus. Aus römischer Zeit sind erste Beschreibungen von Rebsorten bezüglich Standortansprüchen und der Eignung für verschiedene Verwendungszwecke bekannt. Im Mittelalter wurde Weinbau in Europa vor allem von Klöstern betrieben, was die Bedeutung des Messweins für den christlichen Gottesdienst widerspiegelt [8].

Heute ist die Weinrebe eine wirtschaftlich bedeutende Kultur. Weltweit waren im Jahr 2003 rund 8,0 Millionen Hektar mit Weinreben bepflanzt [100]. Es gibt etwa 8000–15 000 Rebsorten [31, 75], die in unterschiedlichem Umfang und für verschiedenste Zwecke angebaut werden. Die Weinbeeren werden verwendet als Tafeltrauben, als Rosinen, für Wein und andere alkoholische Getränke (z. B. Madeira, Weinbrand), für Traubensaft oder Weinessig [8].

### Botanik

Weinreben sind mehrjährige holzige Kletterpflanzen, die in lichten Wäldern und Flussauen mit ihren Blattranken an Bäumen emporwachsen. Sie entwickeln dicke Stämme und können 200–300 Jahre alt werden. Die Wildarten sind zumeist

## A.1 Einleitung

zweihäusig, die Kulturreben besitzen jedoch zwittrige Blüten. Sehr häufig tritt dabei noch vor der Öffnung der Blüten Selbstbefruchtung auf. Die traubigen Blütenstände, »Gescheine«, enthalten etwa 100–250 Einzelblüten [8, 101].

Das Wachstum der Beeren verläuft in drei Phasen. Nach einer Phase der Zellteilung folgt eine Zeit des Wachstumsstillstands, danach eine Zellstreckungsphase, während der sich die Beeren auch färben und weich werden. Den Beginn der Traubenreife, wenn die Beeren beginnen weich und farbig zu werden, nennt man »Véraison«. Das für Tafeltrauben und die Rosinenproduktion wichtige Sortencharakteristikum der Kernlosigkeit kommt meist durch einen Abort der Samen kurz nach der Befruchtung zustande. Die reifen Weintrauben bestehen zu 15–25 % aus Zucker, je zur Hälfte Fructose und Glucose, und enthalten große Mengen an Weinsäure und Äpfelsäure, außerdem Kalium, Calcium, Magnesium, Pektine, Proteine, Farb-, Gerb- und Aromastoffe [8, 31, 101].

### Pflanzenschutz

Weinreben werden von zahlreichen Krankheiten und Schädlingen befallen. Neben zahlreichen Pilzkrankheiten, wie z. B. Grauschimmel (*Botrytis cinerea*) oder Roter Brenner (*Pseudopezicula tracheiphila*), können auch Virose, z. B. Reiszkrankheit (Grapevine Fanleaf Virus, Arabismosaikvirus u.a.), zu Ertragsausfällen führen. In einigen Anbaugebieten kommt es zu Schäden durch Nematoden, die auch als Überträger von Virose dienen. Des Weiteren besteht die Gefahr von Schäden durch Fröste und Hagel sowie durch Fraß der reifen Beeren durch Wespen oder Vögel [8, 111].

Von besonderer wirtschaftlicher Bedeutung sind einige Mitte des 19. Jahrhunderts aus Amerika eingeschleppte Schaderreger: Echter Mehltau (*Uncinula necator*), Falscher Mehltau (*Plasmospora viticola*) sowie die Reblaus. Durch Kreuzungen von Kulturreben mit amerikanischen Wildreben, z. B. *Vitis riparia*, konnten seither reblausresistente Unterlagen gezüchtet werden. Sorten mit erhöhter Mehltauresistenz wurden durch das Einkreuzen von Wildarten wie *V. riparia* oder *V. labrusca* erreicht [8, 111].

### Klima und Boden

Für den erfolgreichen Anbau von Weinreben, insbesondere für die Herstellung von Weinen hoher Qualität, spielen Klima und Boden eine wichtige Rolle. Die Summe der Umweltbedingungen aus Geologie, Klima und Topologie wird von Winzern »Terroir« genannt.

Weinreben wachsen auf nahezu allen Böden, nur stauende Nässe vertragen sie schlecht. Oft wird eine hohe Weinqualität gerade auf schlechten, eher trockenen Böden erzielt. Durch sein Angebot an Nährstoffen und Mineralien sowie durch seinen Wasserhaushalt hat der Boden allgemein einen Einfluss auf den

## A.1 Einleitung

Geschmack des Weins [8, 75].

Der Anbau von Wein wird durch verschiedene klimatische Faktoren begrenzt. Im Allgemeinen ist Weinanbau in gemäßigten und subtropischen Klimazonen möglich. In hohen Breitengraden limitiert die Dauer der Wachstumsperiode und die Anzahl der Sonnenscheinstunden sowie die Durchschnittstemperatur den Anbau. Zuviel Niederschlag erhöht die Gefahr von Pilzinfektionen. In niedrigen Breiten dagegen ist die Verfügbarkeit von Wasser und eine nicht zu hohe Maximaltemperatur entscheidend. Die eigentlich notwendige Kälteperiode für das Brechen der Knospenruhe kann in warmen Gebieten auch durch eine Trockenzeit ersetzt werden [8, 75, 111]. In Weinbaugebieten an der Grenze des Anbaus ist das Mikroklima entscheidend. Deshalb werden in Deutschland Weinstöcke an Südhänge, am Mittelmeer in die Ebene und in Nordafrika an Nordhänge gepflanzt [75].

### Genetik und Züchtung

Weinreben werden nur bei Neuzüchtungen generativ vermehrt, ansonsten ist eine Vermehrung durch Stecklinge oder Veredlung üblich [8]. Kulturreben lassen sich problemlos mit allen bekannten Wildreben kreuzen, die F1-Generation ist wüchsig und fertil. Hybridisierungen finden auch in der Natur statt [101].

Das Genom der Weinreben besteht aus 38 sehr kleinen somatischen Chromosomen ( $2n$ ), mit insgesamt 475 Mbp, von denen 96 % nicht-kodierend sind. Es gibt keine signifikanten Unterschiede in den DNA-Gehalten verschiedener Sorten [111]. Haploide Pflanzen sind bislang nicht bekannt. Autotetraploide kommen spontan vor, oft als Periklinal-Chimären. Sie haben größere Beeren, sind aber üblicherweise wenig fruchtbar und relativ empfindlich. Allotetraploide sind vielversprechender, da eine größere Genbasis für die Selektion besteht und die negativen Eigenschaften weniger ausgeprägt sind. Triploide Pflanzen sind steril, könnten aber für wüchsige Unterlagen geeignet sein, vor allem wenn eine Resistenz gegen viele bodenbürtige Pathogene gewünscht wird [101].

Wichtige Züchtungsziele sind Resistenzen gegen Umwelteinflüsse und Pathogene, insbesondere Viren. Außerdem werden ein guter Ertrag und eine hohe Qualität angestrebt. Dazu wird die Einkreuzung von Wildarten und Rückkreuzungen der Hybriden mit Kultursorten immer wichtiger [101, 111].

Da Weinreben stark heterozygot sind und viele schädliche rezessive Allele tragen, ist die Inzuchtdepression sehr stark. Schon bei der Kreuzung naher Verwandter kann es zu negativen Effekten kommen, in der zweiten oder dritten Generation sind Pflanzen aus Inzuchtlinien meist steril [101]. Des Weiteren wird die Züchtung neuer Sorten durch die lange Generationszeit und damit den hohen Bedarf an Zeit und Platz für die Selektion erschwert. Zusätzlich zur Bonitur der Pflanzen und Früchte an sich muss auch die Vinifikation, also die Eignung

## A.1 Einleitung

für die Weinbereitung, beurteilt werden. Viele Eigenschaften wie Qualität oder Geschmack sind quantitativ vererbt, von Umwelteinflüssen beeinflusst und es ist daher nur wenig über die Genetik dieser Eigenschaften bekannt [111].

Beschleunigt wird die Züchtung in den letzten Jahren einerseits durch biotechnologische Verfahren, wie die *in vitro*-Kultur oder die *embryo-rescue* Technik, andererseits durch markergestützte Selektion. Neben einzelnen Markern auf der Basis von Mikrosatelliten ist auch die Analyse quantitativ vererbter Eigenschaften (QTL) eine wichtige Entwicklung. Im Jahr 2001 wurde erstmals eine markergestützte Selektion von Mehltaresistenz mit QTLs durchgeführt. Mikrosatelliten-Marker werden auch für die reproduzierbare und standardisierbare Identifikation von Sorten verwendet [111].

Seit den 1990er Jahren gibt es Versuche mit transgenen Weinreben, jedoch sind noch keine Produkte auf dem Markt. Die Übertragung von Resistenzen gegen Pilzinfektionen, Viren oder Frost steht im Mittelpunkt der Bemühungen. Weitere Versuche betreffen die Samenlosigkeit oder das *Silencing* einer Polyphenol-Oxidase um die Bräunung von Rosinen zu vermindern [111].

### A.1.1.1 ‘Regent’

Bei der Sorte ‘Regent’ handelt es sich um eine pilztolerante Rotweinsorte. Sie entstand am Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof durch eine 1967 erfolgte Kreuzung von (‘Silvaner’ × ‘Müller-Thurgau’) × ‘Chambourcin’. ‘Chambourcin’ ist eine französische Hybridrebe mit guter Pilzresistenz und befriedigender Weinqualität [8]. Obwohl der Sortenschutz erst 1994 erteilt wurde, wurden in Deutschland 2006 bereits 2183 ha ‘Regent’ angebaut, was immerhin der sechstgrößten Fläche bei Rotweinsorten entspricht [135].

‘Regent’ besitzt eine hohe Resistenz gegen Falschen Mehltau und *Botrytis* sowie Winterfröste und eine gute, aber nicht komplette Resistenz gegen Echten Mehltau. Die Anfälligkeit gegenüber Viruserkrankungen ist mittelmäßig [8, 75]. Positiv ist der sehr hohe Farbstoffgehalt der Beeren [75], der vor allem auf Malvidin-3,5-Diglucosid zurückzuführen ist [72].

### A.1.1.2 ‘Müller-Thurgau’

Die Weißweinsorte ‘Müller-Thurgau’ gilt als eher anfällig gegenüber Pilzkrankheiten. Die Sorte wird manchmal auch unter den Namen ‘Riesling × Sylvaner’ oder ‘Rivaner’ geführt [8]. Diese Namen deuten an, dass die Sorte aus einer 1882 erfolgten Kreuzung von ‘Riesling’ × ‘Silvaner’ durch Hermann Müller aus Thurgau, Schweiz, stammt. Durch die Analyse von Mikrosatelliten wurde inzwischen nachgewiesen, dass es sich tatsächlich um eine Kreuzung aus ‘Riesling’



## A.1 Einleitung

mit ‘Gutedel’ oder ‘Madeleine Royale’, einem ‘Gutedel’-Sämling, handelt [31, 75].

‘Müller-Thurgau’ ist widerstandsfähig gegen Virose, jedoch anfällig gegenüber vielen Pilzkrankheiten wie *Botrytis*, Falschem Mehltau, Schwarzfleckenkrankheit und Rotem Brenner. Die Pflanzen sind empfindlich gegen Winter- und Spätfröste, was jedoch aufgrund der fruchtbaren Beiaugen selten zu Ertragsausfällen führt [8, 31, 75]. Zur Beliebtheit von ‘Müller-Thurgau’ tragen die frühe Reife und die regelmäßigen hohen Erträge dieser Sorte bei. Diese hohen Erträge haben jedoch häufig zu Weinen geringerer Qualität geführt, was dem Ruf der Sorte geschadet hat [75].

In den 1970er-Jahren war ‘Müller-Thurgau’ die meistgepflanzte Rebe in Deutschland, ihre Bedeutung nimmt seither jedoch ab [31]. Mit 13 988 ha nahm sie 2006 in Deutschland die zweitgrößte Anbaufläche aller Rebsorten ein [135].

### A.1.1.3 ‘Spätburgunder’

Die Rotweinsorte ‘Spätburgunder’ ist als eher anfällig gegenüber Pilzkrankheiten anzusehen. Sie ist in verschiedenen Ländern unter anderem unter den Namen ‘Pinot Noir’, ‘Burgundac Crni’, ‘Pignol’ oder ‘Kisburgundi Kék’ bekannt. Ihr offizieller Name in Deutschland ist ‘Blauer Spätburgunder’ [8].

Möglicherweise wurde der ‘Spätburgunder’ schon zur Römerzeit ausgelesen und kultiviert, es wird angenommen, dass er von der von Plinius beschriebenen allobrogischen Rebe abstammt. Schon im 4. Jahrhundert ist ein Anbau im Burgund nachweisbar. Im 14. Jahrhundert wurde die Sorte in mehreren Urkunden von Klöstern in Deutschland erwähnt [8, 75].

Die genetische Instabilität führte zur Entstehung zahlreicher Varianten, z. B. ‘Grauburgunder’, ‘Weißer Burgunder’ oder ‘Blauer Frühburgunder’ [8]. Einerseits sind Variationen innerhalb der Sorte ein Vorteil bei der Anpassung an lokale Bedingungen, andererseits ist es schwieriger, die gewünschten Eigenschaften stabil zu halten. Erst durch intensive Auslesezüchtung konnte in neuerer Zeit der durch Degeneration gefährdete Anbau gesichert werden [31, 75].

‘Spätburgunder’ ist durch die sehr gute Qualität seiner Weine die wichtigste Rotweinsorte des gemäßigten Klimas [8]. Viele moderne Rebsorten, z. B. ‘Chardonnay’, stammen von ihm ab [31]. Da die Reife der Beeren mittelfrüh bis spät erfolgt, sind gute Weinbaulagen für den Anbau nötig, um eine ausreichende Qualität, insbesondere einen nicht zu hohen Säuregehalt, zu erreichen [75].

Der Anbau von ‘Spätburgunder’ ist zwar im Allgemeinen unproblematisch, jedoch sind die Pflanzen sehr anfällig gegen Virose, insbesondere gegen die Reisigkrankheit, die zu Ertragsausfällen führen kann. Da die reifen Früchte zu *Botrytis*-Infektionen neigen, eignet sich diese Sorte nicht für die Lagerung

## A.1 Einleitung

und den Transport. *Botrytis* an reifen Beeren ist außerdem störend, da dies dem Wein einen unerwünschten braunen Farbstich gibt. Teilweise besteht ein Probleme mit frühzeitiger Fäulnis, die eine zu frühe Lese notwendig macht. Dennoch können mit *Botrytis* infizierte Beeren (»Edelfäule«) zu hochwertigen Weißherbstaulesen führen [8, 75].

In Deutschland entfällt die größte Anbaufläche unter den Rotweinsorten auf den ‘Blauen Spätburgunder’, im Jahr 2006 waren es 11 807 ha [135].

### A.1.1.4 ‘Nero’

Die pilzresistente Rebsorte ‘Nero’ wurde für die *in vitro*-Versuche verwendet. Es handelt sich dabei um sehr wohlschmeckende, blauschwarze Tafeltrauben [75]. Diese Sorte wurde 1965 in Ungarn aus einer Kreuzung von (‘Médoc Noir’ × ‘Perle von Szaba’) × (‘S. V. 12375’ × ‘Gárdoni’) gezüchtet. Bei ‘S. V. 12375’ handelt es sich um eine Hybride aus der Kulturrebe und einer amerikanischen Wildart [8]. ‘Nero’ ist weitgehend resistent gegen Mehltaukrankheiten und Frost [8, 75].

## A.1.2 Phenylpropanoide in Weinreben

Die Phenylpropanoide, die zu den Polyphenolen gehören, sind sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, die über vielfältige Stoffwechselwege aus der aromatischen Aminosäure Phenylalanin gebildet werden. Zu dieser Stoffgruppe gehören Hydroxyzimtsäuren, Lignine, Phlobaphene, Stilbene, Chalkone, Aurone, Flavonoide und Isoflavonoide.

Flavonoide sind aromatische Moleküle, die aus Malonyl-CoA aus dem Fettsäure-Stoffwechsel bzw. dem Pyruvatabbau und aus Hydroxyzimtsäuren (p-Cumaroyl-CoA), abgeleitet von Phenylalanin, gebildet werden. Ihre Grundstruktur aus zwei Phenolringen und einem Heterozyklus ist in Abb. A.1 auf S. 8 abgebildet. Flavonoide sind, im Gegensatz zu Stilbenen, Auronen und Isoflavonoiden, in Pflanzen ubiquitär. Die in einer Pflanze vorkommenden Flavonoide sind so typisch für die Pflanzenart, teilweise sogar für die Sorte, dass das Flavonoidmuster vielfach als chemotaxonomischer Marker verwendet wird [68]. Die wichtigsten Untergruppen der Flavonoide sind die Flavone, Flavonole, Leukoanthocyandine und Flavanol, sowie die Anthocyane, die häufigsten rot-blau-violetten Farbpigmente in Pflanzen. Nur in wenigen Pflanzenarten kommen als Pigmente die goldgelben Aurone (z. B. *Antirrhinum*) oder die 3-Deoxyanthocyane (z. B. *Sinningia*, *Sorghum*, Mais) vor [153].

Diese Arbeit befasst sich mit der Biosynthese von Stilbenen und Flavonoiden in Weinreben. Im Folgenden werden die Funktionen dieser Inhaltsstoffe in Pflanz-

## A.1 Einleitung

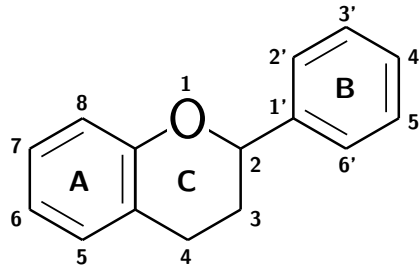


Abbildung A.1: Grundstruktur eines Flavonoids

zen und ihre Wirkung auf die menschliche Gesundheit aufgeführt. Anschließend (ab Abschnitt A.1.2.3 auf S. 9) sind die in *Vitis* vorkommenden Flavonoide und die Stilbene und ihre Biosynthese (Abschnitt A.1.3 auf S. 11) näher dargestellt.

### A.1.2.1 Funktionen der Flavonoide und Stilbene in Pflanzen

Flavonoide besitzen vielfältige Funktionen in Pflanzen (Review in [141, 144, 153]). Neben ihrer Funktion als Pigmente in Blüten, Samen und Früchten fungieren sie zum einen als Entwicklungsregulatoren, zum anderen schützen sie Pflanzen vor schädlichen Einflüssen durch ihre belebte und unbelebte Umwelt.

Bei vielen Arten sind Flavonoide für die Pollenfertilität notwendig. Zumindest bei *Arabidopsis* wird der Auxintransport durch Flavonoide reguliert.

Flavonoide fungieren als Schirmpigmente gegen UV-Strahlung. Zusätzlich schützen sie Pflanzen durch ihre antioxidativen Eigenschaften vor Schäden durch Trockenstress und UV-Strahlung. Daher akkumulieren sie oft in den Zellen der Epidermis.

Wurzelexsudate von Flavonoiden können als Signal an symbiontische Mikroorganismen dienen und bei den Symbionten für die Wurzelbesiedlung benötigte Gene induzieren. Es gibt aber auch Beispiele für allelopathisch gegen andere Pflanzen wirkende Exsudate, z. B. (–)-Catechin bei *Centaurea maculosa* [13].

Stilbene und Flavonoide schützen Pflanzen als Phytoalexine vor pathogenen Organismen. Je nach Wirt und Pathogen sind unterschiedliche Flavonoide wirksam, z. B. Stilbene, Proanthocyanidine oder Flavonole. Diese wirken gegen die Pathogene, indem sie bakterielle Enzyme denaturieren und Cellulasen, Xylasen und Pektinasen in ihrer Aktivität hemmen. Für nicht-angepasste Herbivore bewirken Flavonoide, vor allem Flavonole, Leukoanthocyanidine und Proanthocyanidine, eine Minderung des Nährwerts, Abschreckung, verminderte Verdaubarkeit oder sogar toxische Effekte.

### A.1.2.2 Polyphenole und Gesundheit

In zahlreichen Studien wurden die gesundheitlichen Wirkungen von Polyphenolen auf den Menschen untersucht (Review in [38, 67, 88, 90, 91]). Insbesondere Stilbene und Flavonoide besitzen *in vitro* antioxidative Eigenschaften und können reaktive Sauerstoffspezies abfangen. Durch oxidativen Stress entstehen *in vivo* Schäden an DNA, Lipiden und Proteinen, wodurch zahlreiche Krankheiten entstehen können. Dazu zählen insbesondere cardiovasculäre und neurodegenerative Erkrankungen sowie Krebs. Ein weiterer möglicher Wirkmechanismus ist die Bindung von Flavonoiden an Enzyme, z. B. zelluläre Rezeptoren und Transporter.

Ob diese positiven Effekte auch *in vivo* auftreten, ist bislang noch nicht vollständig geklärt. Es werden zwar bedeutende Mengen von Flavonoiden mit der Nahrung aufgenommen, es ist jedoch fraglich, ob die Flavonoide in genügend hohem Maß ins Blutplasma gelangen können. Möglicherweise werden sie auch wie in Pflanzen in Zellkernen angereichert [106]. Die Wirkung der durch mikrobiellen Umbau im Darm entstehenden Metaboliten ist ebenfalls noch nicht vollständig aufgeklärt. Da Flavonoide ubiquitär in Nahrungspflanzen vorkommen, sind vergleichende Studien mit und ohne eine Aufnahme von Flavonoiden schwierig durchzuführen.

### A.1.2.3 Stilbene

Stilbene sind wichtige Phytoalexine der Weinreben, sie wurden außerdem in den nur entfernt verwandten Pflanzen *Polygonum capsidatum*, *Veratrum*, Eukalyptus, Fichte und Erdnuss nachgewiesen (Review in [102]). Neben Resveratrol (RES) kommen in *Vitis* auch das glucosylierte Piceid, das methylierte Pterostilben sowie die oligomeren Viniferine vor [77]. Diese Substanzen sind Phytoalexine mit antifungaler Wirkung. In der Beerenhaut von *Vitis* sind je nach Sorte und Umweltbedingungen 20–1000 µg/g Stilbene enthalten, wobei der Gehalt an Stilbenen durch eine Pathogeninfektion stark ansteigt [113].

### A.1.2.4 Flavonole

Flavonole sind farblos oder gelblich gefärbt. Als Co-Pigmente der Anthocyane führen Flavonole zu einer bathochromen Verschiebung, also einer eher blauen Blütenfarbe [61].

Für die Pollenkeimung sind Flavonole in den meisten Pflanzen notwendig [96]. Bei der aus mehreren Arten, z. B. Mais, Prunkwinde oder Petunie, bekannten Mutation »weißer Pollen« [141] kann kein normales Pollenschlauchwachstum stattfinden. Bei der Modellpflanze *Arabidopsis* sind Flavonole dagegen nicht

## A.1 Einleitung

unbedingt notwendig, sie verbessern aber die Pollenkeimung und fördern den Samenansatz [26].

*Vitis* bildet Kaempferol (Km), Quercetin (Qu) und Myricetin (My) sowie Isorhamnetin, ein methyliertes Quercetin-Derivat. Diese kommen vor allem glykosyliert an 3-*O*-Position mit Glucose, Galaktose oder als Glucuronid vor. Der Flavonol-Gehalt in Weintrauben erhöht sich durch Sonnenlicht und UV-Strahlung (UV-C) und liegt je nach Quelle bei 80–330 nmol/g Weintrauben (Review in [90]).

### A.1.2.5 Flavanole

Zu den Flavanolen gehören die monomeren Catechine und Epicatechine sowie die polymeren Proanthocyanidine. Der Name Proanthocyanidine beruht auf der Eigenschaft dieser Stoffe, bei saurer Hydrolyse in farbige Anthocyanidine umgewandelt zu werden.

Flavanole dienen als Fraßschutz gegen Herbivore und erhöhen bei Weidetieren die Verdaubarkeit von Futterpflanzen mit hohem Proteingehalt (Review in [39, 155]). Sie beeinflussen den Geschmack und die Adstringenz von Wein und dienen als Schutz vor dem Zerbiss der Samen.

In *Vitis* kommen nur Flavanole mit zwei- oder dreifach hydroxyliertem B-Ring vor, die teilweise als Gallussäure-Ester vorliegen [22, 131]. Die Konzentrationen sind mit 1,9 mmol monomeren und 4,7 mmol polymeren Flavanolen pro Beere in jungen Beeren besonders hoch und nehmen bei der Beerenreife ab auf 0,2 mmol monomere und 1,6 mmol polymere Flavanole pro Beere [81]. Sehr hohe Konzentrationen (25 mg/g) finden sich in Traubenkernen [65].

### A.1.2.6 Anthocyane

Die rot bis blau gefärbten Anthocyane dienen als Blüten- und Fruchtfarben zum Anlocken von Bestäubern und Samenverbreitern. Die blaue und rote Farbe von Weintrauben begünstigt die Verbreitung der Samen, da Vögel ähnlich wie Menschen rot vor grünem Hintergrund gut sehen können [72].

Die Färbung wird mit steigender Anzahl der B-Ring-Hydroxylierungen und deren Methylierungen sowie der Glykosylreste immer bläulicher und wird außerdem vom pH-Wert und von Copigmenten beeinflusst. In *Vitis* kommen ausschließlich Cyanidin- und Delphinidin-Derivate vor, also zwei- und dreifach hydroxylierte und methylierte Anthocyane. Diese sind hauptsächlich in der Beerenhaut lokalisiert [72].

In *Vitis vinifera* kommen nur Monoglucoside von Malvidin (Mv), Delphinidin (Dp), Paeonidin (Pn), Petunidin (Pt) und Cyanidin (Cy) vor (in abnehmender

## A.1 Einleitung

Häufigkeit), außerdem die acylierten Formen mit p-Cumarsäure und Kaffeesäure. Das Hauptpigment ist bei den meisten Sorten Önin (Mv-3-*O*-Glucosid). Kreuzungsnachkommen mit amerikanischen Arten, wie z. B. 'Regent', haben meist auch Diglucoside, auch dabei kommen außer Pelargonidin (Pg) alle Aglykone vor, die acylierten Formen mit p-Cumarsäure und Kaffeesäure treten ebenfalls auf. Das Hauptpigment ist Malvin (Mv-3,5-*O*-Diglucosid), welches eine tiefblaurote Weinfarbe ergibt [71].

Die Anthocyan-Zusammensetzung wird verwendet, um Wein auf die verwendeten Sorten zu prüfen. Burgunder-Sorten enthalten beispielsweise keine acylierten Anthocyane [73].

### A.1.3 Biosynthese der Flavonoide und Stilbene

Die Biosynthese von Flavonoiden und Stilbenen (Abb. A.2 auf S. 12) ist bei zahlreichen Pflanzenarten detailliert erforscht. Zahlreiche wichtige Erkenntnisse der Genetik, z. B. Transposons oder Cosuppression, wurden zuerst anhand der Flavonoidbiosynthese gewonnen, insbesondere anhand leicht zu erkennender Mutationen, welche die Anthocyanfärbung von Blüten, Früchten oder Samen betreffen.

#### A.1.3.1 Strukturgene der Flavonoid- und Stilbenbiosynthese

Strukturgene der Flavonoid- und Stilbenbiosynthese wurden bereits aus vielen Pflanzenarten kloniert und in ihrer Funktion charakterisiert (Review in [69, 85, 133, 153]).

Die Polyphenolbiosynthese beginnt mit der Desaminierung der aromatischen Aminosäure Phenylalanin durch die Phenylalanin-Ammonia-Lyase (PAL). Über mehrere Schritte wird daraus p-Cumaroyl-CoA, welches zusammen mit drei Molekülen Malonyl-CoA zum einen durch die Stilbensynthase (STS) zu Resveratrol und dann zu weiteren Stilbenen umgesetzt wird. Zum anderen wird daraus durch die Chalkonsynthase (CHS) Naringeninchalkon, woraus zunächst mit Hilfe der Chalkonisomerase (CHI) Naringenin (NAR) und dann alle weiteren Flavonoide gebildet werden.

In Weinreben kommen fast ausschließlich Flavonoide vor, deren B-Ring zwei- oder dreifach hydroxyliert ist. Diese Hydroxylierungen werden durch Flavonoid-3'- bzw. -3'5'-Hydroxylasen (F3'H, F3'5'H) eingeführt, deren Substrate NAR sowie Dihydrokaempferol (DHK) sind. DHK entsteht durch die Flavanon 3 $\beta$ -Hydroxylase (FHT) aus NAR, wobei die FHT auch Eriodictyol (ERI), das zweifach hydroxylierte Flavanon, zu Dihydroquercetin (DHQ) umsetzt. DHK, DHQ sowie Dihydromyricetin (DHM) können nun durch die Flavonolsynthase

## A.1 Einleitung

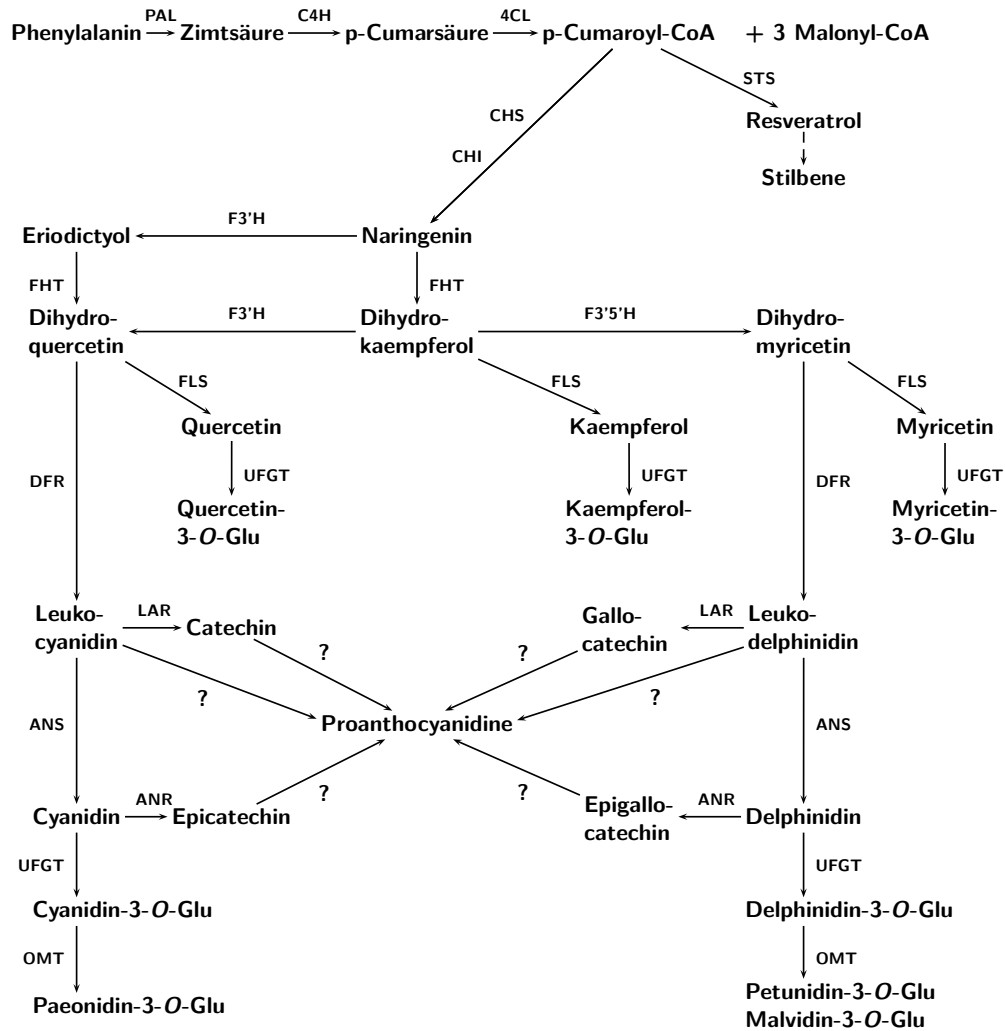


Abbildung A.2: Flavonoidbiosynthese im Wein. C4H: Cinnamat 4-Hydroxylase, 4CL: 4-Cumarat:CoA-Ligase, OMT: O-Methyltransferase

## A.1 Einleitung

(FLS) zu den entsprechenden Flavonolen umgesetzt werden. DHQ und DHM können alternativ durch die Dihydroflavonol 4-Reduktase (DFR) zu Leukocyanidin (LCy) bzw. Leukodelphinidin (LDp) umgesetzt werden. In Weinreben findet soweit bekannt kein Umsatz von DHK zu Leukopelargonidin (LPg) statt.

Für die Synthese der Anthocyane werden die Leukoanthocyanidine in Weinreben durch die Anthocyanidinsynthase (ANS) in Cyanidin und Delphinidin umgewandelt. Sowohl Flavonole als auch Anthocyanidine liegen in Pflanzen fast ausschließlich in glykosylierter Form vor. Die Anthocyanidine in Weinreben werden daher zunächst durch die UDP-Glucose:Flavonoid 3-*O*-Glucosyltransferase (UFGT) glucosyliert und können daraufhin durch Methyl-, Acyl- und weitere Glucosyltransferasen weiter modifiziert werden.

Die Flavanolbiosynthese zweigt an zwei Stellen von der der Anthocyane ab. Einerseits werden in Weinreben aus Leukoanthocyanidinen durch die Aktivität der Leukoanthocyanidinreduktase (LAR) Catechin (Cat) bzw. Galocatechin (GC) gebildet. Andererseits kann aus Anthocyanidinen durch die Aktivität der Anthocyanidinreduktase (ANR) Epicatechin (Epi) und Epigallocatechin (EGC) synthetisiert werden. Bei der Synthese der oligo- und polymeren Proanthocyanidine polymerisieren die monomeren Catechine und Epicatechine als Starter-Einheit mit einer oder mehreren Extensions-Einheiten, wobei neben den Monomeren auch Leukoanthocyanidine als Erweiterungs-Einheiten diskutiert werden. Ob diese Reaktion nicht-enzymatisch abläuft oder Polyphenol-Oxidasen oder andere Enzyme beteiligt sind, ist noch unklar (Review in [154]).

Flavonoide sind meist in der Vakuole lokalisiert. Der Transport dorthin ist noch nicht vollständig aufgeklärt, möglicherweise unterscheiden sich die Mechanismen bei verschiedenen Pflanzenarten. Es werden pH-abhängiger Transport, Transporter der MATE-Familie und der VP24-Familie sowie Glutathion-S-Transferasen diskutiert (Review in [133, 153]).

Dadurch, dass die Flavonoidbiosynthese bereits in zahlreichen Arten untersucht wurde, sind auch Einblicke in die Evolution dieses Synthesewegs möglich. Es wird vermutet, dass sich die meisten Enzyme der Flavonoidbiosynthese aus Enzymen des Primärmetabolismus entwickelt haben, da sie zu einer von drei in allen Organismen vorkommenden Enzymklassen gehören. Dies sind die 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen (FHT, FLS, ANS), die NADPH-abhängigen Reduktasen (DFR, LAR, ANR) und die Cytochrom-P450 Hydroxylasen (F3'H, F3'5'H) (Review in [153]). Ausnahmen davon sind die CHI, die in ihrer Sequenz und Struktur einzigartig ist und nur in Pflanzen vorkommt [80], sowie die CHS



## A.1 Einleitung

und STS, die zu den pflanzenspezifischen Polyketidsynthasen gehören [127].

### Subzelluläre Organisation

Neuere Studien beschäftigen sich mit der subzellulären Organisation der Enzyme der Flavonoidbiosynthese. Es wird angenommen, dass diese in Multienzymkomplexen angeordnet sind [27], die den direkten Transfer der teilweise toxischen Intermediate zwischen den aktiven Zentren erleichtern und Substrate in Teilstoffwechselwege kanalisieren. Dabei sind die membrangebundenen P450-Monooxygenasen wie C4H und F3'H lose mit den cytosolischen Enzymen verbunden und dienen diesen als Membrananker (Review in [40, 153]).

### Gentechnik

Gentechnische Methoden sind für die Aufklärung des Flavonoidbiosynthesewegs unverzichtbar, sei es durch gezieltes *Silencing* oder die Überexpression von Genen, Komplementierung von Mutanten oder heterologe Expression von untersuchten Genen. Daneben gibt es verschiedenste Versuche, mit Hilfe der so gewonnenen Erkenntnisse durch die Transformation von Genen der Polyphenolbiosynthese, Pflanzen für den kommerziellen Anbau zu erzeugen. Ziel dabei ist die Veränderung der Blütenfarbe (Review in [53]), eine verbesserte Pathogenabwehr, z. B. durch die Einführung einer *STS* in Reis [134], oder die Erzeugung von Nahrungspflanzen mit verbesserten Inhaltsstoffen (*functional food*), z. B. durch erhöhte Proanthocyanidingehalte in Futterpflanzen [156].

### A.1.3.2 Regulation der Flavonoidbiosynthese

Die Regulation der Flavonoidbiosynthese ist komplex (Review in [133, 153]). Sie erfolgt hauptsächlich durch verschiedene *Myb*- und bHLH-Transkriptionsfaktoren, die jeweils die Expression bestimmter Gene der Flavonoidbiosynthese induzieren oder hemmen.

Oft sind mehrere Transkriptionsfaktoren zur Initiation der Transkription notwendig. In *Arabidopsis* wirken beispielsweise ein *Myb*-Faktor (*tt2*), ein bHLH-Protein (*tt8*) und ein WD-repeat Protein (*ttg1*) für die Expression der *ANR* und damit für die Proanthocyanidin-Biosynthese zusammen [14].

Der Verlust der Anthocyanfärbung in weißen Trauben geht beispielsweise soweit bekannt bei allen weißen Rebsorten auf voneinander unabhängige Mutationen in den beiden Kopien eines *Myb*-Faktors zurück, der die Expression der *UFGT* reguliert [17]. Die eine Genkopie (*VvMybA2*) ist dabei durch eine *frameshift*-Mutation deaktiviert, die andere (*VvMybA1*) durch ein Retrotransposon im Promotor [84, 149].

#### **A.1.4 Zielsetzung der Arbeit**

Durch die Klonierung mehrerer wichtiger Gene der Phenylpropanoidbiosynthese und deren heterologe Expression in Hefe wurde in dieser Arbeit die Biosynthese von Flavonoiden und Stilbenen näher untersucht.

Darüber hinaus wurden verschiedene Gewebe von Weinpflanzen mit Pflanzenstärkungsmitteln (Milsana, Myco-Sin), einem Wachstumsregulator (ProCa) oder dem Extrakt eines hefeähnlichen Epiphyten (*Aureobasidium*) behandelt. Mit Hilfe quantitativer PCR-Analysen und Enzymtests wurde eine mögliche Resistenzinduktion durch Änderungen der Flavonoid- und Stilbenbiosynthese analysiert.

## A.2 Material und allgemeine Methoden

### A.2.1 Pflanzenmaterial

Das verwendete Pflanzenmaterial stammt von Weinpflanzen, die vom Lehrstuhl für Zierpflanzenbau und vom Fachgebiet für Obstbau kultiviert wurden. Alle verwendeten *in vitro*-Pflanzen und Kalluskulturen wurden vom Fachgebiet für Obstbau kultiviert. Alle Proben wurden sofort nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Es wurden die Rotweinsorten ‘Regent’ und ‘Spätburgunder’, die Weißweinsorte ‘Müller-Thurgau’ und die rote Tafeltraube ‘Nero’ verwendet. Dabei gelten ‘Regent’ und ‘Nero’ durch die Einkreuzung von amerikanischen Wildarten als widerstandsfähig gegen Pilzkrankungen, wohingegen ‘Spätburgunder’ und ‘Müller-Thurgau’ als anfällig angesehen werden.

Leider wurde erst nach Ende der Versuche festgestellt, dass bei der Sorte ‘Spätburgunder’ ein Etikettierungsfehler vorlag und es sich bei den untersuchten Pflanzen um ein Sortengemisch handelte. Sowohl im Phänotyp der Beeren und Blätter als auch im durch HPLC analysierten Flavonoidspektrum [Rühmann, unveröffentlicht] einzelner Pflanzen gab es deutliche Unterschiede.

### A.2.2 Molekularbiologische Methoden

Soweit nicht anders aufgeführt, wurden die allgemeinen molekularbiologischen Methoden Sambrook et al. [118] entnommen.

#### A.2.2.1 Chemikalien

Radioaktiv markiertes Malonyl-CoA ( $^{14}\text{C}$ ) für die CHS-Enzymtests und als Ausgangssubstanz für die Synthese von Flavonoidsubstraten für Enzymtests stammte von Moravek Biochemicals, radioaktiv markiertes Phenylalanin ( $^{14}\text{C}$ ) für PAL-Enzymtests von Sigma. Enzyme und weitere Reagenzien für die Molekularbiologie wurden von den Firmen MBI-Fermentas und Promega bezogen, einige Anthocyanidine wurden freundlicherweise von Stefan Martens, Marburg,

## A.2 Material und allgemeine Methoden

zur Verfügung gestellt. Standardsubstanzen für die Dünnschichtchromatographie sowie Anthocyanidine als Substrate für Enzymtests wurden von den Firmen Roth und Sigma bezogen. Die verwendeten Standard-Laborchemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen: Sigma, Fluka, Merck, Serva, Duchefa und Becton Dickinson (Difco). Oligonukleotide für die PCR wurden von den Firmen Metabion, Operon und MWG-Biotech hergestellt.

### A.2.2.2 RNA-Extraktion

Im Allgemeinen wurde für die RNA-Extraktion aus Laubblättern, Blüten und Früchten der Weinrebe das Concert™ Plant RNA Reagent von Invitrogen nach Angaben des Herstellers (Small Scale Protocol) verwendet. Etwa 50 mg Pflanzenmaterial wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert und in 2 ml-Reaktionsgefäßen in dem Reagenz, welches unter anderem  $\beta$ -Mercaptoethanol und Natriumazid enthält, homogenisiert. Die RNA wurde dann zunächst mit Chloroform extrahiert, danach mit Isopropanol gefällt und in Wasser rückgelöst. Die Qualität der extrahierten RNA (40-150  $\mu$ g) war gut, die bei manchen Proben auftretende geringfügige DNA-Kontamination wurde aufgrund der Schwierigkeiten mit anderen RNA-Extraktionsmethoden toleriert.

Insbesondere für Laubblätter wurden noch weitere Methoden getestet, wobei ebenfalls jeweils ca. 50 mg Blattmaterial verwendet wurde.

Beim RNeasy® Plant Mini Kit von Qiagen wurde das gemörserte Pflanzenmaterial in einem Puffer mit chaotropen Ionen (Guanidiniumthiocyanat) und  $\beta$ -Mercaptoethanol homogenisiert. Die RNA wurde an eine Silica-Membran in einem Zentrifugensäulchen gebunden, mehrmals gewaschen und schließlich mit Wasser eluiert. Mit dieser Methode konnte zwar RNA aus Weinkallus isoliert werden, die Isolierung von RNA aus Weinblättern war damit jedoch kaum möglich (<0,5  $\mu$ g). Auch die bei anderen Pflanzen (z. B. *Rosa*, unveröffentlicht) hilfreiche Zugabe von Polyvinylpyrrolidon (PVP) zur Komplexierung von phenolischen Inhaltsstoffen erhöhte die RNA-Ausbeute nicht. Eine Abwandlung des RNeasy-Protokolls mit einem veränderten Extraktionspuffer nach Geuna et al. [58] ergab ebenfalls keine Verbesserung. Weitere getestete Kits mit ähnlichem Extraktionsprinzip waren peqGOLD Plant RNA Kit (peqlab) und RNAqueous® (Ambion), welche jedoch nur zu extrem geringen RNA-Ausbeuten führten. Höhere Ausbeuten konnten mit einer Methode unter Verwendung eines CTAB-haltigen Extraktionspuffers und anschließender Chloroform/Isoamyl-Extraktion und Isopropanol-Fällung nach Baiges und Mas [11] erreicht werden. Je Präparation konnten etwa 10  $\mu$ g RNA guter Qualität extrahiert werden, diese war jedoch sehr stark mit DNA kontaminiert, sodass erst nach einer zusätzlichen LiCl-Fällung eine akzeptable RNA-Qualität erreicht wurde. Diese RNA zeigte jedoch nach

## A.2 Material und allgemeine Methoden

reverser Transkription schlechte Ergebnisse bei RT-PCR-Reaktionen. Relativ gute Ergebnisse ergab dagegen eine weitere Abwandlung des RNeasy Kits nach MacKenzie et al. [89] (zitiert in [99]). Der veränderte Extraktionspuffer enthielt Guanidiniumisothiocyanat, PVP-40,  $\beta$ -Mercaptoethanol und N-Laurylsarkosin. Diese Methode ergab 10–30  $\mu\text{g}$  RNA mit wenig Verunreinigungen, jedoch waren die PCR-Ergebnisse bei RNA aus Weinblättern teilweise schlecht reproduzierbar. Für die RNA-Isolierung aus Blütenmaterial wurde eine weitere Abwandlung dieser Methode verwendet (siehe Abschnitt C.2.1.1 auf S. 62).

Die Bestimmung von Menge und Qualität von Nukleinsäuren erfolgte jeweils mit dem Bio-Photometer (Eppendorf) und mit Agarose-Gelelektrophorese.

### A.2.2.3 Reverse Transkription

Die Synthese von cDNA durch reverse Transkription von RNA wurde in einem Gesamtvolumen von 25  $\mu\text{l}$  durchgeführt. 1  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA und 1  $\mu\text{M}$  (final) Oligo-dT-Anker-Primer 5'-GACCACGCGTATCGATGTCGAC(T)<sub>16</sub>V-3' wurden 5 min bei 70 °C inkubiert. Nach kurzem Abkühlen auf Eis wurden M-MLV 5 $\times$  Puffer (Promega) und dNTPs (je 0,2 mM final) zugefügt und 2 min bei 42 °C vorinkubiert. Dann wurden 200 U M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) zugefügt und die Reaktion 40 min bei 42 °C und anschließend 20 min bei 48 °C inkubiert. Die Inkubation bei 48 °C sollte eventuell vorhandene RNA-Sekundärstrukturen aufheben, die sonst die reverse Transkription behindern könnten.

### A.2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion

Bei der Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde falls möglich ein Mastermix mit den gemeinsamen Komponenten aller Reaktionen gemischt. Das Volumen für eine Reaktion betrug 20  $\mu\text{l}$ , darin enthalten waren Puffer (von MBI-Fermentas: + KCl, – MgCl<sub>2</sub>), MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM), dNTPs (je 0,2 mM), 5'- und 3'-Primer (je 0,2  $\mu\text{M}$ ), 0,2 U taq-Polymerase (MBI-Fermentas) und cDNA (0,8  $\mu\text{l}$ , aus rechnerisch 32 ng Gesamt-RNA revers transkribiert).

Das Standard-PCR-Programm war folgendes: 94 °C für 3,0 min; Zyklen: 94 °C für 0,5 min, Annealing-Temperatur für 0,5 min, 72 °C für 1,5 min; 72 °C für 7,0 min.

Nach der PCR wurden die Produkte mit Auftragspuffer (»Blaumarker«) vermischt und neben einem Längenstandard (50 bp oder  $\lambda$  DNA Eco471 Marker von MBI-Fermentas) auf ein Agarose-Gel aufgetragen, das aus 1 % Seakem LE-Agarose und 2,5  $\mu\text{M}$  Ethidiumbromid in TAE-Puffer (40 mM Tris-acetat und 1 mM EDTA) bestand. Nach der Elektrophorese wurden die Gele unter UV-Licht (254 nm) fotografiert und als Bilddatei gespeichert.

### A.2.3 Enzymologische Methoden

Allgemein wurde bei Enzymtests mit Substraten, die in Ethylacetat (EtOAc) gelöst vorlagen, zunächst das Lösungsmittel vollständig verdampft und das Substrat dann wieder im Reaktionspuffer rückgelöst. Als Puffer wurde 0,1 M Tris/HCl für pH-Werte von 7,0–9,0 oder 0,1 M KPi für pH-Werte von 4,0–7,0 verwendet. Nach Zugabe der benötigten Cofaktoren, der Enzymlösung sowie der in Wasser oder EGME gelösten Substrate wurde die Reaktionsmischung bei der gewünschten Temperatur für eine definierte Zeit inkubiert. Dann wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,5–1 Vol EtOAc gestoppt und die Produkte durch zweiminütiges Vortexen und anschließende zweiminütige Zentrifugation extrahiert. Diese Extraktion wurde noch einmal wiederholt und die Oberphasen mit den in EtOAc gelösten Produkten vereinigt.

Das Volumen der Ethylacetat-Phase mit den Produkten wurde dann in einer Vakuumzentrifuge reduziert und die Produkte vollständig auf Zellulose-Platten (Merck) für die Dünnschichtchromatographie (DC) aufgetragen. Nach der Entwicklung der DC-Platten in einem geeigneten Laufmittel wurden die Produkte nichtradioaktiver Enzymtests mit Färbereagenzien sichtbar gemacht. DC-Platten von Enzymtests mit  $^{14}\text{C}$ -markierten Substraten wurden zusammen mit Standards definierter Aktivität auf Phosphoimagerplatten (Phospho-Imager-Screen, Fujix) exponiert und mit dem Phosphoimager (Fujix Bas 1000, BASReader 2.21) eingescannt. Die Auswertung erfolgte mit der Software TINA (2.10i, raytest Isotopenmeßgeräte GmbH).

#### A.2.3.1 Synthese von $^{14}\text{C}$ -markierten Flavonoidsubstraten

Die  $^{14}\text{C}$ -markierten Flavonoidsubstrate Naringenin (NAR), Eriodictyol (ERI), Pentahydroxyflavanon (PHF), Dihydrokaempferol (DHK), Dihydroquercetin (DHQ) und Dihydromyricetin (DHM) wurden enzymatisch hergestellt. Als Ausgangssubstanz diente [Malonyl-2- $^{14}\text{C}$ ]-Coenzym A (Moravek Biochemicals) mit einer spezifischen Aktivität von 2,2 GBq/mmol.

Bei den verwendeten Enzymen handelte es sich um heterolog in Hefen exprimierte Enzyme (siehe Abschnitt B.2.2.2 auf S. 33), die in der Arbeitsgruppe vorhanden waren und deren Sequenzen aus verschiedenen dikotylen Pflanzen stammten. Analog des Biosynthesewegs in Pflanzen (siehe Abschnitt A.1.3 auf S. 11) wurde zunächst Malonyl-CoA und p-Cumaroyl-CoA bzw. Kaffeoyl-CoA mit CHS und CHI stereospezifisch zu (2S)-Naringenin bzw. (2S)-Eriodictyol umgesetzt. Aus NAR und ERI wurde dann mit FHT DHK bzw. DHQ synthetisiert. PHF und DHM wurden schließlich mit Hilfe der F3'5'H aus NAR bzw. DHK hergestellt.

## A.2 Material und allgemeine Methoden

Die Reaktionsbedingungen für die Substratsynthese sind im Folgenden aufgeführt und erfolgten nach in der Arbeitsgruppe üblichen Protokollen. Das Reaktionsvolumen betrug jeweils 250 µl, als Puffer wurde stets 0,1 M Tris/HCl mit dem angegebenen pH-Wert verwendet und die Inkubationszeit war 60 min. Je nach Aktivität der präparierten Enzyme wurden 5–30 µl Enzymlösung eingesetzt.

Es wurden immer 50–100 Reaktionen parallel durchgeführt und die EtOAc-Phasen mit den extrahierten Flavonoiden vereinigt. Ein Aliquot wurde mittels Dünnschichtchromatographie (Laufmittel CAW) aufgetrennt, womit der Umsatz kontrolliert und die Produkte autoradiographisch quantifiziert wurden.

### **Synthese von NAR / ERI**

*Substrat* 692 pmol (92 222 dpm) <sup>14</sup>C-Malonyl-CoA, 802 pmol nichtradioaktives Malonyl-CoA und 1000 pmol p-Cumaroyl-CoA/ Kaffeoyl-CoA

*pH-Wert* 7,5 für NAR, 6,0 für ERI

*Temperatur* 37°C

*Enzym* CHS, CHI

### **Synthese von DHK / DHQ**

*Substrat* 5000 dpm NAR / ERI

*pH-Wert* 7,5

*Cofaktoren* 0,05 mM FeSO<sub>4</sub>, 2 mM Na-Ascorbat, 0,2 mM 2-Oxoglutarat

*Temperatur* 30°C

*Enzym* FHT

### **Synthese von PHF / DHM**

*Substrat* 5000 dpm NAR / DHK

*pH-Wert* 7,5

*Cofaktoren* 1 mM NADPH

*Temperatur* 25°C

*Enzym* F3'5'H

### **A.2.3.2 Enzymtests**

Nachfolgend sind die Reaktionsbedingungen für die durchgeführten Enzymtests aufgeführt. Wenn nicht anders angegeben, handelt es sich um die in der Arbeitsgruppe üblichen Protokolle. Die üblicherweise verwendete Substratmenge mit einer Aktivität von 800 dpm entspricht etwa 4,3 pmol. Das Gesamtvolumen lag bei Versuchen mit Blattmaterial meist bei 200 µl und bei Kallus oder Früchten wegen der niedriger konzentrierten Enzymextrakte bei 500 µl, so dass stets ein zwei- bis dreifacher Überschuss an Puffer bezüglich des Enzymvolumens

## A.2 Material und allgemeine Methoden

vorhanden war. Die ANR-Reaktion erfolgte immer in einem Gesamtvolumen von 500  $\mu$ l. Bei der für einige Enzymtests benötigten DFR handelte es sich um eine heterolog exprimierte DFR aus *Fragaria* [34].

### **PAL-Enzymtest**

*Substrat* 13,9 pmol (13 888 dpm) L-Phenylalanin-UL-<sup>14</sup>C (Sigma, spezifische Aktivität 1,5 GBq/mmol)

*Puffer* 0,1 M Tris/HCl, pH 8,8, 2 mM Na-Ascorbat

*Temperatur* 35°C

Die Reaktion wurde mit Essigsäure (0,1 Vol) abgestoppt bzw. angesäuert, um die Extraktion des Produkts Zimtsäure zu verbessern.

*Laufmittel* 6% Essigsäure  
verändert nach [7]

### **CHS/STS-Enzymtest**

*Substrat* 833 pmol (111 111 dpm) <sup>14</sup>C-Malonyl-CoA und 500 pmol p-Cumaroyl-CoA oder Kaffeoyl-CoA

*Puffer* 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0, 2 mM Na-Ascorbat

*Temperatur* 37°C

*Laufmittel* CAW  
nach [126, 128]

### **FHT-Enzymtest**

*Substrat* 800 dpm NAR, ERI oder PHF

*Puffer* 0,1 M Tris/HCl, pH 7,5

*Cofaktoren* 0,05 mM FeSO<sub>4</sub>, 2 mM Na-Ascorbat, 0,2 mM 2-Oxoglutarat

*Temperatur* 25°C

*Laufmittel* CAW

### **DFR-Enzymtest**

*Substrat* 800 dpm DHK, DHQ oder DHM

*Puffer* 0,1 M Tris/HCl, pH 7,5

*Cofaktoren* 1 mM NADPH

*Temperatur* 25°C

*Laufmittel* CAW

### **ANS-Enzymtest**

*Substrat* 5000 dpm DHK, DHQ oder DHM

*Puffer* 0,1 M Tris/HCl, pH 7,5

*Cofaktoren* für die DFR-Reaktion: 1 mM NADPH; für die ANS-Reaktion:  
0,05 mM FeSO<sub>4</sub>, 2 mM Na-Ascorbat, 0,2 mM 2-Oxoglutarat

*Temperatur* 30°C



## A.2 Material und allgemeine Methoden

Zunächst wurden nur 40 µl DFR-Enzymlösung und der für die DFR-Reaktion notwendige Cofaktor NADPH 30 min mit den Dihydroflavonolen inkubiert, um die eigentlichen Substrate der ANS, die Leukoanthocyanidine, herzustellen. Danach wurden ANS-Enzymlösung und die Cofaktoren der ANS zugegeben und diese Mischung weitere 30 min inkubiert.

*Laufmittel* CAW

nach [Martens, unveröffentlicht]

### **FLS-Enzymtest**

*Substrat* 800 dpm DHK, DHQ oder DHM

*Puffer* 0,1 M Tris/HCl, pH 7,5

*Cofaktoren* 0,05 mM FeSO<sub>4</sub>, 2 mM Na-Ascorbat, 0,2 mM 2-Oxoglutarat

*Temperatur* 25°C

*Laufmittel* Forestal

### **LAR-Enzymtest**

*Substrat* 800 dpm DHK, DHQ oder DHM

*Puffer* 0,1 M KPi, pH 6,5

*Cofaktoren* 1 mM NADPH

*Temperatur* 25°C

Die Zugabe von 40 µl DFR-Enzymlösung war notwendig, um die Dihydroflavonole zu Leukoanthocyanidinen, den Substraten der LAR, umzusetzen.

*Laufmittel* BAW

nach [105, 108]

### **ANR-Enzymtest**

*Substrat* 50 µg Pg, Cy, Dp, Pn, Pt oder Mv, als 1 mg/ml Lösung in EGME  
(Ethylenglykol-monomethylether)

*Puffer* 0,1 M KPi, pH 5,5

*Cofaktoren* 2 mM NADPH

*Temperatur* 45°C

*Laufmittel* BAW, anschließend mit DMAZA-Lösung besprüht: 3 N HCl mit  
50 % Ethanol und 0,1 % DMAZA (4-Dimethylaminozimtaldehyd)

nach [105, 108]

### **Laufmittel für die Dünnschichtchromatographie**

6 % *Essigsäure*

30 % *Essigsäure*

*CAW* Chloroform:Eisessig:Wasser 10:9:1

*BAW* Butanol:Eisessig:Wasser 6:1:2 + 100 µl 2 N HCl auf 90 ml Laufmittel

*Forestal* Wasser:HCl:Eisessig 30:3:10

## **Teil B**

# **Klonierung und heterologe Expression von Genen der Phenylpropanoidbiosynthese**

## B.1 Einleitung – Gene und Enzyme der Phenylpropanoidbiosynthese

Im Folgenden werden die Eigenschaften der in dieser Arbeit vollständig klonierten und exprimierten Gene der Polyphenolbiosynthese aus *Vitis* näher beschrieben. Dies sind die Gene für die Schlüsselenzyme PAL, STS und CHS, die beiden 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen FHT und ANS, sowie die beiden Gene für die Reduktasen der Flavanolsynthese, LAR und ANR.

### B.1.1 Phenylalanin-Ammonia-Lyase

Die Phenylalanin-Ammonia-Lyase (PAL, EC 4.3.1.5) katalysiert die Bildung von trans-Zimtsäure aus der aromatischen Aminosäure Phenylalanin durch trans-Elimination von Ammonium. Die Reaktion benötigt keine Cofaktoren und wird durch höhere Konzentrationen (0,1 mM) von Zimtsäure und Zimtaldehyd gehemmt [56, 69]. Das pH-Optimum der Reaktion liegt bei 8,8.

Das Enzym ist ein Tetramer, dessen Untereinheit 74 kDa–79 kDa groß ist [69]. Über die Homologie zur Histidin-Ammonia-Lyase, deren Kristallstruktur bekannt ist, wurden für die Funktion wichtige Aminosäuren identifiziert und durch Mutationsstudien bestätigt [114].

### B.1.2 Chalkonsynthese und Stilbensynthese

Die Chalkonsynthese (CHS, EC 2.3.1.74) katalysiert als ersten Schritt der Flavonoidbiosynthese die Kondensation von p-Cumaroyl-CoA mit drei Acetat-Einheiten aus Malonyl-CoA und die anschließende Zyklisierung zu 4,2',4',6'-Tetrahydroxychalkon (Naringenchalkon). Dabei werden keine Cofaktoren benötigt. Das Naringenchalkon isomerisiert spontan zu einem Racemat aus (2R/S)-Naringenin, in Anwesenheit von CHI wird dagegen stereospezifisch nur 2S-NAR gebildet. Nur diese Form wird von den weiteren Enzymen als Substrat akzeptiert (Review in [69, 133]). Als Starter-CoA können neben p-Cumaroyl-CoA auch Kaffeyl-CoA oder Feruloyl-CoA eingesetzt werden, der Umsatz ist jedoch weniger effizient.

## B.1 Einleitung – Gene und Enzyme der Phenylpropanoidbiosynthese

Das Enzym besteht aus zwei identischen, funktional vollständigen, interagierenden Untereinheiten mit jeweils 40 kDa–44 kDa [146]. Durch die 3D-Struktur der CHS von *Alfalfa* [47] und Mutationsstudien konnte die Bedeutung verschiedener konservierter Aminosäuren für den Reaktionsmechanismus und die Struktur des Proteins aufgeklärt werden [78, 79, 119]

Die Stilbensynthese (STS, EC 2.3.1.95) ist wie die CHS eine Polyketidsynthase (PKS) Typ III. Die STS wurde zuerst aus Zellkulturen von Erdnuss (*Arachis hypogaea*) isoliert [125], die erste vollständige cDNA wurde aus *Vitis* kloniert [94]. Es handelt sich bei dem Enzym um ein Homodimer aus zwei 43 kDa–47 kDa Einheiten.

Die STS ist der CHS sowohl in ihrer Sequenz, als auch im Reaktionsmechanismus sehr ähnlich. Zunächst finden ebenfalls drei Kondensationen von p-Cumaryl-CoA mit Malonyl-CoA statt, der Ringschluss des Tetraketid-Intermediats erfolgt jedoch auf andere Weise (Review in [127]). Nach einer zusätzlichen Decarboxylierung entsteht als Produkt trans-Resveratrol (RES).

Ein Vergleich der Kristallstruktur von CHS und STS ermöglichte Rückschlüsse auf für die Funktion und Struktur wichtige Aminosäuren. Durch wenige gezielte Aminosäure-Austausche konnte so aus einer CHS eine STS erzeugt werden [9, 10]. Da auch die Intronpositionen zwischen den beiden Genen konserviert sind [126], wird angenommen, dass die Stilbensynthasen verschiedener Gattungen im Lauf der Evolution mehrfach aus Chalkonsynthasen entstanden sind [145].

### B.1.3 Flavanon 3 $\beta$ -Hydroxylase und Anthocyanidinsynthase

Die Flavanon 3 $\beta$ -Hydroxylase (FHT, EC 1.14.11.9) katalysiert die Bildung von Dihydroflavonolen aus Flavanonen durch eine Hydroxylierung der Position 3. Als Substrat werden sowohl (2S)-NAR als auch (2S)-ERI akzeptiert. Es handelt sich bei der FHT um eine lösliche, 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenase, die als Cofaktoren 2-Oxoglutarat, Sauerstoff (O<sub>2</sub>), Eisen (Fe<sup>2+</sup>) und Ascorbat benötigt. Das monomere Protein hat eine Masse von etwa 42 kDa (Review in [69, 133]).

Die Anthocyanidinsynthase (ANS, EC 1.14.11.19), die bei *Arabidopsis* auch Leukocyanidindioxygenase (LDOX) genannt wird, wurde zunächst durch die tanninfreie *Arabidopsis*-Mutante TDS4 (tannin deficient seed) identifiziert. Ebenso wie die FHT ist die ANS eine 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenase und benötigt dieselben Cofaktoren wie die FHT-Reaktion [117]. Die ANS wandelt die farblosen Leukoanthocyanidine zu Anthocyanidinen um, den Vorläufern der Anthocyane und Epicatechine. Das Leukoanthocyanidin (Flavan-3,4-diol) wird durch die Enzymreaktion zu 2-Flaven-3,4-diol, das spontan zur Pseudobase

isomerisiert und bei saurem pH-Wert zum Anthocyanidin wird [98]. Die 3D-Struktur der etwa 40 kDa großen ANS von *Arabidopsis* ist inzwischen aufgeklärt [148, 152].

#### **B.1.4 Leukoanthocyanidinreduktase und Anthocyanidinreduktase**

Erst vor kurzer Zeit wurde die Leukoanthocyanidinreduktase (LAR, EC 1.17.1.3) aus der Leguminose *Desmodium* kloniert. Das Enzym ist ein Monomer mit 43 kDa und gehört zur Gruppe der Isoflavonreduktasen. Es katalysiert in Anwesenheit von NADPH die Reaktion von Leukoanthocyanidinen zu (+)-Catechinen. Die Enzymaktivität wird durch das Produkt Catechin sowie durch Anthocyanidine gehemmt [139]. Die Modellpflanze *Arabidopsis* besitzt, soweit bekannt, keine *LAR* [1].

Die Anthocyanidinreduktase (ANR, EC 1.3.1.77) wurde als *Arabidopsis*-Mutante *BANYULS* bekannt. Da die Sequenz Ähnlichkeiten mit anderen Isoflavonreduktasen wie z. B. der DFR zeigt, wurde zunächst die Funktion einer LAR vermutet. Tatsächlich katalysiert die ANR jedoch die NADPH-abhängige Reaktion von Anthocyanidinen zu (–)-Epicatechinen. Das Enzym ist 37 kDa–38 kDa groß und besitzt ein auffällig hohes Temperaturoptimum von etwa 45 °C [155, 157]. Die Reaktion wird durch höhere Konzentrationen der Substrate oder einiger weiterer Flavonoide, z. B. Qu, DHQ oder Cat, gehemmt. Da die Anthocyanidin-Substrate in verschiedenen Formen vorliegen können (Pseudobase, Flavylium-Kation), ist der Reaktionsmechanismus schwierig aufzuklären [155].

## B.2 Methoden für die Klonierung und heterologe Expression

### B.2.1 Methoden für die Klonierung

#### B.2.1.1 RNA-Isolierung und cDNA-Synthese

Die RNA für die Klonierungen wurde aus Blättern von im Freiland kultivierten Pflanzen der Sorten 'Regent' und 'Spätburgunder' gewonnen. Dabei wurde das Concert™ Plant RNA Reagent von Invitrogen nach Anleitung des Herstellers verwendet. Anschließend wurde die RNA in cDNA umgeschrieben (siehe Abschnitt A.2.2.3 auf S. 18).

#### B.2.1.2 Generacer RACE

Für die Amplifikation von 5'-Enden von mRNAs wurde das GeneRacer™ Kit (Invitrogen) verwendet. Dabei handelt es sich um ein RLM-RACE (RNA ligase-mediated rapid amplification of 5' and 3' cDNA ends), bei dem ein RNA Oligonukleotid selektiv an die 5'-Enden von vollständigen mRNAs mit Capstruktur ligiert wird.

Als erstes wurde Gesamt-RNA mit CIP (calf intestinal phosphatase) behandelt, um die 5'-Phosphate unvollständiger mRNAs und anderer RNA-Klassen zu entfernen. Dadurch können diese später nicht mehr mit dem RNA-Adapter ligieren und in darauffolgenden PCR-Reaktionen zur Amplifikation unvollständiger 5'-Enden führen. Vollständige mRNAs mit der 5'-Capstruktur werden durch diesen Schritt nicht verändert. Mit einer Phenol-Chloroform-Extraktion und anschließenden Ethanol-fällung wurde die RNA vom CIP-Enzym gereinigt.

Danach wurden die 5'-Capstrukturen durch eine Inkubation mit TAP (tobacco acid pyrophosphatase) entfernt und dann mit T4 RNA Ligase ein »GeneRacer™ RNA Oligo« an das so generierte 5'-phosphorylierte mRNA-Ende ligiert. Dadurch entsteht eine Primerbindungsstelle bekannter Sequenz am 5'-Ende der mRNAs. Die im Protokoll vorgesehenen weiteren Fällungsschritte zur Inaktivierung der TAP und Ligase wurden weggelassen.

Anschließend erfolgte eine cDNA-Synthese mit dem GeneRacer Oligo-dT Primer oder mit Oligo-dT-Anker (Protokoll siehe Abschnitt A.2.2.3 auf S. 18).

## B.2 Methoden für die Klonierung und heterologe Expression

Die 5'-Enden der gesuchten cDNAs konnten dann mit genspezifischem reverse-Primer und GeneRacer 5'-(nested)-Primer und die 3'-Enden mit genspezifischem forward-Primer und GeneRacer 3'-(nested)-Primer amplifiziert werden.

### B.2.1.3 Primer für die Klonierungen

Für die Klonierung zur Expression wurden jeweils zwei Primer im 5'- und im 3'-nichttranslatierten Bereich aus einem Alignment bekannter Nukleotidsequenzen von *Vitis* verwendet. Im Folgenden sind jeweils die Zugriffsnummern (Acc.Nr.) in GenBank<sup>1</sup> für die verwendeten Sequenzen angegeben. In der Regel handelte es sich dabei um die Sequenzen vollständiger cDNAs, in einigen Fällen auch um genomische DNA oder ESTs. Zunächst wurden PCR-Reaktionen mit allen 5'/3'-Primerkombinationen und mit verschiedenen Annealing-Temperaturen getestet. Die beste Primerkombination wurde dann jeweils in einer Proofreading-PCR wiederholt. Die für die Klonierungen letztlich verwendeten Primer sind in Tab. B.1 auf S. 29 aufgeführt.

#### **PAL**

Die 5'-Primer für den vollständigen codierenden Bereich der *PAL* wurden von den *Vitis*-Sequenzen AB015871 und AB015870 abgeleitet, die 3'-Primer von den Sequenzen AB015871 und X75967.

#### **STS**

Für die Klonierung der *STS* wurde ein Alignment von *STS*-Sequenzen verschiedener *Vitis*-Arten verwendet. Aus *Vitis vinifera* stammten die Sequenzen S63221, X76892 und AB046375 sowie für den 3'-nichtcodierenden Bereich zusätzlich S63227 und S63225. Außerdem wurden die Sequenzen AB046373 aus *V. riparia* und AB046374 aus *V. labrusca* verwendet, sowie drei Sequenzen aus der von *V. aestivalis* abgeleiteten Sorte 'Norton' (AY059639, AF418567 und AF418566).

#### **CHS**

Die Primer für die Klonierung der *CHS* wurden von den *Vitis*-Sequenzen X75969, AF020709, AB015872, AB066275 und AB066274 abgeleitet.

#### **FHT**

Für die *FHT*-Klonierung stand nur eine Sequenz, X75965, als Quelle für die Primer zur Verfügung.

#### **ANS**

Die 3'-Primer für die *ANS*-Klonierung sind von der Sequenz X75966 abgeleitet, für die 5'-Primer wurde zusätzlich die Sequenz AF290432 verwendet.

---

<sup>1</sup> Genetic sequence database (GenBank). URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>

## B.2 Methoden für die Klonierung und heterologe Expression

Gen	Primersequenz
<i>PAL</i>	f 5'-GTTTCTTTGTGGGGATTC-3'
	r 5'-GTGSAAGGGTGAAATCC-3'
<i>STS</i>	f 5'-GCTTYAATTTSAKTACGTAKCTRGSATCMATGGC-3'
	r 5'-CCTATTYRAYAYAWTASKVCATTGAAGGG-3'
<i>CHS</i>	f 5'-GAWKCARGYAGCCAAMAATGGTG-3'
	r 5'-GTTGAYBAGTGACTIONCAGTGAG-3'
<i>FHT</i>	f 5'-GCAACCCAGAGGTAAAGGTC-3'
	r 5'-GTGTAGAAAGAGGCACAATTGG-3'
<i>ANS</i>	f 5'-CAAGTAGATCAGTGATATTTACTAG-3'
	r 5'-GATCAAAGATTGGGAAGCTTG-3'
<i>LAR1</i>	f 5'-GTAGAGAAGAAGCATCATCAG-3'
	r 5'-GGAGGACTAATCGCATGCATG-3'
<i>LAR2</i>	f 5'-CTCAGAAAATTAACACCGAT-3'
	r 5'-GAWTRGGGAGCTGGCCACATC-3'
<i>ANR</i>	f 5'-GCCAATTTGGAAGTGAGG-3'
	r 5'-GAGGGATAAGATAGTGCTCC-3'

Tabelle B.1: Sequenzen der Primer für die Klonierungen. Jeweils 5'- (f) und 3'-Primer (r). Ableitung der Primer siehe Text.



### **ANR**

Die *Vitis*-Sequenz BN000166 wurde für die Primer der ANR-Klonierung verwendet.

### **LAR1 und LAR2**

Für die Klonierung der *LAR* aus *Vitis* wurde eine BlastN-Suche mit bekannten *LAR*-Sequenzen in der EST-Datenbank (EST: expressed sequence tags) durchgeführt. Die Suche wurde auf Treffer innerhalb der Gattung *Vitis* eingegrenzt. Ein Alignment der gefundenen Sequenzfragmente ergab zwei deutlich voneinander verschiedene Sequenzen. Der gesamte codierende Bereich der einen Sequenz (*LAR1*) konnte direkt aus den ESTs zusammengesetzt werden. Von der zweiten (*LAR2*) konnte aus den EST-Sequenzen nur das 3'-Ende zusammengesetzt werden, das 5'-Ende wurde durch ein 5'-RACE mit dem Generacer-Protokoll (Abschnitt B.2.1.2 auf S. 27) amplifiziert. Eine ausführliche Beschreibung der Vorgehensweise wurde bereits veröffentlicht [105].

## **B.2.1.4 Spezielle PCR-Methoden**

### **Proofreading-PCR**

Um die Fehlerrate bei PCRs zu verringern, deren Produkte in einen Expressionsvektor kloniert werden sollten, wurden Proofreading-Enzyme verwendet. Bei einem Teil der Klonierungen wurde Expand High Fidelity von Roche (3,5 U/µl) verwendet, eine Mischung aus taq- und tgo-Polymerase, wobei die tgo-Polymerase eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität besitzt. Bei den anderen Klonierungen kam die Expand High Fidelity<sup>PLUS</sup> von Roche (5 U/µl) zum Einsatz. Diese besteht laut Herstellerangaben aus taq-Polymerase und einem »neuen thermostabilen Proofreading-Enzym ohne Polymerase-Aktivität«. Die PCR wurde durchgeführt wie in Abschnitt A.2.2.4 auf S. 18 beschrieben, mit dem Unterschied, dass relativ wenige Zyklen, meist 30, gewählt wurden, um die Fehlerrate weiter zu minimieren. Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes wurde nur bezüglich der Primer gemäß der Empfehlung des Herstellers auf 300 nM final verändert.

### **Nested PCR**

Eine »nested PCR« wurde durchgeführt, falls nach einer PCR noch kein klonierbares PCR-Produkt bezüglich Menge und Artefaktkontamination erzielt werden konnte. Dabei wurde das PCR-Produkt einer ersten PCR verdünnt als Template für eine weitere PCR verwendet, bei der ein zweites Primerpaar weiter innen auf dem selben Gen als das erste eingesetzt wurde. Dadurch konnte die

## B.2 Methoden für die Klonierung und heterologe Expression

Spezifität und Sensitivität deutlich erhöht werden. Diese Technik wurde bei der Klonierung der *LAR2* sowohl für die Fragmente als auch für das 5'-RACE eingesetzt.

### Kolonie-PCR

Zum Testen von *E. coli*-Kolonien auf das Vorhandensein eines Inserts gewünschter Länge oder dessen Orientierung in einem Plasmid nach einer Transformation wurde die Kolonie-PCR eingesetzt. Eingesetzt wurden dabei *E. coli*-Zellen, die durch Hitzebehandlung (95 °C, 2 min) zu Beginn der PCR lysiert wurden, wodurch die enthaltenen Plasmide als Template-DNA freigesetzt wurden. Für den pYes-Vektor wurden die Plasmid-Primer pYes-for 5'-CCCGGATCGGACTACTAGCAG-3' und pYes-rev 5'-GACCGAGGAGAGGGTTAGGGAT-3' verwendet, in Kombination mit einem genspezifischem Primer konnte zusätzlich die für die spätere Expression wichtige Insert-Orientierung geprüft werden. Die Plasmid-Primer für den pCR-Vektor waren TOPO-for 5'-AGCTCGGATCCACTAGTAACG-3' und TOPO-rev 5'-CCTCTAGATGCATGCTCGAG-3'.

### B.2.1.5 Ligation und Transformation

#### Ligation in Vektoren

Das TOPO-TA Cloning<sup>®</sup> Kit (Invitrogen) wurde für die Klonierung von PCR-Produkten verwendet. Das Kit enthält linearisierte Vektoren mit T-Überhängen, an denen Topoisomerase kovalent gebunden war. Dadurch konnte die Ligation durch einfache Inkubation bei Raumtemperatur erfolgen, jedoch musste das PCR-Produkt dazu einen A-Überhang besitzen, was durch die terminale Transferase-Aktivität der taq-Polymerase erreicht wurde. Konkret wurden 0,5 µl Vektor, 0,5 µl Salt-Solution (1,2 M NaCl, 0,06 M MgCl<sub>2</sub>) und 2 µl PCR-Produkt gemischt und bei Raumtemperatur 15 min inkubiert.

Zwei Vektoren mit unterschiedlichen Verwendungszwecken kamen zum Einsatz. Der Vektor pCR<sup>®</sup> 2.1-TOPO<sup>®</sup> wurde für die Klonierung und anschließende Sequenzierung von cDNA-Fragmenten eingesetzt. Er besitzt eine Resistenz für die Antibiotika Kanamycin und Ampicillin und mit X-Gal und IPTG im Medium kann eine blau-weiß-Selektion durchgeführt werden. Der Vektor pYES2.1/V5-His-TOPO<sup>®</sup> dagegen wurde für die Klonierung und anschließende heterologe Expression in Hefen von cDNAs mit vollständigem codierendem Bereich benutzt. Er enthält eine Ampicillin-Resistenz für die *E. coli*-Selektion sowie einen Galaktose-induzierbaren Hefe-Promoter.

### Transformation

Für die Transformation von *E. coli* wurden chemisch kompetente Zellen (TOP 10 OneShot<sup>®</sup> oder TOP 10 F' von Invitrogen, bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert) auf Eis aufgetaut und vorsichtig 2  $\mu\text{l}$  der TOPO-Klonierungsreaktion untergemischt. Die Zellen wurden 5–30 min auf Eis inkubiert, dann erfolgte ein Hitzeschock (30 s bei  $42^{\circ}\text{C}$ ) und die Zellen wurden sofort auf Eis abgekühlt. Nach der unmittelbaren Zugabe von 250  $\mu\text{l}$  SOC-Medium wurden die transformierten Zellen 60 min bei  $37^{\circ}\text{C}$  geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen auf Platten mit LB-Medium mit geeignetem Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert.

Nach der Identifikation der Kolonien mit dem gewünschten Plasmidinsert durch Kolonie-PCR wurde die Plasmid-DNA aus 3 ml Suspension einer Übernachtskultur isoliert. Dazu wurde das E.Z.N.A.<sup>®</sup> Plasmid Miniprep Kit I von peqlab nach Anleitung des Herstellers verwendet. Außerdem wurden von den Kolonien Dauerkulturen angelegt, indem Glycerin und Medium mit frisch angezogenen Bakterien zu gleichen Teilen gemischt und in flüssigem Stickstoff eingefroren wurden. Die Dauerkulturen wurden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert und Aliquots konnten bei Bedarf auf frischen Platten ausgestrichen und kultiviert werden.

### Medien für die *E. coli* Transformation

#### LB-Medium

Das LB-Medium wurde für die Anzucht und Selektion von *E. coli* verwendet.

- 1 % Trypton oder Pepton
- 0,5 % Hefeextrakt
- 1 % NaCl
- 1,5 % Agar (nur für Platten)

Das Medium wurde mit NaOH auf einen pH von 7,0 eingestellt und autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf höchstens  $50^{\circ}\text{C}$  wurden für die Antibiotika-Selektion 50 mg Kanamycin oder 100 mg Ampicillin pro Liter Medium zugegeben. Für die blau-weiß-Selektion auf entsprechenden Platten wurden zusätzlich 20 mg/l X-Gal (in Dimethyl-Formamid gelöst) und 24 mg/l IPTG benötigt.

#### SOC-Medium

Das SOC-Medium, in dem die frisch transformierten Zellen regenerieren und die Antibiotikum-Resistenz ausprägen, wurde mit den kompetenten Zellen mitgeliefert.

### B.2.1.6 Sequenzierung und Sequenzanalyse

Die Sequenzierung der Plasmide erfolgte durch die Firma MWG-Biotech mit den Primern T7 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' und pYes-rev (siehe Abschnitt B.2.1.4 auf S. 31) für den Vektor pYes sowie den Primern m13uni(-21) 5'-TGTAACGACGCGCCAGT-3' und m13rev(-29) 5'-CAGGAAACAGCT-ATGACC-3' für den Vektor pCR. Für Fragmente im pCR-Vektor, die kleiner als etwa 600 bp waren, wurde nur eine Sequenzierung durchgeführt, bei allen anderen sowie bei uneindeutigen Sequenzen wurde beidsträngig sequenziert. Beim Expressionsklon der *PAL*-cDNA wurden zusätzlich Sequenzierungen mit den Primern 5'-GAGATTTGATGGCAGTCCATTG-3' und 5'-GCAAGCATG-GAGTGATGTTGTG-3' durchgeführt, da diese cDNA über 2000 bp lang ist.

Das Programm Chromas 2.23<sup>2</sup> wurde für die Analyse der Sequenzier-Chromatogramme, zur Entfernung von Vektorsequenzen und den Export der Sequenzen im FASTA-Format verwendet. Anschließend wurde eine BlastN-Suche<sup>3</sup> in der Datenbank veröffentlichter Sequenzen, GenBank, durchgeführt. Für Alignments, die Translation in Aminosäuresequenzen und das Zusammenfügen von Sequenzteilen wurde GeneDoc 2.6<sup>4</sup> eingesetzt.

## B.2.2 Methoden für die heterologe Expression in Hefe

### B.2.2.1 Expressionsvektor und Hefetransformation

Für die Transformation von *Saccharomyces cerevisiae* mit den pYes-Vektor-Konstrukten wurde das *S. c.* EasyComp™ Transformations Kit (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers verwendet. Der Uracil-auxotrophe Hefestamm INVSc-1 (Invitrogen) wurde nach der Transformation auf Platten mit SGI-Medium (Ura<sup>-</sup>) kultiviert. Nur mit pYes-Vektor transformierte und dadurch Uracil-prototrophe Hefezellen können auf diesem Medium wachsen. Wie bereits bei den *E. coli*-Transformationen beschrieben (siehe Abschnitt B.2.1.5 auf S. 31) wurde auch von den Hefelinien Dauerkulturen angelegt.

### B.2.2.2 Expression und Enzymextraktion

Die heterologe Expression der Plasmidinserts in den Hefezellen wurde durch die Zugabe von Galaktose zum Medium induziert. Die anschließende Enzymextraktion erfolgte durch einen Aufschluss der Hefezellen mit Glasperlen nach Pompon

---

<sup>2</sup> *Chromas*. URL: <http://www.technelysium.com.au>

<sup>3</sup> *Basic Local Alignment Search Tool*. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

<sup>4</sup> *GeneDoc*. URL: <http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/index.html>

## B.2 Methoden für die Klonierung und heterologe Expression

et al. [107]. Die verwendeten Medien und Puffer sind im Abschnitt B.2.2.3 aufgeführt.

### **Anzucht und Induktion der Expression**

Transformierte Hefezellen wurden auf SGI-Platten ausgestrichen und zwei bis drei Tage bei 28 °C inkubiert. Als Starterkultur wurde je eine Kolonie in 25 ml SGI-Medium im Erlenmeyer-Kolben angeimpft und 24 h bei 28 °C auf einem Schüttler inkubiert, bis zu einer OD<sub>600</sub> (optische Dichte bei 600 nm) der 1:10 verdünnten Starterkultur von 0,2–0,4. Danach wurden für die Hauptkultur 250 ml YPGE-Medium mit der Starterkultur auf eine OD<sub>600</sub> von ca. 0,2 angeimpft. Die Hauptkultur wurde bei 28 °C und 120 rpm inkubiert. Beim Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,8–1,2 etwa 6 h später erfolgte die Induktion mit 27 ml steriler Galaktose-Lösung (200 g/l). Nach einer weiteren Inkubation bei 28 °C und 120 rpm für 12–15 h wurden die Zellen gleich (ohne Einfrieren) geerntet. Die OD<sub>600</sub> der 1:10 verdünnten Kultur sollte zu diesem Zeitpunkt 0,6–1,2 betragen.

### **Zellaufschluss**

Für den Zellaufschluss wurden die Hefezellen zunächst pelletiert und in 27 ml TEK-Puffer resuspendiert. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Hefen wiederum bei 4 °C pelletiert. Das Zellpellet wurde vollständig in 2,5 ml kaltem TES-B\*-Puffer resuspendiert und mit 10 g Glasperlen versetzt. 25 min lang wurden die Proben dann abwechselnd 30 s kräftig geschüttelt und 30 s auf Eis gekühlt. Im Lichtmikroskop wurde anschließend geprüft, ob die Mehrzahl der Zellen aufgebrochen war.

### **Präparation löslicher Enzyme**

Für die Präparation löslicher Enzyme wurden die mit Glasperlen aufgeschlossenen Zellen mit 5 ml TES-B\*-Puffer versetzt und kurz zentrifugiert. Der Überstand ohne Glasperlen wurde dann 10 min bei 24 000 g zentrifugiert. Dieser Überstand wurde entweder direkt oder mit 20 % Glycerin versetzt aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zum Test der Enzyme bei –80 °C gelagert.

## **B.2.2.3 Puffer und Medien für die Hefeexpression**

### **SGI-Medium**

Das SGI-Medium wurde für die Anzucht der transformierten Hefezellen verwendet.

- 0,1 % Pepton
- 0,67 % Yeast Nitrogen Base without Aminoacids
- 20 mg/l L-Tryptophan

## B.2 Methoden für die Klonierung und heterologe Expression

Diese Komponenten wurden mit H<sub>2</sub>O auf 900 ml aufgefüllt und autoklaviert. 20 g Glucose in 100 ml H<sub>2</sub>O wurde separat autoklaviert und die beiden Lösungen anschließend steril vereinigt.

### YPGE-Medium

In YPGE-Medium erfolgte die Hauptkultur der Hefen und die Induktion der Hefeexpression.

- 0,5 % Glucose
- 1 % Pepton
- 1 % Hefeextrakt

Diese Komponenten wurden mit H<sub>2</sub>O auf 970 ml aufgefüllt und autoklaviert. Danach wurde 3 Vol% EtOH (30 ml) dazugegeben.

### TEK-Puffer

Der Puffer TEK wurde beim Zellaufschluss der Hefekulturen verwendet.

- 50 mM Tris/HCl, pH 7,4
- 1 mM EDTA
- 100 mM KCl

### TES-B\*-Puffer

Für den Zellaufschluss und für die Präparation löslicher Enzyme wurde der Puffer TES-B\* eingesetzt.

- 50 mM Tris/HCl, pH 7,4
- 1 mM EDTA
- 0,6 M Sorbitol
- 2 mM DTT (1,4-Dithiothreitol)

## B.2.3 Nachweis der Enzymaktivität und Substratspezifität

Der Nachweis der Aktivität der heterolog exprimierten Enzyme erfolgte wie im Abschnitt A.2.3.2 auf S. 20 beschrieben. Meistens wurde die Enzymreaktion mit mehreren möglichen Substraten getestet. Die Identifikation der Substrate und Produkte erfolgte über Co-Chromatographie mit Standardsubstanzen und über ihre R<sub>f</sub>-Werte (siehe Tab. E.2 auf S. 125 im Anhang).

### Hefe-Enzymextrakt einer leeren pYes-Vektorlinie

Als Negativkontrolle für die Ermittlung der heterologen Enzymaktivitäten wurde Hefe-Enzymextrakt einer leeren pYes-Vektorlinie verwendet. Dazu wurde die Expression und Enzymextraktion wie beschrieben (Abschnitt B.2.2.2 auf S. 33) parallel mit insertlosen pYes-Transformanten durchgeführt, um nur die von

## *B.2 Methoden für die Klonierung und heterologe Expression*

der Hefe selbst exprimierten Enzyme zu erhalten. Damit konnte jeweils gezeigt werden, dass die beobachtete Enzymreaktion tatsächlich die des Proteins der eingefügten cDNA darstellt und nicht die eines Hefeenzym.

### **PAL-Enzymnachweis**

Zusätzlich zum im Abschnitt A.2.3.2 auf S. 20 beschriebenen PAL-Test mit  $^{14}\text{C}$ -markiertem Phenylalanin wurde auch ein photometrischer PAL-Enzymtest durchgeführt [7, 33]. Dazu wurde 10  $\mu\text{l}$  Enzymlösung mit 0,1 M Tris/HCl, pH 8,8, und 5 mM Phenylalanin in einem Gesamtvolumen von 1 ml getestet. Nach einer Inkubation von 0 min, 60 min und 120 min bei 35 °C wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von 0,1 Vol Essigsäure abgestoppt. Die Proben wurden dann 1:5 verdünnt bei 200–320 nm im Photometer gemessen. Zusätzlich wurden Phenylalanin und Zimtsäure als Referenzsubstanzen gemessen.

### **Optimum von pH-Wert und Temperatur**

Bei ANR und LAR wurde das Optimum von pH-Wert und Temperatur für die Enzymtests bestimmt. Dazu wurde bei der LAR jeweils die für die Herstellung des eigentlichen Substrats notwendige DFR bei gleicher Temperatur bzw. bei gleichem pH-Wert (mit 50 mM Tris-Puffer) 30 min lang inkubiert. Erst dann wurde die LAR zugegeben und die Reaktionsmischung bei der zu testenden Temperatur inkubiert, bzw. 100 mM Tris-Puffer mit verschiedenen pH-Werten zugegeben.

Bei der Bestimmung des Temperatur-Optimums der ANR wurde eine Vorinkubation von 90 s von Puffer und Enzym bei der entsprechenden Temperatur durchgeführt und dann erst das Substrat zugegeben, damit nicht der Umsatz nur während der Aufwärmphase eine Aktivität bei der Endtemperatur vortäuscht. Die war notwendig, weil aufgrund der Ergebnisse bei anderen Pflanzen [108] ein relativ hohes Temperaturoptimum vermutet wurde und Temperaturen bis 60 °C getestet wurden.

## B.3 Ergebnisse und Diskussion – Klonierungen und heterologe Expression

Eine Übersicht über alle klonierten Sequenzen findet sich in Tab. E.1 auf S. 124 im Anhang.

### B.3.1 Klonierungen von Genen für Schlüsselenzyme der Phenylpropanoidbiosynthese

#### B.3.1.1 Phenylalanin-Ammonia-Lyase

Der vollständige kodierende Bereich (2133 bp, 710 AS) einer Phenylalanin-Ammonia-Lyase wurde aus Blättern der Sorte ‘Spätburgunder’ kloniert (EF192469). Die Primer für diese Klonierung wurden aus einem Alignment mehrerer in GenBank veröffentlichter *Vitis*-Sequenzen abgeleitet. Bei diesen handelte es sich um Sequenzen aus genomischer DNA der Sorte ‘Cabernet Sauvignon’ (AB015870, AB015871) oder um mRNA-Fragmente des codierenden Bereichs aus der Sorte ‘Lambrusco Foglia Frastagliata’ (X75967).

Verglichen mit den Sequenzen AB015870 und X75967 ist die aus ‘Spätburgunder’ klonierte *PAL*-Sequenz diesen sehr ähnlich, sowohl auf Nukleotid- als auch auf Aminosäure-Ebene sind diese Sequenzen zu 99 % identisch. Im Unterschied dazu steht die genomische Sequenz AB015871. Durch eine Änderung in der Intronsequenz und dadurch alternatives Spleißing ist der kodierende Bereich dieser Sequenz um 330 bp oder 110 AS kürzer als bei den anderen Sequenzen, was immerhin 15 % der Gesamtlänge ausmacht. Ob das daraus resultierende Protein eine aktive PAL ist, ist nicht bekannt.

Der Nachweis der Enzymaktivität des heterolog exprimierten PAL-Enzyms aus *Vitis* erfolgte durch einen photometrischen Enzymtest, bei dem durch die unterschiedlichen Absorptionsspektren des Substrats Phenylalanin und des Produkts Zimtsäure die Umwandlung durch die Enzymreaktion beobachtet werden kann (Abb. B.1 auf S. 38). Ein isobestischer Punkt konnte mangels Schnittpunkt der beiden Absorptionsspektren in der im Test verwendeten



### B.3 Ergebnisse und Diskussion – Klonierungen und heterologe Expression

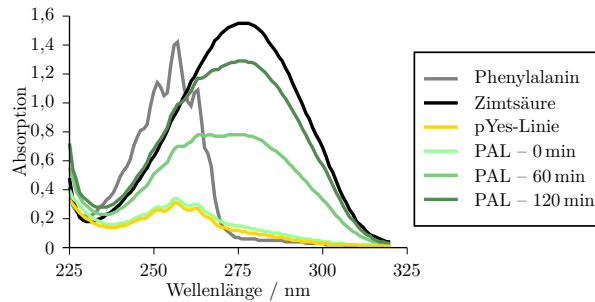


Abbildung B.1: Heterologe Expression der PAL aus *Vitis*: Aktivitätsnachweis mit photometrischem Enzymtest. Phenylalanin- und Zimtsäure-Standard. pYes-Linie: Hefe-Enzymextrakt einer leeren pYes-Vektorlinie. Reaktionsansätze mit heterolog exprimierter PAL aus *Vitis* nach verschiedenen Inkubationszeiten, PAL - 0 min entspricht Phenylalanin in der im Test verwendeten Konzentration.

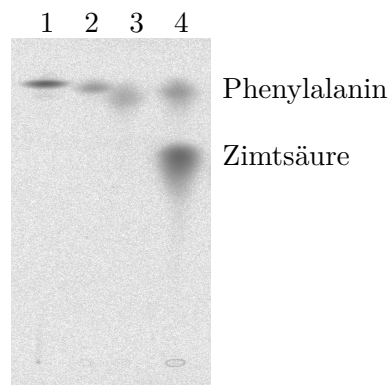


Abbildung B.2: Heterologe Expression der PAL aus *Vitis*: Aktivitätsnachweis mit  $^{14}\text{C}$ -Phenylalanin als Substrat. 1: Phenylalanin-Standard, 2: PAL-Reaktionsansatz ohne Enzym, 3: mit Hefe-Enzymextrakt einer leeren pYes-Vektorlinie, 4: mit heterolog exprimierter PAL aus *Vitis*. Laufmittel: 6% Essigsäure.

Konzentration nicht beobachtet werden. Zusätzlich wurde ein Enzymtest mit  $^{14}\text{C}$ -Phenylalanin als Substrat durchgeführt (Abb. B.2 auf S. 38), wobei die entstandene Zimtsäure durch Co-Chromatographie mit authentischer Zimtsäure identifiziert wurde, welche unter UV-Licht sichtbar ist (nicht dargestellt).

Soweit bekannt, ist dies die erste vollständig klonierte und auf Funktion geprüfte PAL aus *Vitis*. Zuvor waren nur Fragmente oder genomische Sequenzen veröffentlicht worden. Bei der PAL handelt es sich um eine größere Genfamilie mit 15–20 Kopien [132].

### B.3.1.2 Stilbensynthese

Der vollständige codierende Bereich (1179 bp, 392 AS) einer STS konnte aus Blättern der Sorte ‘Spätburgunder’ kloniert werden. Die Sequenz wurde unter der Nummer EF192465 in GenBank veröffentlicht. Die für die Klonierung verwendeten Primer wurden aus einem Alignment mehrerer STS-Sequenzen aus GenBank abgeleitet. Dabei handelte es sich um mRNA-Sequenzen der *Vitis vinifera* Sorten ‘Lambrusco Foglia Frastagliata’ (X76892) und ‘Optima’ (S63221, S63225, S63227) sowie eine genomische DNA-Sequenz dieser Sorte (AB046375). Zusätzlich wurden genomische Sequenzen aus *V. riparia* (AB046373), *V. labrusca* (AB046374) und *V. aestivalis* (AY059639, AF418567, AF418566) verwendet.

Die aus ‘Spätburgunder’ klonierte STS-cDNA ist mit diesen Sequenzen, unabhängig von den Arten aus denen sie stammen, zu 91 %–99 % identisch, die der Aminosäuresequenz zu 94 %–98 %. Darüber hinaus ist auch die Ähnlichkeit zu CHS-Sequenzen aus Wein mit etwa 70 % identischen Nukleotiden und etwa 75 % identischen Aminosäuren sehr hoch.

Der Nachweis der Enzymaktivität des in Hefe heterolog exprimierten STS-Enzyms erfolgte mit  $^{14}\text{C}$ -Malonyl-CoA und p-Cumaroyl-CoA als Substrat. Das Produkt der Enzymreaktion wurde durch Co-Chromatographie mit RES in drei verschiedenen Laufmitteln und die blaue Fluoreszenz des RES unter UV-Licht identifiziert (Abb. B.3 auf S. 40). Auch mit Kaffeoyl-CoA als Starter-CoA bildet die *Vitis*-STS ein Produkt (Abb. B.6 auf S. 44), bei dem es sich wahrscheinlich um 3,4,3',5'-Tetrahydroxystilben (Synonym: Astringinin, Piceatannol) handelt [125], das auch natürlicherweise in *Vitis* vorkommt [95].

### Nebenprodukte

Bei der STS-Reaktion entstehen neben trans-RES auch einige Nebenprodukte (siehe Abb. B.3 auf S. 40), die je nach Laufmittel unterschiedlich deutlich sichtbar sind. Anhand der Co-Chromatographie mit authentischem RES wurde eines der Nebenprodukte als cis-RES identifiziert. Dies bildet sich unter UV-Licht und bei hohem pH-Wert durch Isomerisierung aus trans-RES [102].

### B.3 Ergebnisse und Diskussion – Klonierungen und heterologe Expression

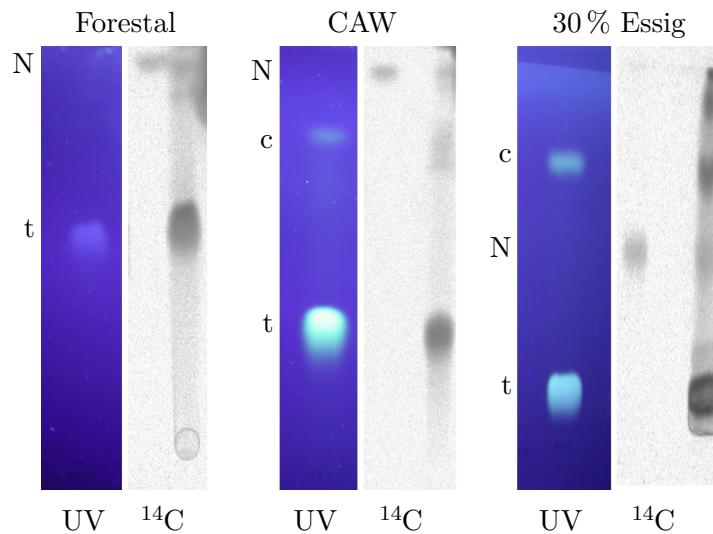


Abbildung B.3: Heterologe Expression der STS aus *Vitis*: Identifikation des Produkts Resveratrol in verschiedenen Laufmitteln (Forestal, CAW, 30% Essigsäure), jeweils unter UV-Licht und Autoradiographie mit  $^{14}\text{C}$ -NAR und STS-Enzymreaktion. t: trans-RES, c: cis-RES, N: NAR.

Neben cis-RES ist als Nebenprodukt der STS-Reaktion eine weitere Substanz sichtbar, die sich bei der Chromatographie wie NAR verhält, bzw. bei Kaffeyl-CoA als Substrat wie ERI (Abb. B.6 auf S. 44). Die Identität von NAR wurde bestätigt, indem die Produkte eines kombinierten STS-CHI-Enzymtests als Substrate für eine FHT-Enzymreaktion verwendet wurden. Dabei war eine deutliche Abnahme des Nebenprodukts NAR und damit eine Umsetzung durch die FHT zu beobachten (ohne Abbildung). Insbesondere in bakteriellen Expressionssystemen [136] wurde bereits festgestellt, dass als Nebenprodukt der STS 1%–4% Naringenin, sowie Intermediate nach zwei oder drei Kondensationen entstehen [158]. Darüber hinaus kann, wie bei der Stilbencarboxylat-Synthese [42], die Decarboxylierung ausbleiben. Dies ist besonders interessant, da vermutet wird, dass sich die STS aus der CHS entwickelt hat. Eine mögliche Erklärung ist eine Flexibilität der Konformation am aktiven Zentrum, die bei nicht optimalen Reaktions- und Expressionsbedingungen eine Nebenaktivität sichtbar werden lässt. Zudem sind Fehlfaltungen und unnatürliche Konformationen durch das heterologe Expressionssystem denkbar [158].

#### Hemmung und Induktion der STS

Bei einigen der durchgeführten Versuche wurden Weinpflanzen mit dem Wachstumsregulator Prohexadion-Ca (ProCa) behandelt (siehe Abschnitt C.3.2 auf

### B.3 Ergebnisse und Diskussion – Klonierungen und heterologe Expression

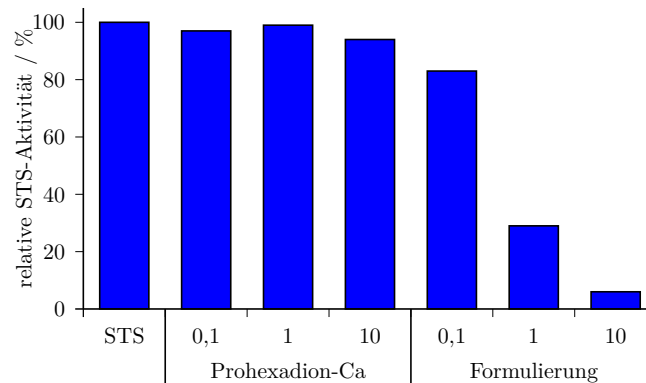


Abbildung B.4: Wirkung von ProCa und ProCa-Formulierung auf die Aktivität einer heterolog exprimierten STS aus *Vitis*. 0,1, 1, 10: Vielfaches der für die Pflanzenbehandlung verwendeten Konzentration.

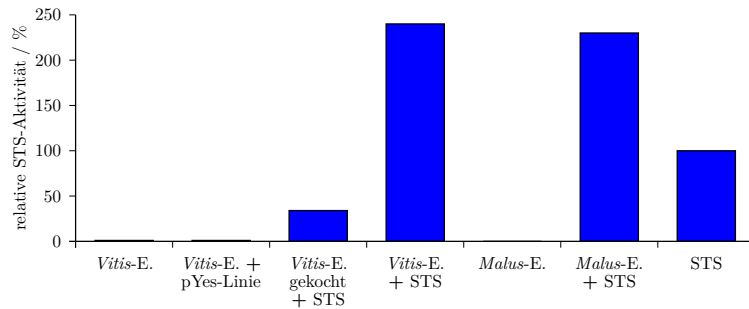
S. 72). Da beim Versuch P1 durch einige Behandlungen zwar eine deutliche Induktion der *STS*-Expression, aber kein signifikanter Einfluss auf die *STS*-Enzymaktivität beobachtet werden konnte (siehe Abschnitt C.4.3 auf S. 85), wurde ein möglicher Einfluss des Wirkstoffs oder der Formulierung auf die Enzymaktivität der heterolog exprimierten *STS* geprüft.

Dazu wurde zu einem Enzymtest der heterolog exprimierten *STS* aus *Vitis* der reine Wirkstoff ProCa oder die Formulierung ohne Wirkstoff in verschiedenen Konzentrationen zugegeben. ProCa selbst beeinflusste die Enzymaktivität der *STS* nicht, die Formulierung jedoch hatte vor allem bei höheren Konzentrationen einen deutlich hemmenden Einfluss (Abb. B.4).

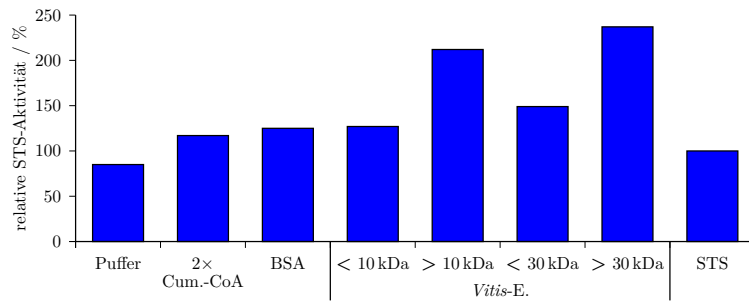
Zusätzlich wurde getestet, ob weitere Inhaltsstoffe in Enzymextrakten von *Vitis*-Pflanzenmaterial die Aktivität der heterolog exprimierten *STS* beeinflussen. Die Zugabe von verschiedenen Enzymextrakten aus *Vitis*-Blättern oder -Früchten, aber auch aus *Malus*-Früchten, führte reproduzierbar zu einer deutlichen Erhöhung des Umsatzes der heterolog exprimierten *STS* aus *Vitis* (Abb. B.5 auf S. 42). Die Zugabe von Proteinen (BSA), des Aufarbeitungspuffers des Pflanzenenzym oder mehr Substrat p-Cumaroyl-CoA führten nicht zu diesem Effekt, abgekochtes Pflanzenenzym hemmte die heterolog exprimierte *STS* eher. Durch die Zugabe von nach Größe getrenntem Enzym aus *Vitis*-Blättern (»Vivaspin 500«-Säulchen 10 kDa und 30 kDa) wurde festgestellt, dass der aktivierende Bestandteil größer als 30 kDa ist.

Möglicherweise treten *in vivo* bei der *STS* posttranslationale Proteinmodifikationen auf, etwa durch Phosphatasen, die im Hefeexpressionssystem nicht möglich sind. Durch Tassoni et al. [140] wurden vier Isoformen gleichen Mo-

B.3 Ergebnisse und Diskussion – Klonierungen und heterologe Expression



(a) *Vitis*-E.: Enzymextrakt aus Weinblättern; pYes-Linie: Hefe-Enzymextrakt einer leeren pYes-Vektorlinie; *Malus*-E.: Enzymextrakt aus jungen Apfelfrüchten.



(b) Puffer: Extraktionspuffer für die Aufarbeitung der Enzymextrakte aus Pflanzenmaterial; 2x Cum-CoA: doppelte Menge p-Cumaroyl-CoA. *Vitis*-E.: Enzymextrakt aus Weinblättern, nach Größe gereinigt (»Vivaspin 500«-Säulchen)

Abbildung B.5: Wirkung von verschiedenen Zusätzen auf die Aktivität einer heterolog exprimierten STS aus *Vitis*, jeweils in Prozent der Aktivität heterolog exprimierter STS ohne Zusätze.

lekulargewichts der STS gefunden, die sich in ihrem isoelektrischen Punkt unterscheiden. Dies wurde auf posttranslationale Modifikationen zurückgeführt, aber nicht näher untersucht.

### B.3.1.3 Chalkonsynthase

Zur Klonierung des vollständigen codierenden Bereichs (1182 bp, 393 AS) einer *CHS* wurden Blätter der Sorte ‘Spätburgunder’ verwendet. Die Sequenz wurde unter der Nummer EF192464 in GenBank veröffentlicht. Die Primer wurden aus drei genomischen DNA-Sequenzen der Sorte ‘Cabernet Sauvignon’ (AB015872, AB066275, AB066274) sowie zwei mRNA-Sequenzen (X75969, AF020709) abgeleitet.

Die aus ‘Spätburgunder’ klonierte *CHS*-cDNA ist mit diesen Sequenzen zu 91 %–99 % identisch, die der Aminosäuresequenz zu 94 %–99 %. Darüber hinaus ist auch die Ähnlichkeit zu *STS*-Sequenzen aus Wein mit etwa 71 % identischen Nukleotiden und etwa 75 % identischen Aminosäuren sehr hoch.

Die Enzymaktivität des heterolog exprimierten CHS-Enzyms wurde mit <sup>14</sup>C-Malonyl-CoA und p-Cumaroyl-CoA bzw. Kaffeoyl-CoA als Substrat nachgewiesen (Abb. B.6 auf S. 44). Die dabei entstandenen Produkte Naringenin bzw. Eriodictyol wurden durch Co-Chromatographie identifiziert.

## B.3.2 Klonierung zweier Dioxygenasen der Flavonoidbiosynthese

Die nachfolgend beschriebenen Klonierungen der *FHT* und *ANS* aus *Vitis* wurden bei einem im Rahmen dieser Arbeit betreuten Forschungspraktikum durchgeführt (Herold, 2006).

### B.3.2.1 Flavanon 3 $\beta$ -Hydroxylase

Der vollständige codierende Bereich (1092 bp, 363 AS) einer *FHT* wurde aus Blättern der Sorte ‘Regent’ kloniert (EF192467). Die Primer wurden von der mRNA-Sequenz der Sorte ‘Lambrusco Foglia Frastagliata’ (X75965) abgeleitet.

Die aus ‘Regent’ klonierte Nukleotidsequenz der *FHT* ist bis auf drei Austausch und zwei Regionen mit insgesamt drei deletierten Basen mit der in GenBank vorhandenen Sequenz identisch. Die Aminosäuresequenz weist allerdings zwischen den beiden Deletionen eine partielle Verschiebung des Leserahmens und dadurch elf veränderte Aminosäuren auf, so dass die beiden Aminosäuresequenzen nur zu 96 % identisch sind.

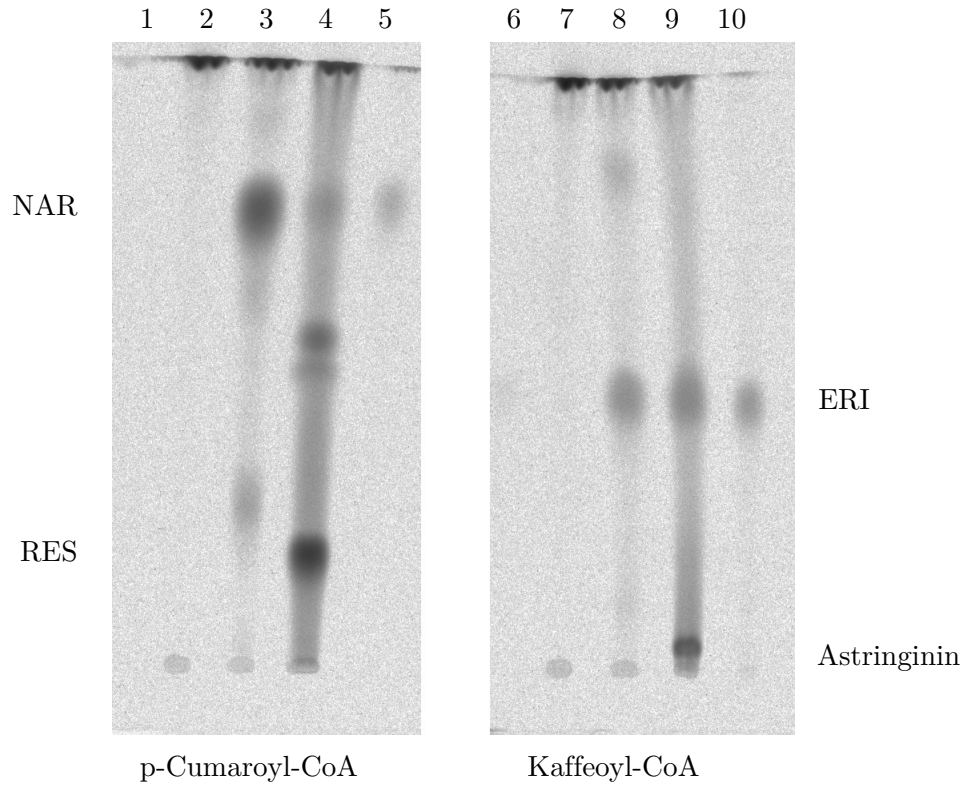


Abbildung B.6: Heterologe Expression der CHS und STS aus *Vitis*: Aktivitätsnachweis mit p-Cumaroyl-CoA (1–4) und Kaffeoyl-CoA (6–9) als Substrat. 1 und 6: Reaktionsansatz ohne Enzym, 2 und 7: mit Hefe-Enzymextrakt einer leeren pYes-Vektorlinie, 3 und 8: mit heterolog exprimierter CHS aus *Vitis*, 4 und 9: mit heterolog exprimierter STS aus *Vitis*. 5:  $^{14}\text{C}$ -NAR, 10:  $^{14}\text{C}$ -ERI. Laufmittel: CAW

### B.3 Ergebnisse und Diskussion – Klonierungen und heterologe Expression

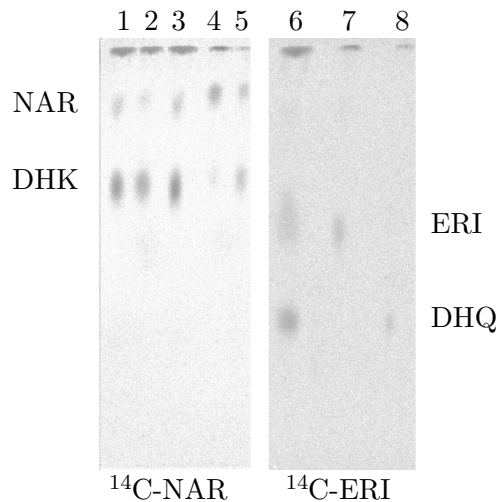


Abbildung B.7: Heterologe Expression der FHT aus *Vitis*: Aktivitätsnachweis mit  $^{14}\text{C}$ -NAR (1–3: drei parallele *Vitis-FHT*-Klone) und  $^{14}\text{C}$ -ERI (6) als Substrat. 4:  $^{14}\text{C}$ -NAR, 5:  $^{14}\text{C}$ -DHK, 7:  $^{14}\text{C}$ -ERI, 8:  $^{14}\text{C}$ -DHQ

Das heterolog in Hefe exprimierte *FHT*-Enzym zeigt sowohl mit  $^{14}\text{C}$ -Naringenin als auch mit  $^{14}\text{C}$ -Eriodictyol als Substrat einen Umsatz zu den entsprechenden Dihydroflavonolen DHK bzw. DHQ (Abb. B.7). Die Produkte wurden jeweils durch Co-Chromatographie identifiziert.

Obwohl die vollständige cDNA-Sequenz einer *FHT* aus *Vitis* bereits veröffentlicht wurde [132], ist dies, soweit bekannt, die erste *Vitis-FHT*, deren Funktion in einem heterologen Enzymtest nachgewiesen wurde.

#### B.3.2.2 Anthocyanidinsynthase

Aus Blättern der Sorte ‘Regent’ wurde der vollständige kodierende Bereich (1068 bp, 355 AS) einer *ANS* kloniert (EF192468). Die verwendeten Primer wurden aus einer mRNA-Sequenz der Sorte ‘Lambrusco Foglia Frastagliata’ (X75966) und einer genomischen DNA-Sequenz (AB073018) der Sorte ‘Kyoho’, einer Kreuzung aus *V. labrusca*  $\times$  *V. vinifera*, abgeleitet.

Der kodierende Bereich der Nukleotidsequenz aus ‘Regent’ ist zu der aus ‘Kyoho’ bis auf zwei Austausch identisch, die Aminosäuresequenz ist vollständig identisch. Im Vergleich zur Sequenz X75966 ist zwar ebenfalls nur ein Nukleotid ausgetauscht, jedoch tritt eine Deletion von zwölf Basenpaaren sowie kurz vor dem Ende des kodierenden Bereichs eine weitere Deletion von zwei Basenpaaren auf. Nach dieser zweiten Deletion sind die restlichen 40 Aminosäuren durch die



B.3 Ergebnisse und Diskussion – Klonierungen und heterologe Expression

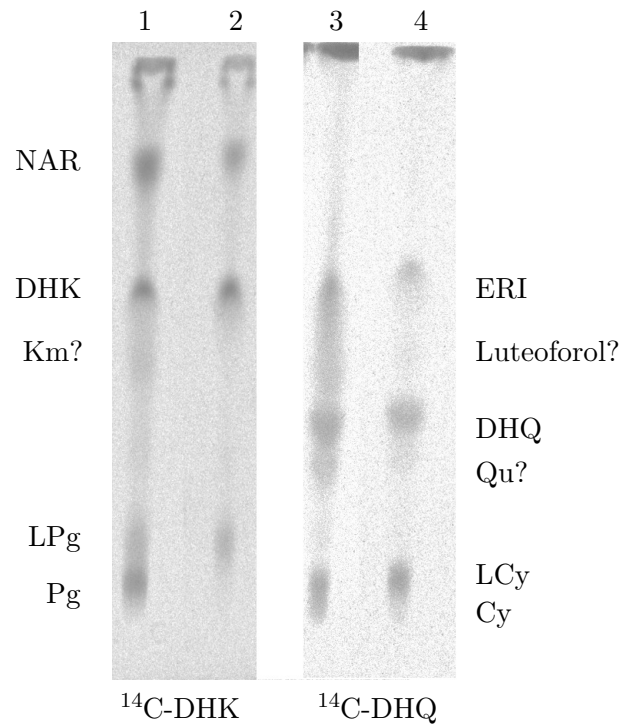


Abbildung B.8: Heterologe Expression der ANS aus *Vitis*: Aktivitätsnachweis mit vorgeschalteter DFR und  $^{14}\text{C-DHK}$  und  $^{14}\text{C-DHQ}$  als Substrat. 1–2: Substrat  $^{14}\text{C-DHK}$ , 1: DFR und heterolog exprimierte ANS aus *Vitis*, 2: nur DFR. 3–4: Substrat  $^{14}\text{C-DHQ}$ , 3: DFR und heterolog exprimierte ANS aus *Vitis*, 4: nur DFR.

Verschiebung des Leserahmens komplett abweichend.

Für den Aktivitätsnachweis des heterolog exprimierten ANS-Enzyms wurden die als Substrat benötigten Leukoanthocyanidine während des Enzymtests durch eine vorgeschaltete DFR-Reaktion aus  $^{14}\text{C}$ -Dihydroflavonolen hergestellt. Sowohl mit Leukocyanidin als auch mit Leukopelargonidin (LPg) als Substrat ist ein Umsatz durch die *Vitis*-ANS zu Cyanidin bzw. Pelargonidin sichtbar (Abb. B.8 auf S. 46). Die Produkte wurden durch Co-Chromatographie mit authentischen Standardsubstanzen identifiziert (nicht dargestellt).

Neben den erwarteten (Zwischen-)Produkten (LPg und Pg bzw. LCy und Cy) und Substratresten (NAR und DHK bzw. ERI und DHQ) sind bei der Dünnschichtchromatographie weitere Banden erkennbar, die nicht eindeutig identifiziert werden konnten. Zum einen könnte es sich dabei um Luteoforol handeln, welches durch die FNR-Aktivität (Flavanon 4-Reduktase) der DFR aus ERI entstehen kann. ERI war als Rest aus der Substratsynthese im Substrat DHQ vorhanden. Zum anderen entstehen möglicherweise Km bzw. Qu direkt durch die ANS aus DHK bzw. DHQ. Es wurde beschrieben, dass die ANS bei *in vitro*-Tests aus Leukoanthocyanidinen nicht nur Anthocyanidine, sondern auch Dihydroflavonole und Flavonole, sowie Flavonole aus Dihydroflavonolen synthetisiert [147]. Die ANS besitzt also auch eine FLS-Aktivität. Des Weiteren kann, zumindest bei *Gerbera*-ANS, auch Cat als Substrat für die Bildung von Cy dienen, insbesondere in Anwesenheit eines UFGT-Enzyms [150].

Bei der ANS handelt es sich bei *Vitis* um ein *single copy* Gen [132].

Es wurden bereits vollständige Sequenzen (cDNA, genomisch) einer ANS aus *Vitis* veröffentlicht [83, 132], jedoch ist dies, soweit bekannt, die erste *Vitis*-ANS, deren Funktion in einem heterologen Enzymtest nachgewiesen wurde.

### B.3.3 Klonierung von Reduktasen der Flavanolbiosynthese

Die Ergebnisse der Klonierung von Leukoanthocyanidinreduktase und Anthocyanidinreduktase wurden bereits veröffentlicht [105].

#### B.3.3.1 Anthocyanidinreduktase

Der vollständige codierende Bereich einer ANR (1017 bp, 338 AS) konnte aus Blättern der *Vitis*-Sorte ‘Spätburgunder’ kloniert werden (DQ129684). Die verwendeten Primer wurden abgeleitet von einer in GenBank verfügbaren Sequenz (BN000166), die ihrerseits aus vorhandenen EST-Sequenzen von Blättern der Sorte ‘Chardonnay’ zusammengesetzt ist. Beide Sequenzen stellten sich nach

B.3 Ergebnisse und Diskussion – Klonierungen und heterologe Expression

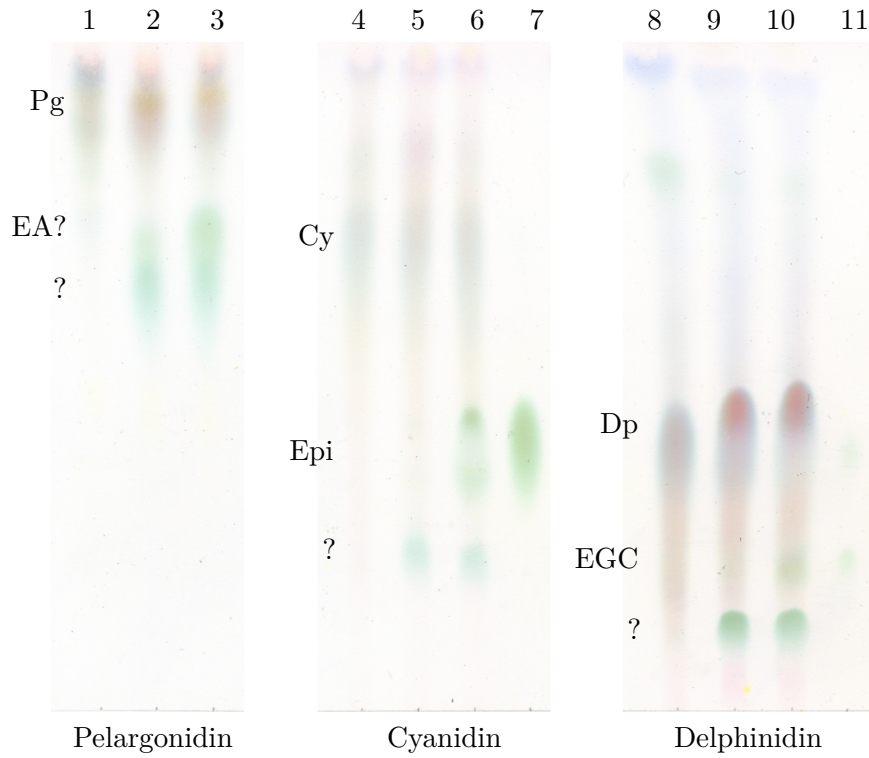


Abbildung B.9: Heterologe Expression der ANR aus *Vitis*: Aktivitätsnachweis mit Anthocyanidin-Substraten. Substrate Pg (1–3), Cy (4–6) und Dp (8–10). Bei jedem Substrat jeweils ein Reaktionsansatz ohne Enzym (1, 4, 8), einer mit Hefe-Enzymextrakt einer leeren pYes-Vektorlinie (2, 5, 9) und einer mit heterolog exprimierter ANR aus *Vitis* (3, 6, 10). Laufmittel BAW. 7: Epicatechin-Standard, 11: Epigallocatechin-Standard, EA=Epiafzelechin.

B.3 Ergebnisse und Diskussion – Klonierungen und heterologe Expression

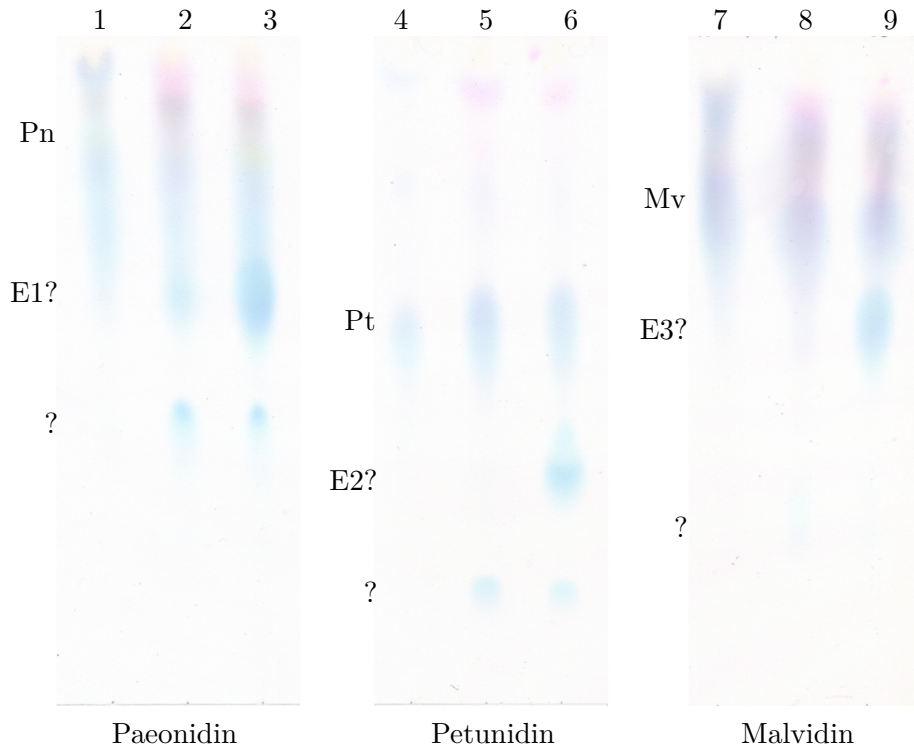


Abbildung B.10: Heterologe Expression der ANR aus *Vitis*: Aktivitätsnachweis mit methylierten Anthocyanidin-Substraten. Substrate Pn (1–3), Pt (4–6) und Mv (7–9). Bei jedem Substrat jeweils ein Reaktionsansatz ohne Enzym (1, 4, 7), einer mit Hefe-Enzymextrakt einer leeren pYes-Vektorlinie (2, 5, 8) und einer mit heterolog exprimierter ANR aus *Vitis* (3, 6, 9). Laufmittel BAW. E1: 3'-methyl-Epicatechin, E2: 3'-methyl-Epigallocatechin, E3: 3',5'-dimethyl-Epigallocatechin.

der Klonierung als komplett identisch auf Nukleotidebene heraus. Auch eine zwischenzeitlich veröffentlichte genomische *ANR*-Sequenz der Sorte ‘Cabernet Sauvignon’ ist im kodierenden Bereich mit nur einem Aminosäure- und zwei Nukleotid-Austauschen stark konserviert. Bei der *ANR* handelt es sich bei *Vitis* um ein *single copy* Gen [18, 54].

Mit Cyanidin als Substrat wurde für das rekombinante *ANR*-Enzym ein Temperaturoptimum von 45°C und ein pH-Optimum von 5,5 ermittelt. Die Aktivität wurde bei diesen optimalen Bedingungen mit den Anthocyanidin-Substraten Pg, Cy und Dp (Abb. B.9 auf S. 48) sowie mit den methylierten Anthocyanidinen Pn, Pt und Mv (Abb. B.10 auf S. 49) getestet. Bei allen diesen Substraten kann ein Umsatz zu den entsprechenden Epicatechinen festgestellt werden, wobei nur (–)-Epicatechin und (–)-Epigallocatechin (EGC) als authentische Standards zur Verfügung standen und somit eindeutig identifiziert werden konnten. Ebenfalls bei allen Substraten war sowohl mit der heterolog exprimierten *ANR* aus *Vitis* als auch mit dem zur Kontrolle verwendeten Hefe-Enzymextrakt einer leeren pYes-Vektorlinie eine Reaktion zu einem anderen Produkt zu sehen, das jedoch nicht identifiziert werden konnte. Möglicherweise handelt es sich dabei um Ent-Catechine ((–)-Catechine), wie sie auch durch Xie et al. [157] beobachtet wurden.

Das ungewöhnlich hohe Temperaturoptimum der heterolog exprimierten *Vitis*-*ANR* wurde bei allen bisher heterolog exprimierten *ANR*-Enzymen festgestellt: *Medicago* 45°C [155], *Arabidopsis* 55°C [155], Tee 50°C [108]. Bis auf die *ANR* aus *Arabidopsis*, deren pH-Optimum mit 8,0 im schwach basischen Bereich ist [155], haben alle diese *ANR*-Enzyme wie das aus *Vitis* ein schwach saures pH-Optimum von etwa 5,5 [108, 155].

### B.3.3.2 Leukoanthocyanidinreduktase

Zu Beginn der Arbeiten war noch keine DNA- oder mRNA-Sequenz der *LAR* aus *Vitis* veröffentlicht. Daher wurden durch eine BlastN-Suche mit einer bekannten *LAR*-Sequenz aus *Desmodium* (AJ550154) einige homologe EST-Sequenzen aus verschiedenen *Vitis*-Arten ermittelt. Die Sequenz der *LAR1* konnte vollständig aus diesen ESTs zusammengesetzt werden, der vollständige kodierende Bereich (1041 bp, 346 AS) wurde dann aus Blättern der Sorte ‘Regent’ amplifiziert (DQ129685). Von der Sequenz einer weiteren *LAR*, *LAR2*, war nur das 3'-Ende als EST verfügbar, das 5'-Ende wurde mit Hilfe des Generacer-Protokolls amplifiziert. Anschließend wurde auch der vollständige kodierende Bereich (1089 bp, 362 AS) der *LAR2* aus Blättern der Sorte ‘Regent’ amplifiziert (DQ129686).

Seither wurden aus Früchten der Sorte ‘Shiraz’ ebenfalls *LAR*-Sequenzen

B.3 Ergebnisse und Diskussion – Klonierungen und heterologe Expression

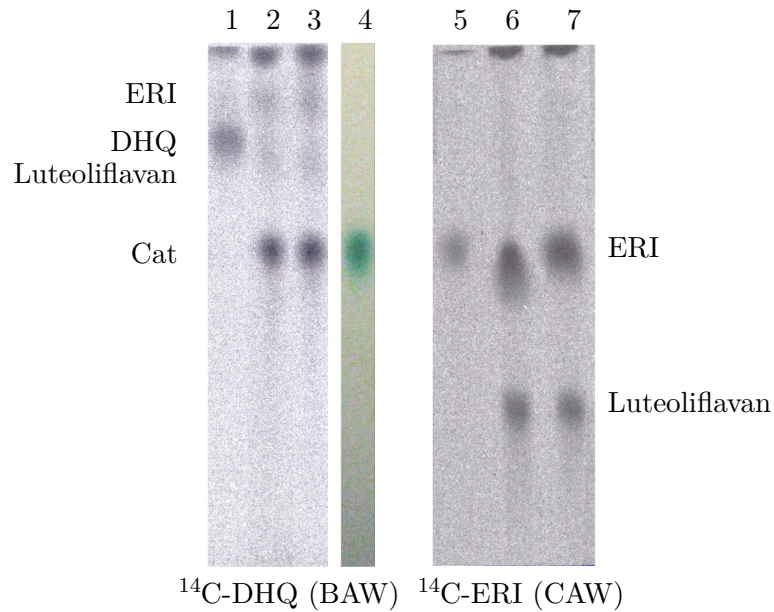


Abbildung B.11: Heterologe Expression der LAR aus *Vitis*: Aktivitätsnachweis mit vorgeschalteter DFR/FNR und mit  $^{14}\text{C-DHQ}$  (1–4, Laufmittel BAW) und  $^{14}\text{C-ERI}$  (5–7, Laufmittel CAW) als Substrat. Jeweils DFR und heterolog exprimierte LAR1 aus *Vitis* (2 und 6), DFR und heterolog exprimierte LAR2 aus *Vitis* (3 und 7). 1:  $^{14}\text{C-DHQ}$  mit Spuren von  $^{14}\text{C-ERI}$ , 4: Cat (DMAZA), 5:  $^{14}\text{C-ERI}$ .

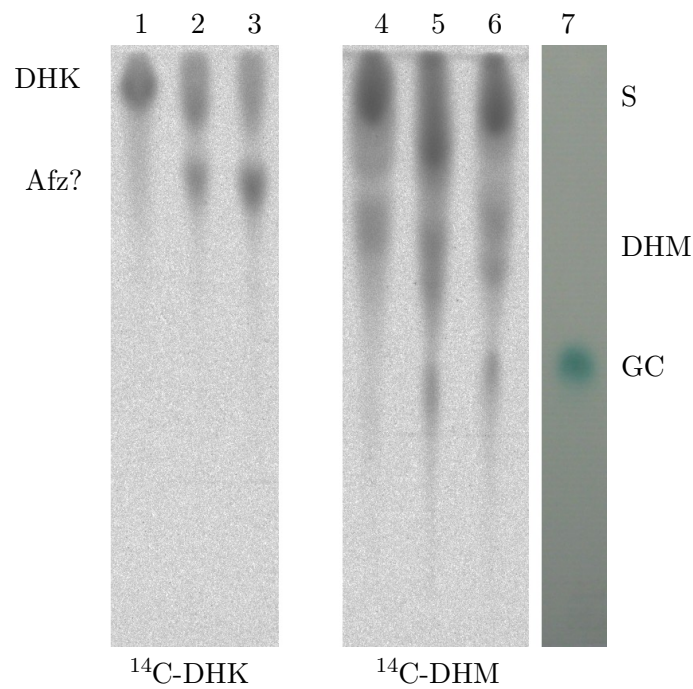


Abbildung B.12: Heterologe Expression der LAR aus *Vitis*: Aktivitätsnachweis mit vorgeschalteter DFR und mit  $^{14}\text{C}$ -DHK und  $^{14}\text{C}$ -DHM als Substrat. Laufmittel BAW. 1–3: Substrat  $^{14}\text{C}$ -DHK (mit Resten von NAR); 4–6: Substrat  $^{14}\text{C}$ -DHM (mit Resten von NAR, DHK). Jeweils nur DFR (1 und 4), DFR und heterolog exprimierte LAR1 aus *Vitis* (2 und 5), DFR und heterolog exprimierte LAR2 aus *Vitis* (3 und 6). 7: GC (DMAZA), Afz: Afzelechin, S: Reste aus der Substratsynthese.

veröffentlicht [18]. Eine der beiden *LAR1*-Sequenzen (AJ865335) ist komplett, die andere (AJ865336) zu 99 % identisch zu der aus ‘Regent’ klonierten Sequenz. Auch die *LAR2*-Sequenz (AJ865334) ist auf Nukleotid- sowie Aminosäurenebene zu 99 % identisch mit der *LAR2* aus Blättern der Sorte ‘Regent’. Der Unterschied zwischen *LAR1* und *LAR2* aus *Vitis* dagegen ist relativ groß, sie sind nur zu 67 % (Nukleotide) bzw. 60 % (Aminosäuren) identisch.

Der Nachweis der Enzymaktivität der beiden heterolog in Hefe exprimierten LAR-Enzyme erfolgte mit einem kombinierten DFR-LAR-Enzymtest. Dabei wurde während des Enzymtests mit Hilfe einer ebenfalls heterolog exprimierten DFR aus  $^{14}\text{C}$ -Dihydroflavonolen Leukoanthocyanidine synthetisiert, die dann der LAR als Substrat zur Verfügung standen. Sowohl *LAR1* als auch *LAR2* hatten mit Leukocyanidin als Substrat ein flaches Temperaturoptimum zwischen 30 °C und 37 °C und ein pH-Optimum von 6,5. Beide Enzyme setzten sowohl Leukopelargonidin als auch Leukocyanidin und Leukodelphinidin zu den entsprechenden Catechinen um (Abb. B.11 auf S. 51 und Abb. B.12 auf S. 52), wobei nur (+)-Catechin und (+)-Gallocatechin (GC) als Referenzsubstanzen zur co-chromatographischen Identifizierung der Produkte verfügbar waren.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die heterologe LAR aus *Vitis* auch Luteoforol zu Luteoliflavan umsetzen kann (Abb. B.11 auf S. 51). Luteoforol entsteht durch die FNR-Aktivität der DFR aus ERI. Die geschieht *in vivo* bei der Akkumulation von ERI durch die Wirkung von Prohexadion-Ca (siehe Abschnitt C.1.2 auf S. 59). Neben der Aufklärung dieses Schritts der ProCa-Wirkung ist dies wichtig für die Untersuchung des Reaktionsmechanismus, da hiermit gezeigt werden konnte, dass die OH-Gruppe an Position 3 für den Mechanismus nicht notwendig ist [105].

Die ähnlichen enzymatischen Eigenschaften der beiden LAR-Enzyme stehen im Gegensatz zu ihren relativ großen Unterschieden auf Sequenzebene.

### B.3.4 Schlussfolgerungen

Die Funktion wichtiger Gene der Phenylpropanoidbiosynthese wurde verifiziert und ihre Substratspezifitäten analysiert. Dies war für Expressionsanalysen, wie sie im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, wichtig, um nur die Expression physiologisch relevanter, funktionaler Gene zu messen. Bei einigen Genen war zudem bislang keine vollständige cDNA-Sequenz aus *Vitis* veröffentlicht: Bei der *PAL* waren nur cDNA-Fragmente und eine vollständige genomische DNA-Sequenz vorhanden, bei der *FHT* und der *ANS* nur ungetestete, aber vollständige cDNA-Sequenzen, bei der *ANR* nur eine aus ESTs zusammengesetzte putative Sequenz und bei der *LAR* lediglich EST-Sequenzen.



Generell existieren in GenBank zwar sehr viele Sequenzen von Flavonoid-Genen, viele davon sind jedoch nicht durch heterologe Expression oder Mutanten in ihrer Funktion bestätigt. Vor allem bei den Polyketidsynthasen gibt es mehrere Beispiele dafür, dass für Sequenzen, die aufgrund ihrer hohen Homologie (>90%) als *CHS* bezeichnet worden waren, später eine andere Funktion nachgewiesen wurde, z. B. die Pyronsynthase bei *Gerbera* [43]. Auch der Austausch nur weniger Aminosäuren kann zu einem Funktionsverlust führen, wie z. B. bei einer *CHS*-ähnlichen, aber *CHS*-inaktiven Sequenz der Himbeere, die sich nur durch den Austausch zweier Aminosäuren von einer funktionalen *CHS* dieser Pflanze unterschied [160]. Im Fall der Flavonoid-3'- und -3',5'-Hydroxylasen innerhalb der Familie Asteraceae ist die sichere Zuordnung zu einer dieser beiden verwandten Enzymaktivitäten selbst durch phylogenetische Analysen nicht möglich [129].

In dieser Arbeit wurden die vollständigen cDNAs der Gene für die Schlüsselenzyme PAL, STS und CHS, die beiden 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen FHT und ANS, sowie die beiden Gene für die Reduktasen der Flavanolsynthese, LAR und ANR, kloniert. Sie alle wurden in Hefezellen heterolog exprimiert und ihre Funktion bestätigt.

Über die korrekte Identifizierung hinaus ist es nun möglich, mit Hilfe dieser funktional bestätigten Sequenzen nicht-anonyme molekulare Marker für Gene der Polyphenolbiosynthese für die Weinrebe zu entwickeln. Es gibt beispielsweise bereits molekulare Marker auf Basis der *CHS* und *STS* (5'-nichttranslatierter Bereich) von *Vitis* [46].

Aus praktischen Gründen war die Verfügbarkeit einer heterolog exprimierten PAL und STS nützlich für die Etablierung von entsprechenden Enzymtests, sowie im Fall der STS für die Herstellung von <sup>14</sup>C-RES als Vergleichssubstanz für die Co-Chromatographie bei Enzymtests mit Enzymextrakten der Versuchspflanzen. Alle heterolog exprimierten Flavonoidgene aus *Vitis* konnten zudem bei den Enzymtests der Versuchsreihen als Positivkontrolle eingesetzt werden.

Alle untersuchten heterolog exprimierten Enzyme hatten eine geringe Substratspezifität bezüglich der B-Ring-Hydroxylierung, die ANR akzeptierte sogar methylierte Anthocyanidin-Substrate. Jedoch kommen in *Vitis*, außer bei den Flavonolen, keine einfach hydroxylierten Flavonoide vor. Die Steuerung der Flavonoidbiosynthese zu bestimmten Endprodukten erfolgt also wahrscheinlich nicht in erster Linie über unterschiedliche Substratspezifitäten, sondern über unterschiedlich starke Enzymaktivitäten vorgelagerter Enzyme, insbesondere der F3'H und F3'5'H, und damit über die Substratverfügbarkeit, sowie eventuell über den Mechanismus der Produkthemmung.

**Teil C**

**Induktion der  
Phenylpropanoidbiosynthese**

## C.1 Einleitung – Resistenzinduktion

### C.1.1 Induzierbare Resistenz bei Pflanzen

Pflanzen besitzen verschiedene Mechanismen, um Infektionen durch pilzliche und bakterielle Schaderreger abzuwehren. Es gibt präformierte Abwehrsubstanzen, die konstitutiv vorhanden sind und deren Biosynthese zum Teil durch Stress erhöht werden kann, wie beispielsweise Proanthocyanidine in jungen Weinbeeren [122]. Die induzierte Resistenz dagegen wird erst durch einen Primärbefall mit Schaderregern oder durch die Applikation bestimmter natürlicher oder synthetischer Stoffe erworben und wirkt in der Regel unspezifisch gegen nachfolgende Infektionen. Substanzen, die die induzierte Resistenz auslösen, werden Elicitoren genannt. Diese werden von pathogenen Organismen, z. B. als Bestandteile ihrer Zellwand, produziert und dienen Pflanzenzellen als Signale für biotischen Stress. Sie werden durch Rezeptoren erkannt, wodurch eine ganze Reihe Prozesse in Gang gesetzt wird, die zur Produktion von antimikrobiellen Enzymen (PR-Proteinen), z. B. Chitinasen und  $\beta$ -1,3-Glucanasen, sowie Phytoalexinen führen. Phytoalexine sind induzierbare antibiotische Sekundärmetaboliten mit niedrigem Molekulargewicht.

Generell besteht eine Konkurrenzsituation zwischen Wachstum, also dem Primärmetabolismus, und der Parasitenabwehr, also dem Sekundärmetabolismus. Die Verfügbarkeit von Kohlenstoff und Energie ist begrenzt, deshalb werden bei eingeschränktem Wachstum, z. B. durch geringe Stickstoff-Verfügbarkeit, mehr Abwehrstoffe gebildet als bei uneingeschränktem Wachstum. Die Anwesenheit oder Neusynthese von Abwehrstoffen bedeutet allerdings nicht zwingend, dass die Pflanze nicht von Pathogenen infiziert wird, da viele Mikroorganismen Phytoalexine abbauen können oder sogar die Expression von Genen für die Phytoalexinbiosynthese hemmen. Deshalb ist für eine tatsächliche Resistenz oft eine schnelle und starke Reaktion der Pflanze wichtig (Review in [144]).

In der Familie Vitaceae kommen als Phytoalexine vor allem Stilbene vor, meist als trans-Resveratrol und dessen Oligomere (Viniferine) [77]. Auf genetischer Ebene wurde gezeigt, dass ein *Quantitative Trait Locus* (QTL) für die Resveratrol-Produktion mit QTLs für die Resistenz gegen Mehltau und Schwarzfäule assoziiert ist [111].

Die Induktion der *STS*-Expression und damit der Phytoalexin-Synthese bei

## C.1 Einleitung – Resistenzinduktion

*Vitis* kann durch abiotische Faktoren erfolgen, z. B. Ethylen, Ozon [64],  $\text{AlCl}_3$  [3] oder UV-Strahlung [4, 12, 29]. Auch die biotische Induktion der Expression der *STS* und weiterer Gene des Phenylpropanoid-Stoffwechsels wurde bei *Vitis* schon vielfach nachgewiesen. Als Induktoren wurden beispielsweise durch Autoklavieren abgetötete *Botrytis*-Kulturen [110], Pilz-Zellwände von *Phytophthora cambivora* [93] oder lebende *Pseudomonas*-Kulturen und Hefeextrakt [28] verwendet. Es wurde gezeigt, dass ein Zusammenhang zwischen der Resveratrol-Produktion verschiedener Sorten nach Induktion (UV-Bestrahlung) und ihrer Pathogenresistenz (*Botrytis*) besteht [121].

Diese Erkenntnisse führten schon mehrfach zu Versuchen, andere Pflanzen durch die Übertragung eines *STS*-Gens gegen Pathogene resistent zu machen. Eine *Vitis-STS* führte mit Pathogen-induzierbaren Promotoren bei Weizen [130] und Reis [134] zu erhöhter Resistenz gegen Pathogene dieser Pflanzen. Bei Tomate wurde eine Resistenz gegen *Pseudomonas*, nicht aber gegen *Botrytis* und *Alternaria* erreicht [143]. Bei Kiwi konnte mit einem konstitutiven Promotor zwar Resveratrol, allerdings keine *Botrytis*-Resistenz beobachtet werden [82]. Bei Tabak [48] wurde männliche Sterilität und verminderte Blütenfärbung durch eine konstitutive *STS* beobachtet, wahrscheinlich durch die Konkurrenz mit der *CHS* und damit der Flavonoidbiosynthese um das gemeinsame Substrat p-Cumaroyl-CoA. In mit *Vitis-STS* transformierten *Malus*-Pflanzen [137] wird das entstandene Resveratrol durch *Malus*-eigene Enzyme zu Piceid glykosyliert [116].

### C.1.2 Resistenzinduktoren

Um die induzierbare Resistenz als Schutz vor pilzlichen oder bakteriellen Infektionen zu nutzen, wurden verschiedene Präparate entwickelt, die meist vorbeugend auf die Pflanzen ausgebracht werden und dort natürliche Abwehrmechanismen aktivieren. In dieser Arbeit wurden die beiden Pflanzenstärkungsmittel Milsana und Myco-Sin, der Extrakt eines Epiphyten und der Wachstumsregulator Prohexadion-Ca eingesetzt und ihre Wirkung auf die Genexpression und Enzymaktivität von *Vitis* untersucht.

#### **Extrakt eines Epiphyten (*Aureobasidium*)**

Präparate auf der Basis von Mikroorganismen sind durch mehrere mögliche Wirkmechanismen für den biologischen Pflanzenschutz interessant. Einige Bakterien- oder Pilzstämme können durch schnelle Wundbesiedlung, Nährstoffkonkurrenz oder die Produktion antimikrobieller Metaboliten eine Infektion der Pflanze mit Pathogenen verhindern. Andere können in der Pflanze als Resistenzinduktoren wirken (Review in [45]).

## C.1 Einleitung – Resistenzinduktion

Bei Versuchen am Fachgebiet für Obstbau der TU-München [115] wurde festgestellt, dass der Extrakt eines auf Apfel epiphytischen Hefestammes (laut DNA-Analyse *Aureobasidium pullulans*, ein Basidiomycet) eine Anreicherung von Stilbenen in Weinkallus bewirkt. In dieser Arbeit wurden diese Ergebnisse mit enzymologischen und molekularbiologischen Methoden überprüft und die Wirkung einer Behandlung mit *Aureobasidium*-Extrakt auf weitere Gewebe von *Vitis* untersucht.

### Milsana

Das Pflanzenstärkungsmittel Milsana<sup>®</sup> flüssig (BBA Nr. LS 5019-00) ist ein Extrakt aus dem Sachalin-Staudenknöterich (*Reynoutria sachalinensis*) und soll nach Angaben des Herstellers die Vitalität von Pflanzen steigern und Pilzkrankheiten vorbeugen. Das Produkt wurde durch die Dr. Schaette AG, Bad Waldsee, entwickelt und wird von der Firma Biofa<sup>1</sup>, Münsingen, vertrieben.

Der aktive Inhaltsstoff von *Reynoutria*-Extrakt wurde als Physcion(-1-*O*- $\beta$ -Glykosid), ein Anthrachinon, identifiziert [57]. Physcion selbst ist nicht fungitoxisch, die Wirkung von Milsana beruht also auf der systemischen Induktion pflanzlicher Resistenzmechanismen. Lediglich sehr hohe, in der Praxis nicht erreichte, Extrakt-Konzentrationen führen bei *Botrytis* zu vermindertem Myzelwachstum und eingeschränkter Keimung [70].

Bei Gurken beispielsweise führt Milsana zur Bildung von phenolischen Verbindungen mit antifungaler Wirkung [32], zu einer erhöhten Flavonoidbiosynthese [52] und zu höheren Aktivitäten von antifungalen Enzymen (Chitinasen, Glucanasen, Peroxidasen) [70, 124] und vermindert so die Infektion mit Echtem Mehltau. Milsana wirkte bei mehrjährigen Versuchen gegen Echten Mehltau an Weinreben so effektiv wie oder besser als Schwefel [123].

### Myco-Sin

Bei dem Pflanzenstärkungsmittel Myco-Sin<sup>®</sup> (BBA Nr. LS 4997-0) handelt es sich um eine Mischung aus Tonerde, Schachtelhalmextrakt, Silikaten und Hefezellwandbestandteilen. Auch Myco-Sin wurde von der Dr. Schaette AG, Bad Waldsee, entwickelt und wird von Biofa<sup>2</sup>, Münsingen, vertrieben. Zum Vergleich mit der Wirkung des *Aureobasidium*-Extrakts wurde auch der Hefebestandteil von Myco-Sin getestet, dieser wurde freundlicherweise von der Firma Schaette separat zur Verfügung gestellt.

Die Resistenzinduktion von Myco-Sin wird verschiedenen Inhaltsstoffen zugeschrieben, z. B. den Al-Ionen der Tonerde [76] oder dem Gesteinsmehl [159].

Gegen Falschen Mehltau an Weinreben wurde in mehrjährigen Versuchen

---

<sup>1</sup> *Milsana*. URL: <http://www.biofa-farming.de/produkte/content.php?ex=pro&sid=1>

<sup>2</sup> *Myco-Sin*. URL: <http://www.biofa-farming.de/produkte/content.php?ex=pro&sid=8>

## C.1 Einleitung – Resistenzinduktion

eine ebenso gute Wirkung von Myco-Sin wie durch eine Kupferbehandlung festgestellt [123]. Myco-Sin wird auch im ökologischen Obstanbau als eines der effektivsten biologischen Präparate zur Feuerbrandbekämpfung eingesetzt [159].

### Prohexadion-Ca

Der Wachstumsregulator Prohexadion-Ca (ProCa, BASF), der in Deutschland unter dem Handelsnamen Regalis<sup>®</sup>, in den USA Apogee<sup>®</sup>, vertrieben wird, wurde zur Regulation des Längenwachstums von Kulturpflanzen entwickelt. Durch die Strukturähnlichkeit von ProCa und 2-Oxoglutarat wird eine Dioxygenase der Gibberellinsäurebiosynthese in ihrer Aktivität gehemmt. Aber auch die 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen der Flavonoidbiosynthese wie FHT, FLS und ANS werden beeinflusst. Dadurch akkumuliert bei der Behandlung von Apfelbäumen mit ProCa das Flavanon Eriodictyol, welches teilweise glykosyliert wird und teilweise durch die FNR-Aktivität der *Malus*-DFR in das Flavan 4-ol Luteoforol umgewandelt wird [51, 112]. Luteoforol vermindert durch seine auch in geringen Konzentrationen starke antimikrobielle Wirkung die Anfälligkeit der Apfelbäume gegen Schorf und Feuerbrand [66]. In den Pflanzen ist die Konzentration von Luteoforol allerdings relativ gering, da es durch die Aktivität der LAR zu Luteoliflavan umgesetzt wird [105] (siehe auch Abschnitt B.3.3.2 auf S. 50). Es wird vermutet, dass Luteoliflavan als Insektendeterrent wirkt [15].

In dieser Arbeit wird untersucht, ob die Wirkung von ProCa durch die gleichzeitige Behandlung mit einem Resistenzinduktor (Milsana, Myco-Sin), der die allgemeine Flavonoidbiosynthese erhöht, verstärkt werden kann.

### C.1.3 Weinrebe und *Botrytis*

Als Beispiel für ein wichtiges Pathogen der Weinrebe dient in dieser Arbeit der Grauschimmel, *Botrytis cinerea*. Dieser fakultative Endoparasit ist in Europa endemisch und weder wirts- noch stadienspezifisch [74].

#### Schadbild

*Botrytis* kann alle oberirdischen Pflanzenteile befallen. Auf der Oberfläche der Pflanzen ist bei fortgeschrittener Infektion das charakteristische Myzel mit zahlreichen Konidienträgern zu sehen, die befallenen Pflanzenteile sterben in der Folge ab.

Die Konidien keimen bereits nach 2 h mit tropfbar flüssigem Wasser. Es bilden sich nacheinander Keimschläuche, Appressorien und Infektionshyphen. Das Myzel löst dann enzymatisch die Mittellamellen der Pflanzen auf, wodurch das Gewebe in Einzelzellen zerfällt, die absterben und braun werden. Bei feuchtem

## C.1 Einleitung – Resistenzinduktion

Wetter entstehen schnell zahlreiche Konidienträger. Die Überwinterung erfolgt entweder in Form von Sklerotien im einjährigen Holz oder als Myzel in der Rinde oder in abgestorbenen Pflanzenresten auf dem Boden [74].

Zu wirtschaftlichen Schäden führt *Botrytis* durch die Behinderung der Verwachsung bei der Rebveredlung und vor allem durch die Infektion der Trauben. Dabei unterscheidet man je nach Zeitpunkt der Infektion verschiedene Arten des Befalls. Der Gescheinsbefall, ausgehend von saprophytischen Infektionen der Blütenrückstände und abgestorbener Fruchtknoten, kann zum Absterben von Blütenständen führen. Als Sauerfäule bezeichnet man Infektionen grüner Beeren, die vor allem in Folge von Verletzungen durch Hagel oder Sauerwurmbefall entstehen. Dies kann zu empfindlichen Ertragsverlusten führen. Bei der Stielfäule werden die Beerenstiele reifender Trauben infiziert und zersetzt, wodurch die kompletten Trauben zu Boden fallen. Je nach Reifegrad kann eine Verwendung zur Weinbereitung noch möglich sein.

Eine Besonderheit ist die »Edelfäule«, also lesereife Trauben mit *Botrytis*-Befall, die zur Gewinnung hochwertiger Spitzenweine (»Beerenauslesen«) genutzt werden. Die Infektion führt, auch durch die Perforation der Beerenhaut, zu einer erhöhten Verdunstung. Obwohl Zucker und Säuren durch *Botrytis* abgebaut werden, werden die restlichen Inhaltsstoffe durch den Wasserverlust stark konzentriert. Darüber hinaus wird der Geschmack durch neu entstehende Substanzen wie Glyzerin und Essigsäure, sowie durch pilzliche Laccasen beeinflusst [31, 74].

### **Bekämpfung**

Zur Vorbeugung gegen *Botrytis*-Infektionen sind, neben dem Anbau resistenter Sorten, alle Maßnahmen geeignet, die eine rasche Abtrocknung der Pflanzen fördern, z. B. ein die Durchlüftung fördernder Erziehungsschnitt, Unkrautbekämpfung und harmonische Düngung [74, 76]. Die Bekämpfung mit chemischen Pflanzenschutzmitteln wird zunehmend schwierig, da gegen häufig verwendete Fungizide resistente *Botrytis*-Stämme, auch solche mit multiplen Resistenzen, entstanden sind [44]. Für die biologische Bekämpfung durch Resistenzinduktoren (z. B. Salicylsäure, Jasmonsäure, Extrakte von Pflanzen oder Pilzen) oder mikrobielle Antagonisten (z. B. *Bacillus subtilis*, *Trichoderma atroviride*) gibt es vielversprechende Ansätze, die jedoch häufig unter Freilandbedingungen wenig wirksam sind (Review in [45]).

### **Abwehrreaktionen der Pflanze**

Auf eine Infektion mit *Botrytis* folgen in Weinpflanzen allgemeine Resistenzantworten wie die Ablagerung von neuem Zellwandmaterial, das Ausschütten von reaktiven Sauerstoffspezies und teilweise lokaler hypersensitiver Zelltod.

### C.1 Einleitung – Resistenzinduktion

Außerdem werden PR-Proteine und Phytoalexine gebildet [16, 37]

Die wichtigsten Phytoalexine in *Vitis* sind die Stilbene Resveratrol, Piceid, Pterostilben und  $\epsilon$ -Viniferin [77]. Sie hemmen das Myzelwachstum und die Konidienkeimung von *Botrytis* [5]. Während der Fruchtreifung sinkt sowohl die Resveratrol-Konzentration, als auch die Induzierbarkeit der Stilbensynthase [125], weshalb reife Beeren empfindlicher für eine *Botrytis*-Infektion werden.

Bei nichtletalen Konzentrationen von Resveratrol ist *Botrytis* in der Lage Stilbene oxidativ abzubauen [6]. Dies geschieht durch eine Laccase [104], die aus Resveratrol ein trans-Dehydrodimer bildet [24, 25]. Die Pathogenität von *Botrytis*-Stämmen an *Vitis* ist abhängig von ihrer Laccaseaktivität, und damit ihrer Fähigkeit, Stilbene (Resveratrol und Pterostilben) abzubauen [120].

Proanthocyanidine spielen ebenfalls eine Rolle beim Schutz vor *Botrytis*-Infektionen in jungen Weinbeeren. Resistente Sorten haben mehr polymere Proanthocyanidine und einen höheren Polymerisierungsgrad als anfällige [103]. Es wird angenommen, dass Proanthocyanidine auf zur Infektion notwendige *Botrytis*-Enzyme inhibierend wirken, z. B. auf lytische Enzyme oder Stilbenoxidasen [59, 122].



## C.2 Methoden zur Analyse der Induktion

### C.2.1 Quantitative PCR zur Genexpressionsanalyse

#### C.2.1.1 RNA-Extraktion und reverse Transkription

Für die Analyse der Genexpression wurden die RNA-Extraktionsmethoden (siehe Abschnitt A.2.2.2 auf S. 17) für die verwendeten Pflanzenorgane optimiert. Die RNA-Extraktion aus Blättern und Früchten wurde mit dem Concert™ Plant RNA Reagent von Invitrogen durchgeführt. Dabei wurde für Laubblätter 50 mg und für Früchte 50–100 mg Pflanzenmaterial verwendet. Kallus-Proben wurden mit dem RNeasy® Plant Mini Kit von Qiagen extrahiert, wobei in Abwandlung des Standardprotokolls 200 mg Pflanzenmaterial verwendet wurde und vor der Elution eine fünfminütige Inkubation des Wassers auf der Zentrifugensäule erfolgte, um die Ausbeute zu erhöhen.

Die erzielte RNA-Qualität aus Blüten war mit dem Concert™ Plant RNA Reagent allerdings sehr schlecht. Für die RNA-Extraktion aus Blüten wurde daher das RNeasy® Plant Mini Kit mit Abwandlungen des Protokolls nach MacKenzie et al. [89] (zitiert in [99]) verwendet. Dem Extraktionspuffer RLT (aus dem Qiagen-Kit) wurde nicht nur 5 µl β-Mercaptoethanol, sondern auch 10 mg PVP-40 pro 500 µl Puffer zugesetzt. Direkt nach der Homogenisierung des Pflanzenmaterials mit 500 µl des Puffers wurden 50 µl N-Laurylsarkosin-Lösung (20%) zugegeben und die Mischung 10 min bei 70 °C inkubiert und ab und zu geschüttelt. Danach wurde die RNA nach Anleitung des Herstellers gereinigt. Vor der Elution erfolgte eine fünfminütige Inkubation des Wassers auf der Zentrifugensäule.

Nach der RNA-Extraktion erfolgte die Bestimmung von Konzentration und Qualität mit dem Photometer (OD 280/260 und 230/260). Anschließend wurde eine Agarose-Gelelektrophorese mit der Menge, die auch für die cDNA-Synthese verwendet wurde, durchgeführt, um abgebaute RNA zu erkennen und Ungenauigkeiten der Photometermessung durch Verunreinigungen mit Polyphenolen auszuschließen.

Die reverse Transkription erfolgte wie im Abschnitt A.2.2.3 auf S. 18 beschrie-

## C.2 Methoden zur Analyse der Induktion

ben. Bei Blättern, Blüten und Früchten wurde 1 µg Gesamt-RNA pro Ansatz verwendet, bei Kallus nur 0,25 µg, da die RNA-Ausbeuten deutlich niedriger waren.

Um die Variation bei der Effizienz der reversen Transkription auszugleichen, wurden von jeder Probe entweder zwei cDNA-Synthesen durchgeführt, die getrennt voneinander analysiert wurden, oder eine Mischung aus drei getrennten cDNA-Synthesen wurde analysiert. Um die Qualität der cDNAs durch häufiges Einfrieren und Auftauen nicht zu verschlechtern, wurden diese aliquotiert bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### C.2.1.2 qPCR Optimierung

#### Primer

Zunächst wurde für die Analyse der Genexpression für jede untersuchte mRNA ein Primerpaar (siehe Tab. C.1 auf S. 64) gesucht. Dabei wurde zunächst ein Alignment aus den in der GenBank vorhandenen Nukleotidsequenzen erstellt. Soweit möglich wurden *Vitis*-Sequenzen und falls vorhanden zusätzlich die selbst klonierten Nukleotidsequenzen verwendet. Aus diesem Alignment wurden möglichst homologe Bereiche als Primerbindungsstellen gewählt. Wenn möglich wurden die Primer so gewählt, dass das PCR-Produkt mindestens ein Intron umschließt, damit im Falle einer Amplifikation von genomischer DNA statt cDNA ein Längenunterschied der entstehenden Fragmentgrößen sichtbar würde.

Zunächst wurden zumeist zwei forward und zwei reverse Primer in allen möglichen Kombinationen getestet und die beste davon ausgewählt, d.h. diejenige mit viel PCR-Produkt und ohne Nebenprodukte. Diese Kombination wurde dann mit cDNAs aus verschiedenen Sorten und Geweben getestet. Falls auch nach der Optimierung der PCR-Bedingungen kein befriedigendes Ergebnis erzielt werden konnte, wurden weitere Primer getestet.

Anschließend wurde das PCR-Produkt zur Bestätigung direkt oder nach Klonierung sequenziert und die Sequenz durch eine BlastN-Suche mit bereits veröffentlichten Sequenzen sowie durch Alignments mit den für die Primererstellung verwendeten Sequenzen verglichen. Diejenigen Klone mit vollständigen cDNAs wurden zusätzlich, wie schon im Kapitel B.3 auf S. 37 beschrieben, durch heterologe Expression in Hefe auf ihre Funktion getestet.

#### **GAPDH**

Da keine *Vitis-GAPDH*-Sequenz in GenBank vorhanden war, wurden die Primer für die *GAPDH* (Glycerinaldehyd 3-Phosphat Dehydrogenase) aus einem DNA-Alignment von 14 *GAPDH*-Sequenzen verschiedener monokotyler und dikotyler Pflanzen erstellt. Nach der Klonierung des PCR-Produkts bestätigte

## C.2 Methoden zur Analyse der Induktion

Gen	Primersequenz	Länge / bp
<i>GAPDH</i>	f 5'-GATGTTGARCTHGTYGCWGTBAAYGAYCC-3'	400
	r 5'-GCAAGRCARTTRGTRGTRCARCTRGC-3'	
<i>TUB</i>	f 5'-TTGTTGAGCCATACAATGC-3'	641
	r 5'-AGTACCAATGCAAGAAAGC-3'	
<i>PAL</i>	f 5'-GATYRATGTBTCVAGGAACAAGG-3'	848
	r 5'-CCARYTCYTCYCTCACAAAC-3'	
<i>STS</i>	f 5'-GCAGGTGGAAGTGTCCCTTCGAAC-3'	462
	r 5'-CTAAATTGAGTTTTGCTTCAACTGC-3'	
<i>CHS</i>	f 5'-GAGGCCSTCTGACACCCAC-3'	226
	r 5'-CAACCCTGGGACGTCTTTCAG-3'	
<i>FHT</i>	f 5'-GTTGATTCTAATCTCATTTTCGG-3'	499
	r 5'-GTCTTCCGCCATCCCTAGTGG-3'	
<i>DFR</i>	f 5'-CTCGGATTATTTTTGAGAAGTATG-3'	1077
	r 5'-CTCTCGCTAGAAAGCCTGACAG-3'	
<i>ANS</i>	f 5'-GTTGAGAGCTTGTCCAGCAG-3'	769
	r 5'-GTCACCCACTTGCCCTCATAG-3'	
<i>FLS</i>	f 5'-AAGYCTCCHGAYTCCAAGTC-3'	431
	r 5'-ATCAAAMCAATGRTCRTCTCT-3'	
<i>LAR1</i>	f 5'-GTAGAGAAGAAGCATCATCAG-3'	1086
	r 5'-GGAGGACTAATCGCATGCATG-3'	
<i>LAR2</i>	f 5'-CTTCTTCTCAGAAAATTAACACCG-3'	1191
	r 5'-CACCAATATTACTAGATTCCAATAAG-3'	
<i>ANR</i>	f 5'-GCCAATTTGGAAGTGAGG-3'	1087
	r 5'-GAGGGATAAGATAGTGCTCC-3'	

Tabelle C.1: Sequenzen der Primer für die quantitativen PCR-Analysen. Jeweils 5'- (f) und 3'-Primer (r) mit Angabe der resultierenden Fragmentlänge in Basenpaaren. Ableitung der Primer siehe Text.

## C.2 Methoden zur Analyse der Induktion

eine Sequenzierung, dass es sich beim PCR-Produkt um *GAPDH* handelt. Diese Sequenz der Sorte ‘Regent’ wurde in GenBank veröffentlicht (EF192466).

### **TUB**

Die Primer für pflanzliches  $\beta$ -Tubulin (*TUB*) wurden entnommen aus Tesnière und Verriès [142]. Es handelt sich um degenerierte Primer aus einem konservierten kodierenden Bereich von *Arabidopsis*, *Oryza*, *Solanum tuberosum* und *Hordeum*. Zusätzlich wurde das PCR-Produkt kloniert und einer der Klone sequenziert.

### **PAL**

Da nur wenige *PAL*-Sequenzen aus *Vitis* bekannt sind, es sich aber um eine Multigenfamilie handelt [132] und möglichst alle Kopien erfasst werden sollten, wurden für die Analyse der *PAL*-Expression degenerierte Primer aus einem Alignment von 22 *PAL*-Sequenzen dikotyler Pflanzen, darunter auch *Vitis*, abgeleitet. Die Sequenz eines klonierten PCR-Produkts wurde mit der des *Vitis* full-length Expressionsklons mit *PAL*-Aktivität (siehe Abschnitt B.3.1 auf S. 37) verglichen und bestätigt.

### **STS und CHS**

Da die Sequenzen von *CHS* und *STS* sehr ähnlich sind, wurde ein Alignment der in dieser Arbeit gewonnenen full-length *CHS* und *STS* Sequenzen und den zu deren Klonierung verwendeten Sequenzen aus GenBank, siehe Abschnitt B.2.1.3 auf S. 28, angefertigt. Die Primer für die Analyse der Genexpression wurden in Bereiche gelegt, in denen die *CHS*-Sequenzen untereinander möglichst homolog, jedoch möglichst verschieden von den *STS*-Sequenzen waren und umgekehrt. Beide PCR-Produkte wurden direkt sequenziert und die Sequenzen mit denen der *Vitis* full-length Expressionsklone mit *STS*- bzw. *CHS*-Aktivität (siehe Abschnitt B.3.1 auf S. 37) verglichen und bestätigt.

### **FHT, ANS und FLS**

Ähnlich wie bei der Vorgehensweise bei *CHS* und *STS* wurden auch für die Primer von *FHT*, *ANS* und *FLS* möglichst Regionen spezifisch für nur eines der Gene in einem Alignment aus *Vitis*-Sequenzen aller drei Gene gesucht (*FHT*: X75965; *ANS*: X75966 und AB073018; *FLS*: AB213566, AB213565, AB092591, AB086056 und AB086055). Die drei PCR-Produkte wurden direkt sequenziert und die Sequenz von *FHT* und *ANS* zusätzlich mit denen der Expressionsklone verglichen (siehe Abschnitt B.3.2 auf S. 43).

### **DFR**

Die Primer für die *DFR* wurden aus Gosch et al. [62] entnommen, wo die Primer nach der *Vitis*-Sequenz X75964 konstruiert und für die Klonierung eines

## C.2 Methoden zur Analyse der Induktion

Expressionsklons mit DFR-Aktivität verwendet wurden.

### **LAR1, LAR2 und ANR**

Für die Expressions-Analysen von *LAR1*, *LAR2* und *ANR* wurden dieselben Primer wie für die Klonierung der jeweiligen Expressionsklone verwendet (siehe Abschnitt B.2.1.3 auf S. 28).

### **PCR-Bedingungen**

Zur Optimierung der PCR-Bedingungen wurde zunächst die Annealing-Temperatur im Bereich von 45°C bis 60°C variiert. Höhere Temperaturen führten dabei im Allgemeinen zu höherer Spezifität, niedrigere Temperaturen zu mehr PCR-Produkt. Wenn durch Variation der Temperatur kein optimales PCR-Ergebnis bezüglich Menge und Spezifität des Produkts erreicht werden konnte, wurden verschiedene PCR-Puffer ausprobiert. Diese Optimierungspuffer mit 100 mM Tris und 500 mM KCl unterschieden sich hinsichtlich ihrer Magnesium-Konzentration (1,0 mM–2,5 mM MgCl<sub>2</sub> final) und ihres pH-Wertes (8,0–9,2), da diese Kriterien ebenfalls die Spezifität und Effizienz der PCR-Reaktion beeinflussen. Der taq-Puffer von MBI-Fermentas hatte einen pH-Wert von 8,8 und enthielt zusätzlich 0,8 % Nonidet P40., MgCl<sub>2</sub> wurde beim MBI-Puffer getrennt mit 1,5 mM final zugegeben.

Die gefundenen optimalen Reaktionsbedingungen sind in Tab. C.2 auf S. 67 aufgeführt. Alle PCR-Reaktionen wurden im PCRExpress<sup>®</sup>-Gerät von Hybaid durchgeführt mit folgenden PCR-Bedingungen: 94°C für 3,0 min; Zyklen: 94°C für 0,5 min, Annealing-Temperatur für 0,5 min, 72°C für 1,5 min; 72°C für 7,0 min. Bei Blättern, Blüten und Früchten wurde eine cDNA-Menge eingesetzt, die aus rechnerisch 32 ng Gesamt-RNA revers transkribiert wurde, bei Kallus aus 8 ng Gesamt-RNA.

### **Zyklenzahl**

Da es sich bei den durchgeführten Analysen um Endpunkt-qPCRs handelte, musste zusätzlich für jede Primerkombination eine geeignete Zyklenzahl für die PCR-Reaktionen bestimmt werden. Bei den optimalen Bedingungen wurde mit einer cDNA-Verdünnungsreihe (0,05-, 0,1-, 0,2-, 0,5-, 1-, 2- und 5-faches der üblichen cDNA-Menge) eine Zyklenzahl im log-linearen Bereich der Amplifikation gesucht. Dies wurde mit jeweils zwei Sorten oder verschieden behandelten Proben sowohl mit cDNA aus Blättern als auch aus Kallus durchgeführt, da sich die Expression in diesen beiden Geweben teilweise stark voneinander unterscheidet und weil unterschiedliche RNA-Mengen für die cDNA-Synthese verwendet wurden. Für Früchte und Blüten wurden dieselben Zyklenzahlen wie für Blätter

## C.2 Methoden zur Analyse der Induktion

Gen	Puffer	Temp. / °C	Zyklenzahl		
			Blatt, Früchte, Blüten	<i>in vitro</i> - Pflanzen	Kallus
<i>GAPDH</i>	X	45	28	28	28
<i>TUB</i>	X	55	25	25	28
<i>PAL</i>	X	50	30	30	30
<i>STS</i>	X	45	26	23	24
<i>CHS</i>	X	45	20	23	30
<i>FHT</i>	X	45	24	24	30
<i>DFR</i>	X	55	27	27	27
<i>ANS</i>	X	45	24	24	30
<i>FLS</i>	X	45	28	28	38
<i>LAR1</i>	X	45	31	31	36
<i>LAR2</i>	X	45	31	31	36
<i>ANR</i>	O	55	25	25	28

Tabelle C.2: Optimale Bedingungen für die quantitativen PCR-Analysen. Temp.: Annealing-Temperatur. Puffer X: taq-Puffer KCl von MBI-Fermentas und 15 mM MgCl<sub>2</sub>, Puffer O: pH 8,8, 25 mM MgCl<sub>2</sub>. Primerkombinationen siehe Tab. C.1 auf S. 64

## C.2 Methoden zur Analyse der Induktion

verwendet, ebenso für *in vitro*-Pflanzen, wobei bei letzteren einige Reaktionen weiter angepasst werden mussten (siehe Tab. C.2 auf S. 67).

### C.2.1.3 qPCR Auswertung

Bei der Verwendung von üblichen Auftragspuffern (»Blaumarkern«) für die Gelelektrophorese wurden die entstandenen Banden teilweise vom Farbstoff Bromphenolblau überdeckt, so dass eine quantitative Analyse schwierig war. Daher wurde für die quantitativen PCRs ein Blaumarker verwendet, der gegenüber üblichen Blaumarkern nur ein Zehntel des Farbstoffs Bromphenolblau in 40 % Glycerin enthielt. Die Gele enthielten Ethidiumbromid zur Anfärbung der DNA.

Die Quantifizierung der PCR-Produkte erfolgte durch die Auswertung der fotografierten Agarosegele mit dem Programm Quantity One 4.6 (Biorad). Die so ermittelte Intensität der Banden wurde zunächst mit dem Mittelwert aller PCR-Banden des Gels verrechnet, um die unterschiedliche Helligkeit der einzelnen Gele zu kompensieren. Diese Werte wurden dann durch die Werte der *GAPDH*-Expression der entsprechenden Proben geteilt, um Unterschiede in der reversen Transkription oder der RNA-Qualität der einzelnen Proben auszugleichen. Die Ergebnisse wurden weiterhin durch den Mittelwert der Expression der biologischen Kontrollvariante geteilt, um für den Vergleich der Expressionsverläufe mehrerer Gene einen gemeinsamen Bezugspunkt zu haben. Schließlich wurden von diesen Werten die Mittelwerte und die Standardabweichungen (SD) aller PCRs berechnet.

## C.2.2 Quantifizierung der Enzymaktivitäten

### C.2.2.1 Enzymaufarbeitung

Für die Enzymaufarbeitung wurden zwei verschiedene Methoden (A und B) verwendet. Bis zur Aufarbeitung wurde das Pflanzenmaterial ständig bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Für den ersten Kallusversuch (AK1) wurde die Methode A verwendet, für alle anderen die Methode B. Bei einigen Versuchsreihen wurden zwei Aufarbeitungen mit der Methode B für jede Probe gemacht und diese getrennt (Versuch AB2) oder gemischt (Versuch AB1) auf Enzymaktivitäten analysiert.

#### Enzymaufarbeitung A

Für eine einfache Proteinextraktion [92] wurden 200 mg Pflanzenmaterial mit 100 mg Seesand und 200 mg PVP (Polyvinylpyrrolidon) in einem vorgekühlten

## C.2 Methoden zur Analyse der Induktion

Mörser zerkleinert. Dazu wurde 1,2 ml frisch mit 0,4 % Na-Ascorbat versetzter 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 7,5, gegeben. Das Homogenisat wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und 5 min bei 15 000 g und 4 °C zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde in einem neuen Reaktionsgefäß erneut 10 min zentrifugiert und der klare Überstand konnte nun als Quelle für lösliche Enzyme benutzt werden.

### Enzymaufarbeitung B

Für den Extraktionspuffer der Enzymaufarbeitung nach Dellus et al. [35] wurde 0,1 M Hepes, pH 7,5, aufgekocht und unter Stickstoffeinleitung abgekühlt. Dabei wurden 1,5 % PEG 1500 (Polyethylenglykol), 10 % Saccharose, 100 mM Na-Ascorbat und 2,5 mM CaCl<sub>2</sub> zur Herstellung des frischen Extraktionspuffers hinzugefügt.

Es wurden 200 mg Blattmaterial oder 400 mg Blüten, Frucht oder Kallus verwendet. Das Pflanzenmaterial wurde zusammen mit 200 mg PVPP (Polyvinylpolypyrrolidon) in flüssigem Stickstoff zu Pulver gemörsert. Nach Zugabe von 3 ml Extraktionspuffer wurde so lange gemörsert, bis die Mischung gerade aufgetaut war. Das Homogenisat wurde 20 min bei 4 °C und 25 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde zusammen mit 200 mg Dowex (äquilibriert in 0,1 M Hepes, pH 7,5) 15 min auf Eis geschüttelt und anschließend nochmals 5 min bei 4 °C und 20 000 g zentrifugiert. Der klare Überstand enthielt die löslichen Enzyme, wurde aliquotiert, schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei –80 °C gelagert.

### C.2.2.2 Enzymtests und deren Auswertung

Die vergleichenden Enzymtests erfolgten mit gleichen Mengen Gesamtprotein, typischerweise 5 µg für Enzyme aus Kallus und 10 µg für Enzyme aus Blättern und Früchten. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Bradford-Reagenz [23] (Sigma) mit BSA (Bovines Serum-Albumin) als Standard. Durch Vortests wurde die Enzym- und Substratlinearität der Reaktionen sichergestellt.

Die quantitativen Enzymtests wurden jeweils nur mit einem der möglichen Flavonoidsubstrate durchgeführt: CHS und STS mit p-Cumaroyl-CoA und <sup>14</sup>C-Malonyl-CoA, FHT mit <sup>14</sup>C-NAR, LAR mit <sup>14</sup>C-DHQ und ANR mit Cy als Substrat.

Nach der Auftrennung der Reaktionsprodukte mittels Dünnschichtchromatographie wurden bei Tests mit <sup>14</sup>C-markierten Substraten die DC-Platten wie in Abschnitt A.2.3 auf S. 19 beschrieben mit der Software TINA ausgewertet. Bei ANR-Enzymtests wurden die mit DMAZA besprühten DC-Platten mit



## *C.2 Methoden zur Analyse der Induktion*

einer Digitalkamera oder einem Scanner in eine Bilddatei umgewandelt, die als Graustufenbild mit der Software Quantity One analog zu den Bildern der Gelelektrophoresen ausgewertet wurde.

Die Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichungen für die relativen Enzymaktivitäten erfolgte analog zur Auswertung der qPCRs (siehe Abschnitt C.2.1.3 auf S. 68).

## C.3 Versuchsbeschreibungen

Das verwendete Pflanzenmaterial stammt von Weinpflanzen, die im Gewächshaus oder Freiland in 10l-Containern kultiviert wurden. Die Pflanzen wurden nicht mit Pflanzenschutzmitteln behandelt und regelmäßig durch Bewässerung (0,5–1 ‰ Wuxal Super 887) mit ausreichend Nährstoffen versorgt.

Die Kultur der *in vitro*-Pflanzen und Kallusse für die Durchführung der Induktionsversuche erfolgte durch das Fachgebiet Obstbau der TU München, Freising-Weihestephan. Die Kallusse wurden auf Filterbrücken in einem Flüssigmedium (nach Murashige und Skoog [97]) kultiviert, wie in [115] beschrieben. Das Medium enthielt 40 g/l Saccharose, 0,2 mg/l Cytokinin (Benzaminopurin) und 10 mg/l Auxin (Indolessigsäure).

Für die *in vitro*-Pflanzen wurden Sprossspitzen auf einem Medium nach Murashige und Skoog [97] vermehrt, das 30 g/l Saccharose, 0,2 mg/l Cytokinin (Benzaminopurin) und 5 mg/l Auxin (Indolessigsäure) enthielt. Teilweise wurden die Sprossspitzen zunächst in festem Medium vorkultiviert, dann mit abgeschnittenen Wurzeln in Flüssigmedium umgesetzt.

Eine kurze Übersicht über alle durchgeführten Versuche findet sich in Tab. E.3 auf S. 126 im Anhang.

### C.3.1 Entwicklungsstadien Blatt und Frucht

#### Versuch E1

Die verschiedenen Blattstadien wurden im August 2005 von im Freiland kultivierten Pflanzen der Sorte ‘Regent’ entnommen. Jede Probe war ein Gemisch aus Blättern gleicher Größe von mehreren Trieben und Pflanzen:

*B1* erstes entfaltetes Blatt, Durchmesser bis 10 mm

*B2* Durchmesser bis ca. 20 mm

*B3* Durchmesser bis ca. 40 mm

*B4* voll ausgewachsen, aber noch frisch grün

*B5* Blatt beginnt ledrig zu werden

#### Versuch E2

Die Blüten und Früchte der Entwicklungsreihe wurden im Sommer 2004 von im Freiland kultivierten Pflanzen der Sorte ‘Regent’ geerntet. Für jedes Ent-

### C.3 Versuchsbeschreibungen

wicklungsstadium wurden die ganzen Beeren mehrerer Gescheine gemischt. Es wurden folgende Entwicklungsstadien (nach BBCH [87]) verwendet:

*BBCH 57* Blüte voll entwickelt, Einzelblüten spreizen sich

*BBCH 71* Fruchtsatz, Fruchtknoten vergrößert

*BBCH 75* Erbsengroße Beeren

*BBCH 81* Beginn der Reife

*BBCH 83* Fortschreiten der Beerenverfärbung

*BBCH 85* Weichwerden der Beeren

## C.3.2 Versuchsbeschreibungen

### Prohexadion-Ca-Behandlung

Der Wachstumsregulator Prohexadion-Ca (ProCa) wird üblicherweise zusammen mit einer Formulierung zur besseren Aufnahme ins Blatt ausgebracht. Um den Einfluss dieser Leerformulierung, d.h. des Handelspräparats ohne den Wirkstoff ProCa, zu untersuchen, wurden in einigen Versuchen Kontrollbehandlungen damit durchgeführt.

#### C.3.2.1 Versuche an Blättern von Freilandpflanzen mit ProCa und Pflanzenstärkungsmitteln

##### Versuch P1

Im Juni 2004 wurde an Blättern von im Freiland kultivierten Weinpflanzen der Einfluss der Pflanzenstärkungsmittel Milsana und Myco-Sin zusammen mit ProCa untersucht. Dazu wurden jeweils drei Triebe der Sorten 'Spätburgunder' und 'Regent' sowie zwei Triebe von 'Müller-Thurgau' mit den verschiedenen Lösungen besprüht. Da die Myco-Sin-Spritzbrühe nach Empfehlung des Herstellers auf einen pH-Wert von 3,8 eingestellt werden soll, wurde zusätzlich zur Kontrolle nur mit Wasser auch eine Behandlung mit essigsaurem Wasser (pH 3,8) durchgeführt. In früheren Versuchen an *Rosa* (unveröffentlicht) wurde festgestellt, dass die in Myco-Sin enthaltenen Tonminerale bei gleichzeitiger Ausbringung mit ProCa dieses binden und inaktivieren. Daher wurden die Pflanzen zunächst mit ProCa (200 ppm) behandelt und erst am darauffolgenden Tag die Behandlungen mit Wasser, angesäuertem Wasser, Myco-Sin (1 %, pH 3,8) und Milsana (0,5 %) durchgeführt. Zusätzlich zu den Einzelbehandlungen wurden die Kombinationen ProCa und Milsana sowie ProCa und Myco-Sin analysiert. Drei Tage nach Versuchsbeginn wurden die Blätter der behandelten Triebe geerntet, getrennt nach erstem bis drittem entfaltetem Blatt.

### C.3 Versuchsbeschreibungen

#### Versuch P2

Anhand der Sorten ‘Spätburgunder’ und ‘Müller-Thurgau’ wurde ein möglicher Einfluss der Leerformulierung von ProCa auf die im vorhergehenden Versuch erzielten Ergebnisse untersucht. Die Blätter von im Freiland kultivierten Pflanzen wurden im August 2005 mit Wasser, Wasser mit Leerformulierung (0,25 g/l) sowie ProCa (0,25 g/l) behandelt. Am vierten Tag nach der Behandlung wurden jeweils Mischproben aus den Blättern dreier Triebe genommen, wobei diese nach dem Alter der Blätter in erstes bis drittes entfaltetes Blatt getrennt wurden.

#### C.3.2.2 Versuch an *in vitro*-Pflanzen

#### Versuch P3

Im Juli 2004 wurde ein Versuch zur Wirkung von ProCa auf *in vitro*-Pflanzen durchgeführt. Dabei wurde die Sorte ‘Nero’ in Flüssigmedium verwendet und die Kontrolle (Leermedium mit Leerformulierung, siehe Abschnitt C.3.3.2 auf S. 75) sowie die ProCa-Lösung (200 ppm) ohne Kontakt zu den Blättern zum Medium zugegeben. Die Probenahme für Enzymtests und Expressionsanalysen erfolgte nach 24 h und 48 h, wobei bei der Kontrollvariante auf den ersten Probetermin verzichtet wurde. Es wurden bei jeder Probe zwei *in vitro*-Pflanzen verwendet, deren ältere und jüngere Blätter voneinander getrennt beprobt wurden.

### C.3.3 Versuchsbeschreibungen

#### *Aureobasidium*-Behandlungen

Die *Aureobasidium*-Hefen wurden vom Fachgebiet Obstbau wie in [115] beschrieben gewonnen. Die Kultivierung von *Aureobasidium* erfolgte in PCH-Medium, einem für Hefen modifizierten »plate count« Medium aus 5 % Glucose, 5 % Pepton aus Casein und 5 % Hefeextrakt. Bei Versuchen mit Pflanzen in Gewebekultur wurden die *Aureobasidium*-Hefen in dem Medium vermehrt, in dem auch die Pflanzen kultiviert wurden, um Effekte durch neue Inhaltsstoffe im Medium auszuschließen. Vor der Ausbringung auf die Pflanzen wurden die *Aureobasidium*-Hefen durch Autoklavieren abgetötet.

Um auszuschließen, dass beobachtete Effekte auf Bestandteile des Medium zurückzuführen sind, wurde als Kontrolle »Leermedium« eingesetzt. Damit ist bei Versuchen, bei denen Pflanzen mit *Aureobasidium*-Suspension besprüht wurden, das PCH-Medium ohne *Aureobasidium* gemeint (Versuche AI2, AI3, AB1 und AB2). Wenn die *Aureobasidium*-Suspension direkt ins Kulturmedium von Pflanzen in Gewebekultur gegeben wurde, bezeichnet Leermedium das Pflanzen-Kulturmedium (Versuche AI1, AK1, AK2).

### C.3 Versuchsbeschreibungen

Myco-Sin und der isolierte Hefebestandteil von Myco-Sin wurden ebenfalls im für den jeweiligen Versuch verwendeten Leermedium gelöst.

Für die *Botrytis*-Bonitur wurden Sporen und Hyphen von *Botrytis*-Kulturen auf Kartoffel-Dextrose-Agar (Difco) abgewaschen [115].

#### C.3.3.1 Versuche an Weinkallus

##### Versuch AK1

Zunächst wurden Weinkallusse der Sorte 'Nero' mit verschiedenen Präparaten behandelt und teilweise zusätzlich mit *Botrytis* infiziert. Dieser Versuch wurde im Juli 2004 durchgeführt. Die Kallusse wurden drei Wochen vor Versuchsbeginn auf frisches Medium umgesetzt, die Behandlungslösungen wurden direkt ins Medium gegeben ohne den Kallus zu berühren. Als Behandlungslösungen verwendet wurden *Aureobasidium*-Extrakt, das Pflanzenstärkungsmittel Myco-Sin (2 %) und der isolierte Hefebestandteil von Myco-Sin (1 %). Als Kontrolle diente das Medium für die Anzucht der Kallusse (»Leermedium«). Die *Botrytis*-Infektion erfolgte 24 h danach durch das Auftragen eines 20 µl-Tropfens einer Suspension von *Botrytis*-Hyphen und -Sporen direkt auf den Kallus, damit dieser nicht von den Seiten her überwuchert würde, ohne dass tatsächlich eine Infektion stattgefunden hatte. Nur die Kontrollen und die mit *Aureobasidium* behandelten Kallusse wurden mit *Botrytis* infiziert. Bei jeder Probenahme – 24 h, 48 h und 72 h nach Versuchsbeginn – wurden von den Behandlungen jeweils zwei Kallusse entnommen und später einzeln analysiert.

##### Versuch AK2

Ein weiterer Versuch wurde mit Kallussen der Sorte 'Regent' durchgeführt, die drei Tage vor Versuchsbeginn auf neues Medium umgesetzt worden waren. Nach Erfahrungen des Fachgebiets für Obstbau reagiert diese Sorte besser auf die Behandlungen. Es wurde in kürzeren Intervallen untersucht, wie die zeitliche Reaktion auf die Behandlung verläuft. Dazu wurden die Kallusse mit Leermedium als Kontrolle und *Aureobasidium*-Extrakt behandelt und 5 h, 7,5 h, 10 h, 24 h und 48 h später Proben genommen. Zusätzlich gab es direkt vor dem Beginn der Behandlung eine weitere Probenahme (Kontrolle 0 h) zur Analyse eventueller Effekte der Kontrollbehandlung. Um die Ergebnisse des vorhergehenden Versuchs mit 'Nero' zu überprüfen, wurden darüber hinaus Behandlungen mit Myco-Sin (2 %), dem Hefebestandteil von Myco-Sin (1 %) und einer verdünnten *Aureobasidium*-Suspension (ein Fünftel der vorherigen Konzentration) durchgeführt, wobei dabei allerdings nur jeweils der Zeitpunkt 24 h nach Versuchsbeginn analysiert werden konnte. Bei jeder Probenahme wurden jeweils 5 Kallusse gemischt.

### C.3.3.2 Versuche an *in vitro*-Pflanzen

#### Versuch AI1

Im Juli 2004 wurde ein erster Versuch zur Wirkung von *Aureobasidium* auf *in vitro*-Pflanzen durchgeführt. Dabei wurde die Sorte 'Nero' in Flüssigmedium verwendet. Parallel wurden Leermedium (Kontrolle) sowie die *Aureobasidium*-Suspension ohne Kontakt zu den Blättern zum Medium zugegeben. In beiden Lösungen war zusätzlich die Leerformulierung des ProCa erhalten, da dieser Versuch parallel zur ProCa-Behandlung von *in vitro*-Pflanzen (Versuch P3 Abschnitt C.3.2.2 auf S. 73) durchgeführt wurde. Die Probenahme für Enzymtests und Expressionsanalysen erfolgte nach 24 h und 48 h, wobei bei der Kontrollvariante auf den ersten Probetermin verzichtet wurde. Es wurden bei jeder Probe zwei *in vitro*-Pflanzen verwendet, deren ältere und jüngere Blätter voneinander getrennt beprobt wurden.

#### Versuch AI2

Ein weiterer Versuch mit *in vitro*-Pflanzen der Sorte 'Nero' wurde im Januar 2006 vorgenommen. Dabei wurden die Pflanzen jedoch im Unterschied zum vorhergehenden Versuch auf Festmedium kultiviert und die Blätter mit Leermedium bzw. *Aureobasidium*-Suspension besprüht. Die Probenahme erfolgte 24 h nach Behandlung, wobei für beide Varianten zweimal getrennt Mischproben aus 4 Pflanzen genommen wurden.

#### Versuch AI3

Um einen eventuellen Effekt der Leerformulierung von ProCa bei den beiden vorhergehenden Versuche zu analysieren, wurden im Juni 2006 *in vitro*-Pflanzen der Sorte 'Nero' mit Leermedium oder *Aureobasidium*-Suspension besprüht, jeweils einmal mit und einmal ohne Zugabe der ProCa-Leerformulierung (75 g/l). Nach 24 h wurden jeweils die Blätter von fünf Pflanzen gemischt und eingefroren.

### C.3.3.3 Versuche an Weinblüten

#### Versuch AB1

Im Mai 2006 wurde an Weinpflanzen, die im Gewächshaus kultiviert wurden, getestet, ob auch Weinblüten auf die Behandlung mit *Aureobasidium* reagieren. Dazu wurden die Sorten 'Spätburgunder', 'Regent' und 'Müller-Thurgau' verwendet, die sich in der Vollblüte befanden. Die Gescheine wurden im Abstand von sechs Stunden zweimal in Leermedium (Kontrolle) oder *Aureobasidium*-Suspension getaucht. Vor der Behandlung (Kontrolle 0 h) sowie 24 h, 48 h und 72 h nach der Behandlung wurden Mischproben aus mehreren Gescheinen ent-

### C.3 Versuchsbeschreibungen

nommen. Bei ‘Spätburgunder’ wurden vier Gescheine für die Kontrollen und sechs für die *Aureobasidium*-Behandlung verwendet, bei ‘Regent’ und ‘Müller-Thurgau’ jeweils zwei Gescheine pro Probe.

#### **Versuch AB2**

Die Behandlung von Blüten mit *Aureobasidium* wurde im Juni 2006 an im Freiland kultivierten Pflanzen wiederholt. Es wurden Pflanzen der Sorten ‘Spätburgunder’, ‘Müller-Thurgau’ und ‘Regent’ verwendet, deren voll aufgeblühte Gescheine in Leermedium oder *Aureobasidium*-Suspension getaucht wurden. Vor der Behandlung (Kontrolle 0 h) sowie 12 h und 24 h nach der Behandlung wurden jeweils Mischproben aus zwei (‘Spätburgunder’) oder vier (‘Müller-Thurgau’, ‘Regent’) Gescheinen entnommen. Die ‘Spätburgunder’-Proben wurden nicht analysiert, da später festgestellt wurde, dass es sich bei den verwendeten Pflanzen um ein Sortengemisch handelte.

## C.4 Ergebnisse und Diskussion – Induktionsversuche

### C.4.1 Optimierung der Testbedingungen für die Quantitative PCR

Die Proben der Versuchsreihen wurden hinsichtlich der Aktivitäten einiger wichtiger Enzyme der Phenylpropanoidbiosynthese untersucht. Außerdem wurde die Expression von Genen der Stilben- und Flavonoidbiosynthese mit Endpunkt-PCR-Analysen halbquantitativ bestimmt. Die Werte für die Expressionen wurden jeweils relativ zur Expression eines Referenzgens, der *GAPDH*, bestimmt.

#### Primer

Geeignete Primerkombinationen für die quantitativen PCRs (siehe Tab. C.1 auf S. 64) konnten für alle untersuchten Gene gefunden werden. Dass tatsächlich das gesuchte Gen amplifiziert wurde, wurde durch Sequenzierung von PCR-Produkten und Sequenzvergleich mit bekannten Sequenzen bestätigt.

Da die RNA-Proben teilweise mit geringen Mengen genomischer DNA verunreinigt waren, wurden die Primer für die quantitativen PCR-Analysen so gelegt, dass sie ein Intron umschließen und so bei der Amplifikation aus genomischer DNA ein um das Intron längeres PCR-Produkt ergeben. Bei *CHS* und *STS* war dies nicht möglich. In dem etwa 200 bp langen Sequenzbereich zwischen dem Startkodon und dem einzigen Intron dieser beiden genomischen Sequenzen war es nicht möglich, eine Primerbindungsstelle zu finden, die einerseits genügend unterschiedlich zwischen *CHS* und *STS* und andererseits genügend konserviert in den verschiedenen Kopien dieser Gene war. Bei der *PAL* ist in der genomischen Sequenz ebenfalls nur ein Intron vorhanden, dieses wird jedoch bei den beiden *Vitis-PAL*-Sequenzen in GenBank unterschiedlich gespleißt (siehe auch Abschnitt B.3.1.1 auf S. 37), so dass bei Intron-umschließenden Primern aus der cDNA beider Varianten unterschiedlich lange PCR-Produkte entstünden,



deren Amplifikationseffizienz sich möglicherweise unterscheiden würden.

### Referenzen für die qPCR

Um die experimentellen Fehler durch unterschiedliche RNA-Qualität und durch Schwankungen der RT- und PCR-Effizienz bei den einzelnen Proben auszugleichen, wurde die Expression der untersuchten Gene der Polyphenolbiosynthese mit der eines »Haushaltsgens« verglichen. Zunächst wurden sowohl  $\beta$ -Tubulin als auch *GAPDH* verwendet. Es stellte sich jedoch heraus, dass die Expression von *TUB* beim untersuchten Probenmaterial in verschiedenen Geweben, Entwicklungsstadien und Behandlungen deutliche Unterschiede zeigte und daher als Referenzgen ungeeignet für diese Proben war. Die Expression der *GAPDH* dagegen war relativ konstant und wurde zur Normierung der Expressionswerte verwendet.

Ein Vergleich von Referenzgenen für qPCRs bei Entwicklungsstadien von *Vitis*-Früchten mit verschiedenen statistischen Verfahren durch Reid et al. [109] ergab ebenfalls, dass *GAPDH* eines der am besten geeigneten Referenzgene für diese Gewebe ist und  $\beta$ -Tubulin eher schlecht geeignet ist.

### qPCR-Bedingungen

Für jedes Gen wurden die gefundenen Primerkombinationen bei verschiedenen Annealing-Temperaturen, teilweise unter Verwendung verschiedener Puffer, getestet. Bei optimalen PCR-Bedingungen wurden danach cDNA-Verdünnungsreihen bei verschiedenen Zyklenzahlen durchgeführt, bis eine Zyklenzahl im log-linearen Bereich der Amplifikation ermittelt war (siehe Tab. C.2 auf S. 67). Beispielhaft für die Optimierung der PCR-Reaktionen soll hier die der *ANR* dargestellt werden. In Abb. C.1 sind auf einer halblogarithmischen Skala die cDNA-Mengen als Vielfache der normalerweise verwendeten Menge sowie die

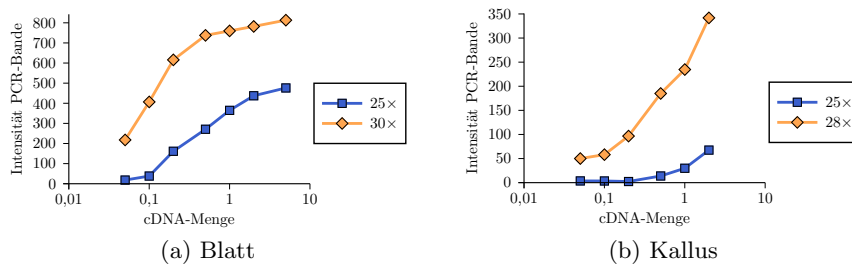


Abbildung C.1: Optimierung der PCR-Bedingungen für die Analyse der *ANR*-Genexpression. Verschiedene Zyklenzahlen bei cDNA-Konzentrationsreihen aus Blättern (a) und Kallus (b).

Intensität des PCR-Produkts dargestellt. Bei cDNA aus Weinblättern sind 30 Zyklen zuviel, das Plateau der Amplifikation ist bereits beim 0,5-fachen der später für die qPCR-Reaktionen verwendeten Menge erreicht. Bei 25 Zyklen dagegen besteht im Bereich der normalerweise eingesetzten cDNA-Konzentration (»1«) ein annähernd linearer Zusammenhang zwischen dem Logarithmus der eingesetzten cDNA-Menge und der Menge des PCR-Produkts. Bei cDNA aus Kallus sind jedoch 25 Zyklen zu wenig, denn das PCR-Produkt ist erst ab 0,5-facher Konzentration überhaupt auf dem Agarose-Gel sichtbar. Bei 28 Zyklen entsteht genug PCR-Produkt, ohne dass das Plateau der Amplifikation erreicht wird. Für die quantitativen Analysen der *ANR*-Expression wurden folglich bei cDNAs aus Blattmaterial 25 Zyklen verwendet, bei cDNAs aus Kallus 28 Zyklen.

### C.4.2 Entwicklungsstadien Blatt und Frucht

Es wurden die Genexpression und die Enzymaktivitäten verschiedener Entwicklungsstadien von Blättern (Versuch E1) und Früchten (Versuch E2) der Weinrebe analysiert. Dazu wurde von jeder Probe die RNA extrahiert und daraus zwei parallele cDNA-Synthesen durchgeführt. Für jedes Gen wurden mindestens zwei qPCR-Reihen durchgeführt, wobei jeweils die beiden cDNAs getrennt voneinander analysiert wurden. Da die beiden cDNAs teilweise etwas verschiedene Werte ergaben, wurden die einzelnen Werte für die Expression nicht auf den Mittelwert aller *GAPDH*-Werte, sondern auf die *GAPDH*-Expression der jeweiligen cDNA bezogen. Die Enzymtests wurden alle jeweils von einer Enzymaufarbeitung durchgeführt. Bei den Blattstadien wurden alle Enzymtests zweimal wiederholt, bei den Fruchtstadien wurden PAL-Tests zweimal und CHS-Tests viermal ausgeführt, die übrigen nur einmal. Sowohl die Werte für die Genexpression als auch für die Enzymaktivität wurden jeweils relativ zu der des ersten Blatt- bzw. Fruchtstadiums angegeben.

#### Versuch E1 – Blattstadien

Allgemein kann bei der Flavonoidbiosynthese verschiedener Blattstadien (siehe Abb. C.2 auf S. 80) festgestellt werden, dass Genexpression und Enzymaktivität in kleineren Blättern höher waren als in den älteren, am höchsten meist bei den Blattstadien 2 und 3. Die Expression von *ANR* und *LAR1* blieb im Verlauf der Entwicklung etwa gleich. Bei den Blattstadien 1 und 5 waren die Schwankungen bei den Genexpressionen recht hoch, was wahrscheinlich auf die geringere RNA-Qualität, insbesondere durch Verunreinigungen mit phenolischen Substanzen, dieser beiden Proben zurückzuführen ist. Die Oberflächen der Blätter des Stadiums 1 waren dicht mit Blatthaaren bedeckt, die im Stadium

## C.4 Ergebnisse und Diskussion – Induktionsversuche

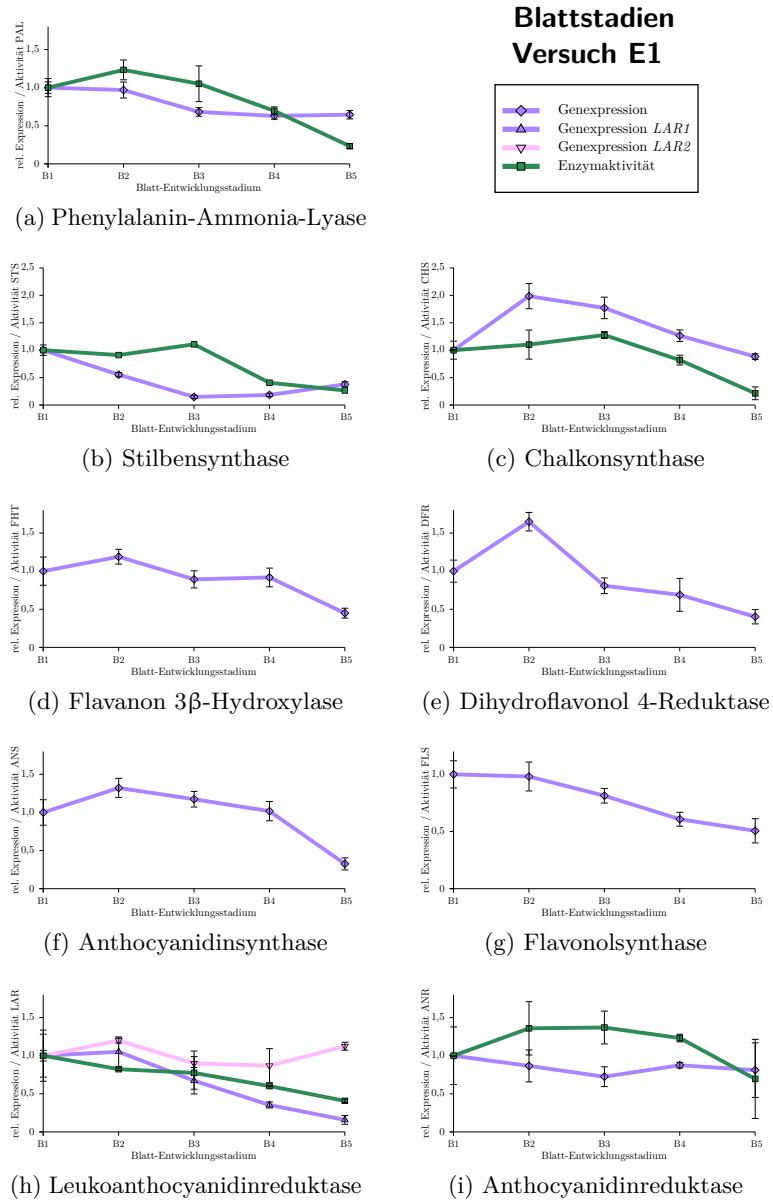


Abbildung C.2: Genexpression und Enzymaktivitäten in verschiedenen Blattstadien (Versuch E1), jeweils relativ zu Blatt 1,  $\pm$  SD. Eine y-Achseneneinheit entspricht einer Produktmenge von 9200 dpm Zimtsäure (PAL), 20 dpm RES (STS), 1200 dpm NAR (CHS), 80 dpm Cat (LAR) bzw. 0,4  $\mu$ g Epi (ANR).

5 waren schon etwas ledrig, so dass bei diesen Proben mehr die Extraktion störende Inhaltsstoffe vorhanden waren als bei den anderen.

Die Enzymaktivitäten der PAL und CHS stimmen recht gut mit den jeweiligen Genexpressionen überein, wobei das Maximum der Enzymaktivität bei etwas älteren Stadien lag. Die Ergebnisse für die STS-Aktivität sind unsicherer, da nur bei einem der beiden durchgeführten Enzymtests überhaupt eine STS-Aktivität nachgewiesen werden konnte. Im Lauf der Entwicklung sank die LAR-Enzymaktivität, ebenso wie die *LAR2*-Expression, dabei zeigt sich jedoch bei der LAR-Enzymaktivität weder das Maximum beim Blattstadium 2, noch der Anstieg beim Blattstadium 5, wie es bei der *LAR1*-Expression beobachtet werden kann. Zudem war die Intensität der Banden bei der Analyse der *LAR2*-Expression bei gleicher Zyklenzahl deutlich höher als die der *LAR1*. Daraus ist abzuleiten, dass die absolute Expression der *LAR2* in diesen Blattproben die der *LAR1* überwog. Die ANR-Enzymaktivität war in den mittleren Stadien deutlich höher, wogegen die Expression der *ANR* etwa gleichbleibend war. Durch die hohen Standardabweichungen bei der *ANR*-Expression der Blattstadien 1 und 5 sowie der ANR-Enzymaktivität des Stadiums 5 kann nicht entgültig festgestellt werden, ob diese Abweichungen methodisch bedingt sind, oder ob möglicherweise posttranslationale Modifikationen eine Rolle bei der Regulation der ANR-Enzymaktivität spielen.

Flavonoide, insbesondere Flavonole und Anthocyane, werden oft früh in der Entwicklung von Blättern und Früchten als UV-Schutz junger Zellen gebildet (Review in [144]). Dies stimmt mit der generell hohen Expression in den Blattstadien 2 und 3 überein.

Die Expression von Genen der Flavonoidbiosynthese im Verlauf der Blattentwicklung wurde bei *Vitis* im Gegensatz zur Fruchtentwicklung nur selten untersucht. Für die Expression der *FLS* wurde hier eine abnehmende Expression bei größeren Blättern festgestellt, vergleichbar mit bereits veröffentlichten Daten der Expression fünf verschiedener *FLS*-Sequenzen bei der Sorte ‘Cabernet Sauvignon’ [55]. Auch der hier ermittelte Verlauf der *ANS*-Expression mit einem Maximum der Expression bei Blättern mittlerer Größe ist mit veröffentlichten Ergebnissen von Blättern der Sorte ‘Shiraz’ vergleichbar [18]. Die Ergebnisse der gleichen Studie weichen allerdings bezüglich der *ANR*- und *LAR2*-Expression etwas von den Ergebnissen des Versuchs E1 ab. Für die Expression der *LAR1* konnte in der Sorte ‘Shiraz’ kaum eine Expression in Blättern nachgewiesen werden [18], wohingegen hier zumindest in jungen Blättern der Sorte ‘Regent’ eine deutliche Expression zu beobachten war.

Es gibt große Unterschiede in der Expression einiger Gene der Phenylpropanoidbiosynthese zwischen verschiedenen Sorten von *Vitis*. Diese Unterschiede

sind bedeutend im Hinblick auf die Resistenzeigenschaften der einzelnen Sorten.

### Versuch E2 – Fruchtstadien

Allgemein ist bei fast allen Genen bzw. Enzymen der Flavonoidbiosynthese zu beobachten, dass die Genexpression und die Enzymaktivität in kleinen Früchten relativ hoch war und dann wieder zur Reife anstieg (siehe Abb. C.3 auf S. 83). Der Höhepunkt der *ANR*- und *LAR2*-Expression lag bei größeren Früchten und bei beginnender Reife. Auffällige Ausnahme war die *FLS*-Expression. Diese war sehr hoch in den Blüten und in allen Fruchtstadien deutlich niedriger.

Zur Reife (Stadium 85) stiegen die Expressionen der direkt zu Anthocyanen führenden Gene an (*PAL*, *CHS*, *FHT*, *DFR* und *ANS*), aber auch die der *FLS*, *LAR1* sowie *STS*. Die Expression der *ANS* stieg bereits bei beginnender Rotfärbung (BBCH 83) an, darüber hinaus war die *ANS* auch in frühen, ungefärbten Stadien stark exprimiert.

Die Ergebnisse von Enzymaktivität und Expression stimmen bei *PAL*, *FHT* und *ANR* relativ gut überein, wenngleich die Unterschiede zwischen den Stadien teilweise bei der Enzymaktivität geringer ausfielen als bei der Expression. Insbesondere der Anstieg der Enzymaktivität zur reifen Frucht war meist sehr viel geringer. Die Aktivität der *LAR* verlief ähnlich wie die Expression der *LAR2*, der starke Anstieg der *LAR1* in jungen Früchten spiegelte sich nicht in der *LAR*-Enzymaktivität wider. Bei der *CHS* war die Enzymaktivität einer der Proben (BBCH 75) im Vergleich zu den anderen auffällig hoch, obwohl die Expression der *CHS* bei dieser Probe nur geringfügig über den anderen Proben lag. Ursache dieser Unterschiede könnten methodische Probleme bei der Enzymextraktion sein. Die Inhaltsstoffe der Stadien unterscheiden sich stark, so sind in Blüten hohe Konzentrationen von Flavonolen, in jungen Früchten von Proanthocyanidinen und in reifenden Früchten von Zuckern und Säuren. Da diese Inhaltsstoffe bei der Aufarbeitung nicht restlos abgetrennt werden können, ist ein Einfluss auf die gemessene Enzymaktivität denkbar.

Widersprüchlich sind die Ergebnisse zur Stilbensynthese. Obwohl eindeutig *STS*-Genexpression nachgewiesen werden konnte, gelang dies bei der *STS*-Enzymaktivität nicht. Um zu untersuchen, ob möglicherweise spezifische Inhaltsstoffe im Enzymextrakt die Enzymaktivität der *STS* hemmen, wurde der Extrakt mehrerer Proben mit einer heterolog exprimierten *STS* aus *Vitis* gemischt. Überraschenderweise wurde jedoch festgestellt, dass die Zugabe des Enzymextrakts reproduzierbar zu einer deutlichen Steigerung der Aktivität der heterologen *STS* führt (siehe Abb. B.5 auf S. 42).

Es wurden schon mehrfach Studien zur Expression von einzelnen oder mehreren Genen der Flavonoidbiosynthese in verschiedenen Entwicklungsstadien von Weinbeeren veröffentlicht. Die Vergleichbarkeit dieser Ergebnisse mit denen des

## C.4 Ergebnisse und Diskussion – Induktionsversuche

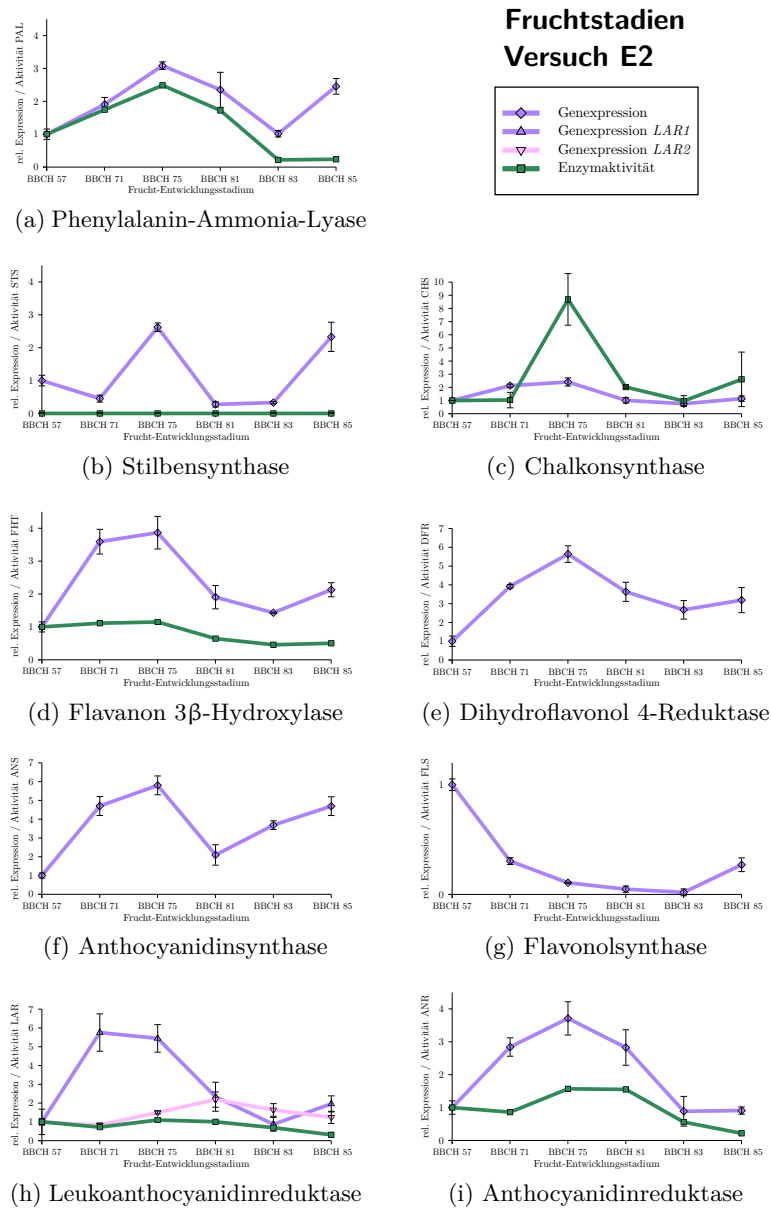


Abbildung C.3: Genexpression und Enzymaktivitäten in verschiedenen Fruchtstadien (Versuch E2), jeweils relativ zu BBCH 57,  $\pm$  SD. Eine y-Achseneneinheit entspricht einer Produktmenge von 2500 dpm Zimtsäure (PAL), 210 dpm NAR (CHS), 480 dpm DHK (FHT), 140 dpm Cat (LAR), 1,75  $\mu$ g Epi (ANR).

Versuchs E2 ist begrenzt. Neben unterschiedlichen Anbau- und Klimabedingungen sowie verschiedenen Analysemethoden (Northern-Blots, Endpunkt-PCRs, Real-Time PCRs) zwischen den einzelnen Studien treten auch starke Sortenunterschiede auf [17, 21, 63]. Dass hier die ganzen Früchte als Probenmaterial verwendet wurden, ist eine zusätzliche Schwierigkeit, da zwar in manchen Studien Fruchtfleisch, Schalen und Samen getrennt analysiert wurden, häufig aber nur die Fruchtschalen. Die Expression von Genen der Flavonoidbiosynthese ist im Fruchtfleisch außer bei sehr jungen Früchten sehr gering [20, 21], in den Samen jedoch wurde zumindest für die veröffentlichten Gene, insbesondere die der Flavanolbiosynthese, eine hohe Expression gemessen [17, 54].

Mehrere *Myb*-Faktoren steuern die Flavonoidbiosynthese in Weinbeeren. *MybA* wird ab der Färbung der Früchte exprimiert und reguliert in erster Linie die *UFGT*-Expression. Die höchste Expression von *MybB* wurde in reifen Beeren gefunden, *MybC* und *MybD* sowie *Myb5a* wurden vor allem in Blüten und jungen Früchten exprimiert [36, 83]. Die Flavanolbiosynthese wird durch *MybPA1*, welches besonders stark in Samen exprimiert wird, reguliert [19]. Allgemein wurde, wie beim Versuch E2, für viele Strukturgene der Flavonoidbiosynthese eine hohe Expression in Blüten und sehr jungen Früchten gemessen, wahrscheinlich unter anderem reguliert durch *MybC*, *MybD* und *Myb5a*. Die Expression in größeren grünen Beeren ist häufig relativ niedrig und steigt dann zur Färbung und Reife wieder an [18, 20], wenn *MybA* und *MybB* exprimiert werden.

In Übereinstimmung mit den hohen Flavonolkonzentrationen in Staubblättern, in denen sie für die Pollenfruchtbarkeit benötigt werden [96], ist die Expression der *FLS* in Blüten besonders hoch. Der Anstieg der *FLS* bei reifenden Früchten könnte darauf zurückzuführen sein, dass Flavonole als Copigmente der Anthocyane vorhanden sind und mit für die Intensität der Beerenfärbung verantwortlich sind [61]. Ähnliche Ergebnisse für die Expression verschiedener *FLS*-Gene (v.a. *FLS4* und *FLS5*) wurden für die Sorte ‘Cabernet Sauvignon’ gefunden [55].

Übereinstimmend mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen [18, 20] war die Expression der *ANS* in frühen Stadien der Fruchtentwicklung hoch, in größeren Beeren niedrig und zur Reife und Fruchtfärbung wieder höher. In frühen Stadien werden wahrscheinlich die Reaktionsprodukte der *ANS*, die Anthocyanidine, durch die ANR-Aktivität in Epicatechine umgewandelt, während der Blütenfärbung werden durch die UFGT farbige Anthocyane daraus gebildet. Es wurde schon vielfach gezeigt, dass die Expression der *UFGT* auf die Stadien nach der *Véraison*, also die Zeit der Beerenfärbung, und damit auf rote Traubensorten beschränkt ist [17, 21, 83].

Die Expression der *ANR* und der *LAR1* erreichte ihr Maximum in frühen Stadien, ähnliche Ergebnisse zeigten auch Genexpressionsanalysen bei anderen

Sorten [18, 54]. Dies entspricht den Erwartungen, da die Konzentration von Flavanolen in jungen Beeren relativ hoch ist [54, 81]. Überraschend war jedoch der leichte Anstieg der *LAR2* zum Beginn der Reife und der deutliche Anstieg der *LAR1* bei reifen Früchten. Ein ähnlicher Anstieg der LAR-Enzymaktivität zu reifenden Früchten wurde auch an Erdbeeren beobachtet [34]. Eine mögliche Erklärung wäre eine durch die LAR katalysierte Rückreaktion von Catechin-Monomeren zu Leukoanthocyanidinen, die dann wiederum durch ANS und UFGT zu farbigen Anthocyanen umgesetzt werden könnten. Eine andere Möglichkeit wäre die verstärkte Produktion von Catechinen durch die LAR, da bekannt ist, dass die ANS in Anwesenheit von UFGT Catechine zu Anthocyanidinen umsetzen kann, die dann durch die UFGT zu Anthocyanen umgesetzt werden [150].

### C.4.3 Versuche ProCa-Behandlung

Im Freiland und *in vitro* kultivierte Weinpflanzen wurden in mehreren Versuchen mit ProCa sowie Pflanzenstärkungsmitteln behandelt.

#### Versuch P1 – ProCa und Pflanzenstärkungsmittel

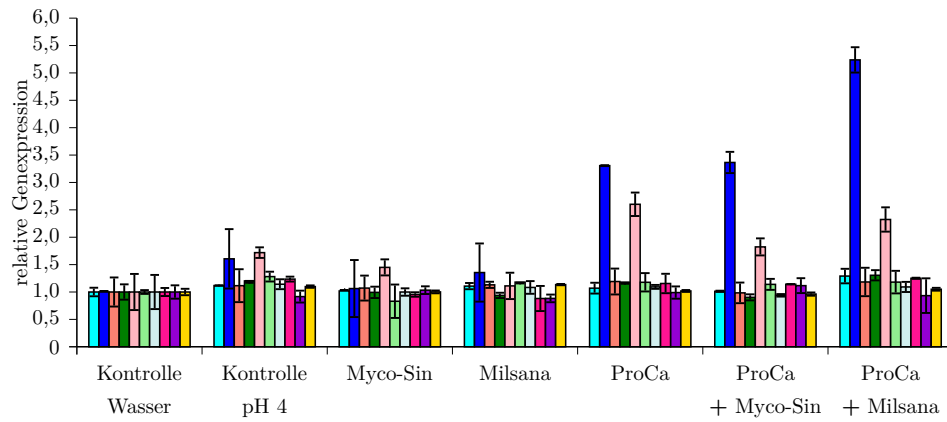
Im Freiland kultivierte Pflanzen wurden mit ProCa, den Pflanzenstärkungsmitteln Milsana und Myco-Sin sowie Kombinationen davon behandelt. Aus den jüngsten Blättern (Blatt 1) wurde die RNA extrahiert und daraus zwei cDNA-Pools synthetisiert, die getrennt voneinander jeweils einmal in quantitativen PCRs auf ihre Genexpression untersucht wurden.

Zudem wurde mit den etwas älteren Blättern (Blatt 3) eine Enzymextraktion vorgenommen und die isolierten Enzymextrakte einmal auf ihre PAL- und zweimal auf ihre CHS- und STS-Aktivität hin analysiert. Die jüngeren Blätter Blatt 1 und Blatt 2 konnten nicht für Enzymanalysen verwendet werden, da die vorhandene Blattmasse zu gering war. Die Ergebnisse der Enzymtests (nicht dargestellt) waren allerdings nicht reproduzierbar. Sie zeigten in den einzelnen Versuchsreihen keine signifikanten Unterschiede durch die Behandlungen. Wahrscheinlich wurden die Enzymaktivitäten durch Reste der ProCa-Formulierung im Enzymextrakt beeinflusst (siehe Abschnitt B.3.1.2 auf S. 40). Da es sich bei ‘Spätburgunder’ möglicherweise um ein Sortengemisch handelte, sind hier nur die Ergebnisse der Sorten ‘Müller-Thurgau’ und ‘Regent’ aufgeführt.

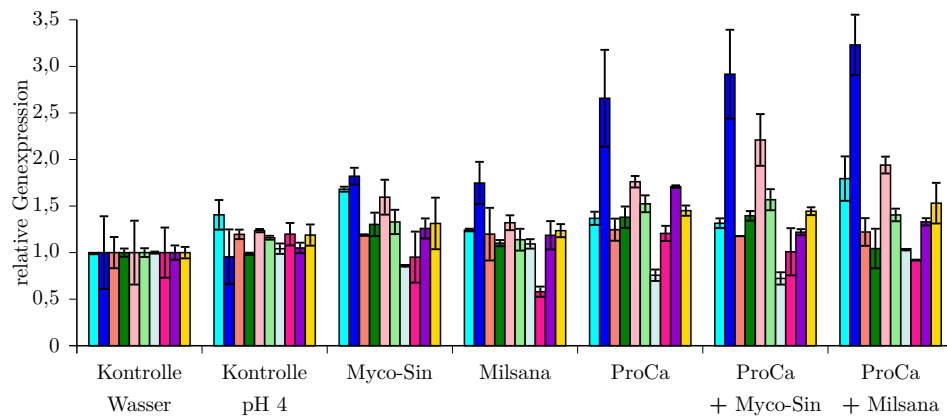
Bezüglich der Genexpression des Blatts 1 konnten mit den optimierten qPCR-Methoden bei den mit ProCa, Myco-Sin, Milsana und Kombinationen hiervon behandelten Blättern deutliche Effekte festgestellt werden. Durch die RNA-Aufreinigung bei der Isolierung war die ProCa-Formulierung hierbei kein Problem. Sowohl bei ‘Regent’ als auch bei ‘Müller-Thurgau’ wurde die Expression



### C.4 Ergebnisse und Diskussion – Induktionsversuche



(a) 'Müller-Thurgau'



(b) 'Regent'

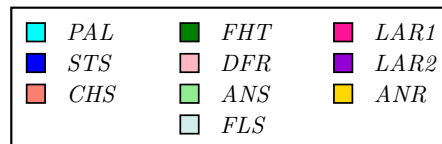


Abbildung C.4: Genexpression bei der Kombinationsbehandlung von ProCa und Pflanzenstärkungsmitteln, Versuch P1, jeweils relativ zur Kontrolle Wasser,  $\pm$  SD.

#### C.4 Ergebnisse und Diskussion – Induktionsversuche

der *STS* durch ProCa stark stimuliert (Abb. C.4 auf S. 86). Bei der Kombination von ProCa mit Pflanzenstärkungsmitteln war dieser Effekt sogar noch stärker, bei der alleinigen Behandlung mit Pflanzenstärkungsmitteln dagegen schwächer. Auffällig ist die stärkere Induktion der *STS* bei der eher pilzanfälligen Weißweinsorte ‘Müller-Thurgau’ (ca. 5-fach) gegenüber der teilresistenten Rotweinsorte ‘Regent’ (ca. 3-fach). Die Expression der *DFR* stieg bei allen Varianten mit ProCa leicht an. Die anderen untersuchten Gene, *PAL*, *CHS*, *FHT*, *ANS*, *FLS*, *ANR*, *LAR1* und *LAR2*, sowie die Kontrollgene *GAPDH* und *TUB* dagegen blieben bei der Sorte ‘Müller-Thurgau’ unverändert. Bei der Sorte ‘Regent’ jedoch zeigten sich noch weitere, wenn auch schwache Effekte. Die Expression der *PAL* stieg bei den mit Myco-Sin oder ProCa plus Milsana behandelten Proben an. Ebenfalls tendenziell gestiegen war die Expression von *ANR*, *LAR2*, und *ANS*, sowie deutlich die Expression von *DFR* und *STS* bei den Behandlungen mit Pflanzenstärkungsmitteln und stärker bei ProCa und Kombinationen. Durch Myco-Sin und ProCa, einzeln oder in Kombination, wurde die *FHT*-Expression etwas erhöht und die *FLS*-Expression etwas erniedrigt. Die *LAR1* wurde durch ProCa etwas stärker exprimiert, durch Milsana etwas schwächer, wobei bei der Kombination dieser beiden Mittel die *LAR1*-Expression im Vergleich zur Kontrolle kaum verändert war.

Die Behandlung von Weinblättern mit ProCa, insbesondere gemeinsam mit den Pflanzenstärkungsmitteln Myco-Sin oder Milsana, führte zu einer deutlichen Induktion der *STS*-Expression und zu einer leichten Steigerung der *DFR*-Expression. Die alleinige Behandlung mit den Pflanzenstärkungsmitteln bewirkte keine signifikanten Expressionsänderungen der untersuchten Gene der Phenylpropanoidbiosynthese.

#### Versuch P2 – ProCa und Leerformulierung

Um die Ergebnisse des Versuchs P1 mit ProCa-Behandlungen von Blättern im Freiland kultivierter Weinpflanzen zu überprüfen, wurden Freilandpflanzen mit ProCa und Leerformulierung behandelt. Die Auswertung dieses Versuchs erfolgte

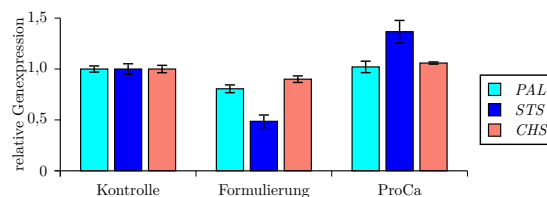


Abbildung C.5: Genexpression bei Freiland-Pflanzen (‘Müller-Thurgau’) nach ProCa-Behandlung, Versuch P2, relativ zur Kontrolle,  $\pm$  SD.

als Teil einer im Rahmen dieser Arbeit betreuten Diplomarbeit (Hadersdorfer, 2006). Von den jüngsten Blättern (Blatt 1) wurde RNA extrahiert und daraus zwei parallele cDNA-Synthesen durchgeführt. Diese wurden gemischt und in je drei, bei der *STS* sechs, qPCRs analysiert. Da sich ‘Spätburgunder’ nachträglich als Sortengemisch herausstellte, sind hier nur die Ergebnisse für die Sorte ‘Müller-Thurgau’ dargestellt.

Bei den Ergebnissen (siehe Abb. C.5 auf S. 87) ist ein deutlicher Effekt sowohl der Formulierung allein als auch der ProCa-Behandlung auf die Expression der *STS* zu erkennen. Durch die Behandlung mit der Leerformulierung verringerte sich die *STS*-Expression auf die Hälfte, ProCa steigerte die *STS*-Expression so stark, dass die Absenkung durch die Formulierung allein überkompensiert wurde. Die Expression der *PAL* und *CHS* verringerte sich durch die Formulierung nur geringfügig, bei der ProCa-Variante war sie gegenüber der Kontrolle unverändert.

Die Induktion der *STS*-Expression durch eine ProCa-Behandlung bei Weinblättern, wie sie schon in Versuch P1 gezeigt wurde, konnte reproduziert werden. Die Induktion ist allein auf den Wirkstoff ProCa zurückzuführen, die Formulierung, mit der der Wirkstoff ausgebracht wird, zeigte allein sogar eine hemmende Wirkung auf die *STS*-Expression.

### Versuch P3 – ProCa *in vitro*-Pflanzen

Die Auswirkungen einer ProCa-Behandlung wurden auch anhand von *in vitro*-Pflanzen untersucht. Die RNA der behandelten Blätter wurde extrahiert und daraus zweimal parallel cDNA synthetisiert. Diese beiden cDNAs wurden getrennt voneinander in jeweils zwei PCR-Reaktionen auf ihre Genexpression hin analysiert. Für eine erfolgreiche Enzymextraktion war leider zu wenig Material vorhanden.

Die Expression der *PAL* und *STS* stieg durch die ProCa-Behandlung sehr deutlich an (siehe Abb. C.6). Die Expression der untersuchten Gene der Flavonoidbiosynthese *CHS*, *ANR*, *LAR1*, *FHT*, *DFR* und *ANS* sank, wobei sich

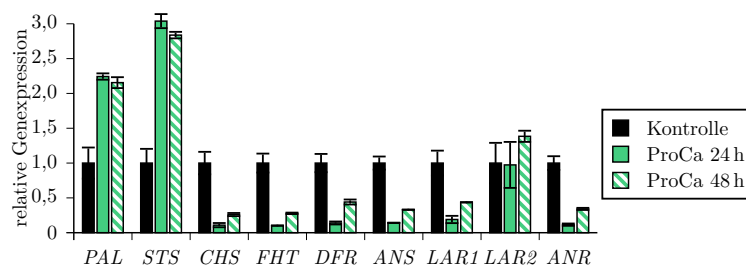


Abbildung C.6: Genexpression bei *in vitro*-Pflanzen nach ProCa-Behandlung, Versuch P3, relativ zur Kontrolle,  $\pm$  SD.

der Effekt 48 h nach Behandlung abschwächte. Die Expression der *LAR2* veränderte sich nicht signifikant. Zusätzlich zu den dargestellten Ergebnissen wurde auch die Expression der *FLS* untersucht, die Expression war aber so gering, dass kein PCR-Produkt nachgewiesen werden konnte. Die parallel durchgeführte Behandlung mit *Aureobasidium*-Extrakt führte zu nahezu identischen Expressionsänderungen (siehe Abb. C.14 auf S. 98)

Bei *in vitro*-Weinpflanzen zeigte sich durch eine ProCa-Behandlung ebenso wie bei Blättern von Freilandpflanzen eine Induktion der *STS*-Expression. Im Gegensatz zu den Blättern von Freilandpflanzen wurde bei den *in vitro*-Pflanzen zusätzlich eine Induktion der *PAL*-Expression sowie die Hemmung fast aller untersuchten Gene der Flavonoidbiosynthese beobachtet.

#### C.4.4 Versuche *Aureobasidium*-Behandlungen

Im Folgenden sind die Ergebnisse mehrerer Versuchsreihen dargestellt, bei denen unterschiedliche Gewebe von *Vitis* mit einer Suspension aus *Aureobasidium*-Extrakt behandelt wurden.

##### C.4.4.1 Kallus

###### Versuch AK1 – Kallus ‘Nero’

Zunächst wurde der Einfluss einer Behandlung von *Vitis*-Kalluskulturen mit *Aureobasidium* sowie Myco-Sin und dem isolierten Hefebestandteil von Myco-Sin untersucht. Dabei wurde zusätzlich eine *Botrytis*-Infektion und -Bonitur *Aureobasidium*-behandelter und unbehandelter Kallusse durchgeführt. Bei diesem Versuch wurde die RNA noch mit dem Standardprotokoll aus dem RNeasy® Plant Mini Kit durchgeführt, wodurch die RNA-Qualität nicht optimal war.

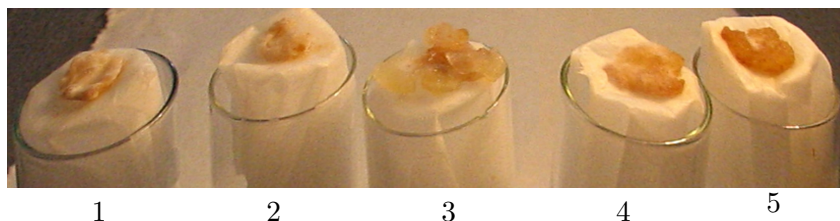
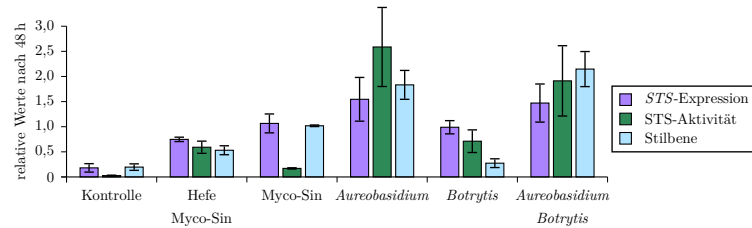
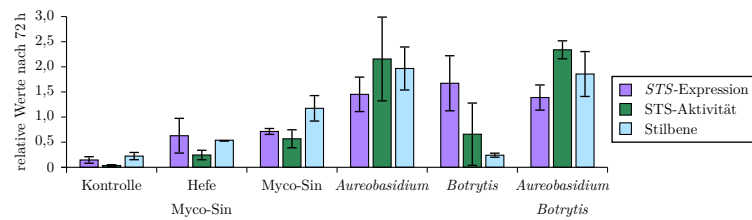


Abbildung C.7: *Botrytis*-Bonitur bei Weinkallussen nach *Aureobasidium*-Behandlung. 1,2: zwei Kallusse mit *Botrytis* infiziert, 3: unbehandelter Kallus, 4, 5: zwei Kallusse 24 h vor der *Botrytis*-Infektion mit *Aureobasidium* behandelt.

## C.4 Ergebnisse und Diskussion – Induktionsversuche



(a) 48 h nach Behandlung



(b) 72 h nach Behandlung

Abbildung C.8: Genexpression ( $\pm$  SD) und Enzymaktivität ( $\pm$  min./max.) der STS und Stilbengehalt (HPLC-Ergebnisse ( $\pm$  SD) nach [Rühmann, unveröffentlicht] von Kallus 'Nero' nach verschiedenen Behandlungen, 48 h und 72 h nach Behandlung. Versuch AK1. Eine y-Achsenheit bedeutet bei der Enzymaktivität der STS eine Produktmenge von 5000 dpm RES, bei den Stilbenen 700  $\mu$ g/g Trockengewicht.

## C.4 Ergebnisse und Diskussion – Induktionsversuche

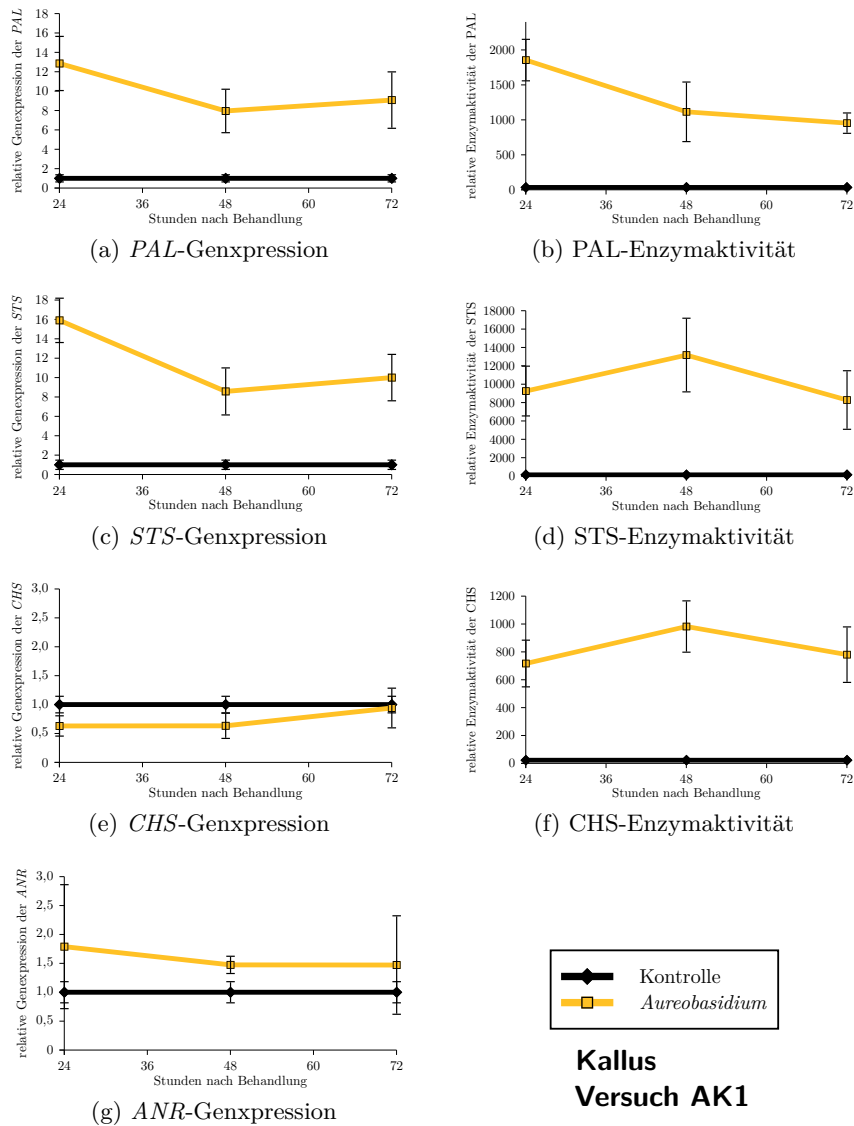


Abbildung C.9: Genexpression und Enzymaktivitäten von Kallus 'Nero' nach *Aureobasidium*-Behandlung. Versuch AK1. Genexpression relativ zur Kontrolle,  $\pm$  SD. Enzymtests ( $\pm$  min./max.) als Produktmengen in dpm: Kontrolle PAL 30 dpm Zimtsäure, STS 140 dpm RES, CHS 20 dpm NAR.

#### C.4 Ergebnisse und Diskussion – Induktionsversuche

Die beiden jeweils aus einer RNA-Präparation parallel synthetisierten cDNAs wurden getrennt voneinander analysiert, wobei pro Gen für jede cDNA eine oder zwei PCR-Reaktionen durchgeführt wurden. Die Enzymextraktion erfolgte nach der Methode A, die Enzymtests wurden nur einmal durchgeführt. Die dargestellten Werte sind jeweils aber Mittelwerte aus den Ergebnissen zweier getrennt voneinander analysierter Kallusse.

Die Ergebnisse der Bonitur (siehe Abb. C.7 auf S. 89) zeigen, dass die *Aureobasidium*-Hefe die *Botrytis*-Infektion der Kallusse deutlich verzögern kann. Ohne *Aureobasidium*-Behandlung waren die Kallusse bereits 24 Stunden nach der Infektion deutlich mit Pilzmyzel überwachsen, 48 Stunden später waren viele bereits abgestorben. Mit *Aureobasidium*-Behandlung vor der Infektion dagegen war bei frühen Boniturterminen nur bei wenigen Kallussen Myzel sichtbar, erst deutlich später wurden auch diese Kallusse von *Botrytis* überwachsen.

Ein deutlicher Anstieg der *STS*- und *PAL*-Expression war durch die *Aureobasidium*-Behandlung sichtbar, auch die Enzymaktivität der entsprechenden Enzyme wurde stark erhöht. Die *ANR*-Expression stieg ebenfalls durch die *Aureobasidium*-Behandlung an. Die Expression der *CHS* war durch die Behandlung tendenziell reduziert. Der Enzymtest der *CHS* ist nicht aussagekräftig, da die Aktivität der *CHS* im Vergleich zur *STS* sehr niedrig war und das gemessene NAR folglich auch ein Produkt der Nebenaktivität der *STS* sein könnte (siehe Abschnitt B.3.1.2 auf S. 39).

Die Genexpression der *STS* und die Enzymaktivität der *STS* stiegen auch durch eine Behandlung mit Myco-Sin oder durch eine Behandlung mit dem isolierten Hefebestandteil des Myco-Sin an, allerdings in geringerem Maß als durch eine *Aureobasidium*-Behandlung (Abb. C.8 auf S. 90). Die mit Myco-Sin und Hefe-Myco-Sin behandelten Proben waren jeweils 48 h und 72 h nach Behandlung bezüglich ihrer Enzymaktivität recht unterschiedlich. Dies kann durch den geringen Probenumfang von nur zwei Kallussen je Zeitpunkt erklärt werden.

Ein Vergleich der Stilbenkonzentrationen im Gewebe [Rühmann, unveröffentlicht] mit den relativen Genexpressionen und Enzymaktivitäten (Abb. C.8 auf S. 90) zeigt, dass diese drei Werte bei den einzelnen Behandlungen jeweils in ähnlichem Maße beeinflusst wurden. Eine Ausnahme bildet die Infektion mit *Botrytis*. Obwohl die Expression der *STS* stark induziert wurde und auch die Enzymaktivität der *STS* gegenüber der unbehandelten Kontrolle stark zunahm, stieg der Stilbengehalt nur wenig an. Eine mögliche Ursache dafür ist der Abbau von Resveratrol durch die Stilbenoxidase von *Botrytis*, wodurch der Aufbau einer wirksamen Abwehrreaktion durch Stilbene verhindert wird [6, 59]. Wenn in den Weinkallussen schon während der Infektion durch die vorangegangene *Aureobasidium*-Behandlung hohe Konzentrationen der fungitoxischen

Stilbene vorhanden sind, wird die *Botrytis*-Infektion trotz der Stilbenoxidase beeinträchtigt.

Die Behandlung von Weinkallussen mit *Aureobasidium*-Extrakt, und in geringerem Maße mit Myco-Sin oder dessen Hefebestandteil, führte zu einer deutlichen Induktion der Phenylpropanoidbiosynthese, insbesondere der Stilbene. Schon 24 h nach der Behandlung war dies deutlich zu beobachten. Eine Vorbehandlung mit *Aureobasidium*-Extrakt verzögerte eine *Botrytis*-Infektion der Kallusse sichtbar.

#### **Versuch AK2 – Kallus ‘Regent’**

Ein weiterer Versuch mit Kallussen der Sorte ‘Regent’ wurde durchgeführt, um den Zeitverlauf der Reaktion von Kallussen auf die *Aureobasidium*-Behandlung näher zu analysieren. Bei diesem Versuch wurde die verbesserte RNA-Extraktion aus Kallussen mit dem RNeasy<sup>®</sup> Plant Mini Kit durchgeführt. Aus der RNA wurden jeweils drei cDNA-Pools synthetisiert, die anschließend gemischt wurden. Es wurden für jedes Gen drei qPCR-Reaktionen ausgeführt, bei *LAR1* und *ANR* waren es vier qPCRs. Für die Enzymaufarbeitung wurde die Methode B verwendet. Die Enzymtests wurden jeweils zweimal durchgeführt.

Die Ergebnisse der Enzymtests zeigen, dass die PAL- und STS-Aktivität durch die *Aureobasidium*-Behandlung stark anstieg, mit einem Maximum bei 10 h nach Behandlung. Die CHS-Aktivität verlief parallel zu der der STS, jedoch auf deutlich niedrigerem Niveau, möglicherweise handelt es sich beim detektierten Naringenin um ein Nebenprodukt der STS-Reaktion.

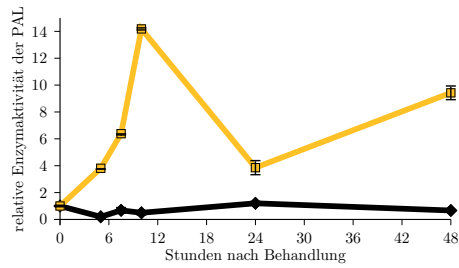
Vor allem bei den Expressionen war allgemein zu beobachten, dass die Werte der Probe »*Aureobasidium* 24 h« stark von den anderen mit *Aureobasidium* behandelten Proben abwichen. Des Weiteren war zu beobachten, dass die Kontrollbehandlung ebenfalls einen Einfluss auf die Genexpression hatte. Die Expression der *DFR* sank durch die Zugabe von Leermedium, die von *FHT*, *DFR*, *ANS* und *LAR1* stieg. Die Expression der *FHT* und *LAR1* war nach 48 h wieder bis auf das Niveau vor der Behandlung gesunken, die der *ANS* blieb leicht erhöht, die der *DFR* leicht erniedrigt.

Die *Aureobasidium*-Behandlung hatte deutliche Auswirkungen auf die Genexpression der Kallusse. Die Expression der *PAL*, *STS* und *LAR2* stieg gegenüber der Kontrolle deutlich an. Das Maximum der Expression lag bei 10 h (*PAL* und *STS*) bzw. 5 h (*LAR2*) nach Behandlung. Dies stimmt gut mit den Ergebnissen der PAL- und STS-Enzymtests überein.

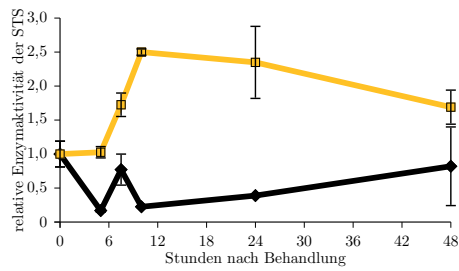
Im Fall der *FHT*, *DFR* und *LAR1* war die Expression bis 10 h nach Behandlung deutlich niedriger als bei der Kontrolle, danach erfolgte ein Anstieg der Expression bis zum Niveau der Kontrollen, bei der *FHT* sogar darüber hinaus. Im Gegensatz zum Anstieg der Expression bei der Kontrolle blieb die Expression



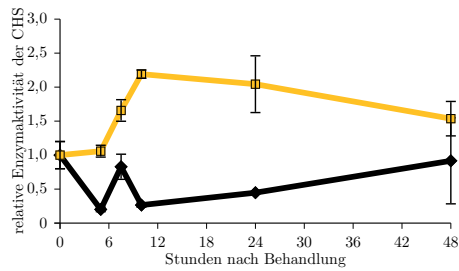
C.4 Ergebnisse und Diskussion – Induktionsversuche



(a) PAL-Enzymaktivität



(b) STS-Enzymaktivität



(c) CHS-Enzymaktivität



Abbildung C.10: Enzymaktivitäten von Kallus 'Regent' nach *Aureobasidium*-Behandlung. Versuch AK2. Werte jeweils bezogen auf die Kontrolle zum Zeitpunkt Null,  $\pm$  SD, eine y-Achseneneinheit bedeutet eine Produktmenge von 60 dpm Zimtsäure (PAL), 1500 dpm RES (STS) bzw. 360 dpm NAR (CHS).

## C.4 Ergebnisse und Diskussion – Induktionsversuche

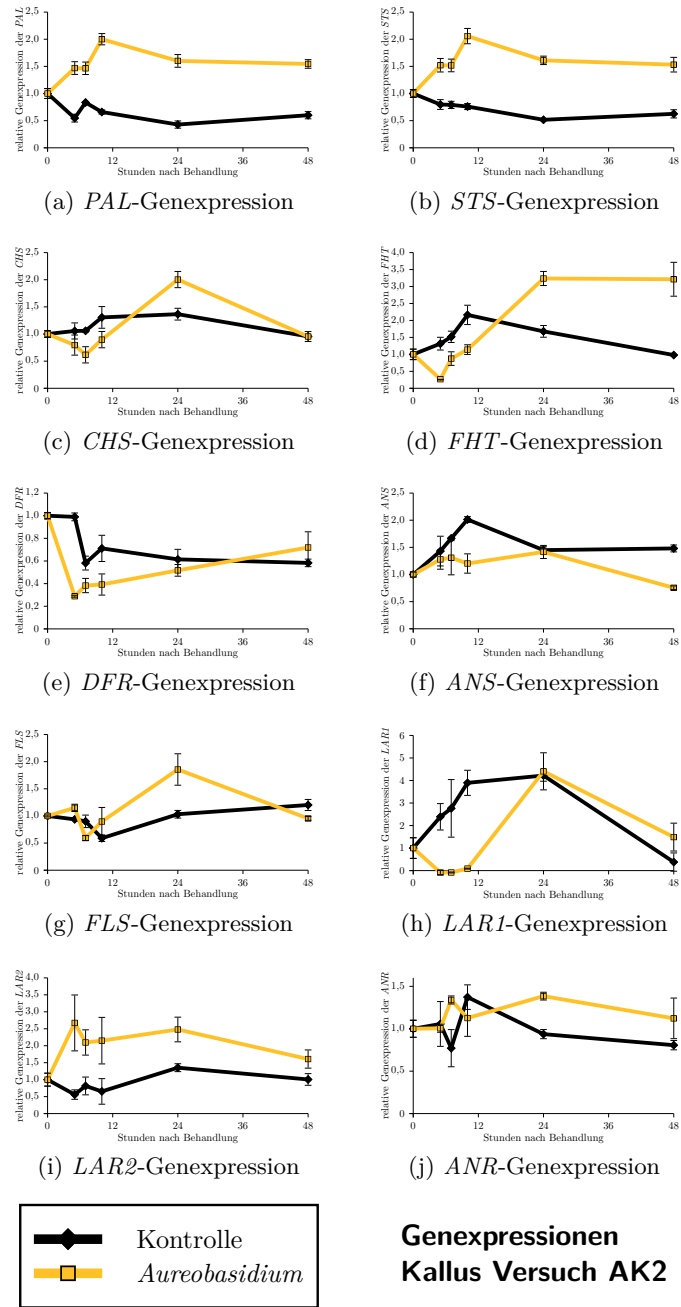


Abbildung C.11: Genexpression von Kallus 'Regent' nach *Aureobasidium*-Behandlung, relativ zur Kontrolle 0 h,  $\pm$  SD. Versuch AK2.

C.4 Ergebnisse und Diskussion – Induktionsversuche

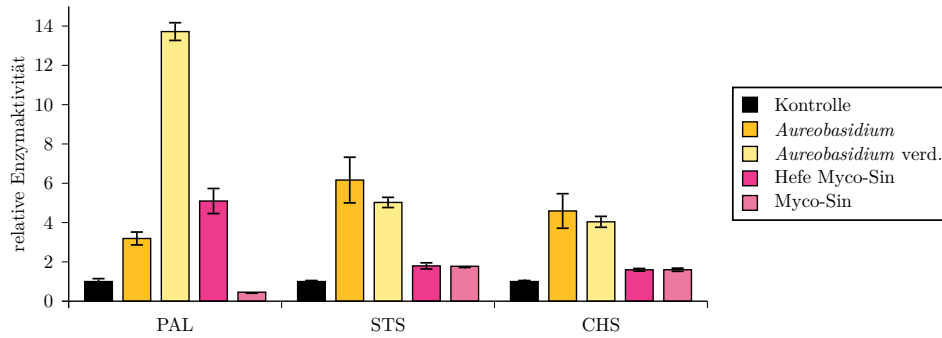


Abbildung C.12: Enzymaktivitäten von Kallus ‘Regent’, Versuch AK2. 24 h nach verschiedenen Behandlungen, relativ zur Kontrolle 24 h,  $\pm$  SD. Eine y-Achseneneinheit bedeutet eine Produktmenge von 70 dpm Zimtsäure (PAL), 300 dpm RES (STS) bzw. 100 dpm NAR (CHS).

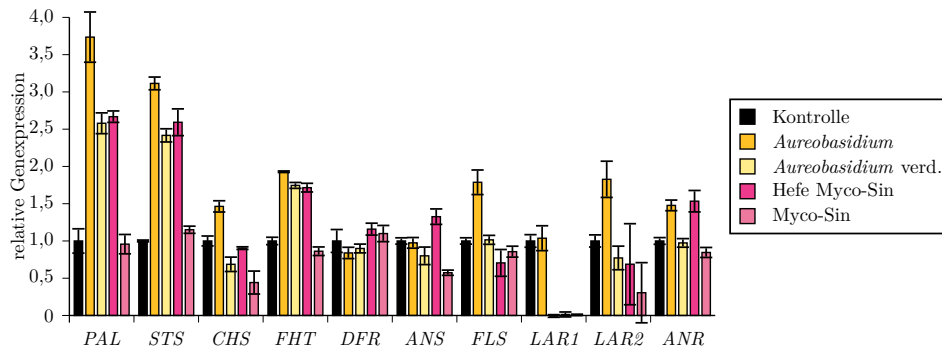


Abbildung C.13: Genexpressionen von Kallus ‘Regent’, Versuch AK2. 24 h nach verschiedenen Behandlungen, relativ zur Kontrolle 24 h,  $\pm$  SD.

der *ANS* nach der *Aureobasidium*-Behandlung etwa gleich.

Die Expression der *CHS*, *FLS* und *ANR* blieb bei den Kontrollen etwa gleich, die Variante mit *Aureobasidium* zeigte 24 h nach Behandlung eine höhere Expression als die Kontrolle.

Die Behandlungen mit verdünnter *Aureobasidium*-Suspension und dem Hefebestandteil von Myco-Sin (Abb. C.12 und Abb. C.13 auf S. 96) zeigten ähnliche Effekte wie die *Aureobasidium*-Behandlung, also insbesondere eine deutliche Induktion der Genexpression und Enzymaktivität der STS und PAL, wobei die Wirkung des Hefebestandteils von Myco-Sin etwas schwächer als die der anderen Varianten war. Die alleinige Behandlung mit Myco-Sin zeigte nur wenig Veränderungen gegenüber der Kontrolle, etwa eine leicht erhöhte STS-Aktivität und verminderte Genexpression der *LAR1* und *LAR2*.

Auffällig ist außerdem, dass die Probe, die 24 h nach *Aureobasidium*-Behandlung entnommen wurde, oft große Abweichungen gegenüber anderen Zeitpunkten aufwies, insbesondere bei der Expression der *CHS*, *FLS* und *LAR1* sowie der PAL-Aktivität. Da jede Probe durch das nur in begrenzter Menge verfügbare Material eine Mischprobe aus nur fünf Kallussen war und die einzelnen Kallusse sich teilweise deutlich in der Größe unterschieden, ist ein Einfluss des Ausgangsmaterials nicht auszuschließen.

Eine mögliche Ursache für die Änderungen der Genexpressionen und Enzymaktivitäten in der Kontrollvariante könnte die Zugabe des Leermediums mit neuem Zucker und Hormonen zum Kulturmedium sein. Es ist beispielsweise bekannt, dass der Promotor der *ANS*, deren Expression in diesem Versuch bereits 5 h nach Zugabe des Leermediums deutlich anstieg, durch Saccharose induziert werden kann [60].

Auch bei diesem Versuch mit *Aureobasidium*-Behandlung von Weinkallussen zeigte sich, dass *Aureobasidium*-Extrakt, und in geringerem Maße der Hefebestandteil von Myco-Sin, die Expression und Enzymaktivität der PAL und STS schon 5 h nach Behandlung stark erhöht, mit einem Maximum bei 10 h–24 h. Durch HPLC-Analysen [Rühmann, unveröffentlicht] wurde nachgewiesen, dass der Gehalt an Gesamtphenolen, Resveratrol und Resveratrol-Derivaten durch die *Aureobasidium*-Behandlung tatsächlich anstieg. Es wurde also die Phenylpropanoidbiosynthese gleichzeitig verstärkt und in Richtung Stilbene umgeleitet. Zumindest eine Tendenz ist erkennbar, dass durch die *Aureobasidium*-Behandlung auch die Biosynthese anderer abwehrrelevante Inhaltsstoffe wie Flavonole und Flavanole verstärkt wurde.

#### C.4.4.2 *in vitro*-Pflanzen

Es wurden insgesamt drei Versuche mit *Aureobasidium*-Behandlungen an *in vitro*-Pflanzen durchgeführt (siehe Tab. E.3 auf S. 126). Dabei gab es Unterschiede bezüglich der Zugabe von Leerformulierung und der Behandlungsmethode. Die *Aureobasidium*-Suspension wurde im Versuch AI1 direkt ins Medium gegeben, bei den beiden Versuchen AI2 und AI3 wurden die Blätter besprüht. Beim Versuch AI1 wurde allen Behandlungen die Leerformulierung von ProCa zugegeben, bei Versuch AI2 wurde nur Medium verwendet. Deshalb wurden in Versuch AI3 sowohl Behandlungen mit als auch ohne Formulierung durchgeführt, um einen möglichen Effekt der Leerformulierung zu untersuchen, wobei die Formulierung leider zu hoch dosiert war und zu Pflanzenschäden führte.

##### Versuch AI1 – *in vitro*-Pflanzen

Die RNA der behandelten Blätter des Versuchs AI1 wurde extrahiert und daraus zweimal parallel cDNA synthetisiert. Diese beiden cDNAs wurden getrennt voneinander in jeweils zwei PCR-Reaktionen auf ihre Genexpression hin analysiert. Für eine erfolgreiche Enzymextraktion war leider zu wenig Material vorhanden.

Die Expression der *PAL* und *STS* stieg durch die *Aureobasidium*-Behandlung deutlich an (siehe Abb. C.14), vergleichbar mit dem Versuch AK1 (Kallus ‘Nero’). Dagegen sank die Expression der Flavonoidgene *CHS*, *ANR*, *LAR1*, *FHT*, *DFR* und *ANS*, wobei sich der Effekt 48 h nach Behandlung abschwächte. Die Expression der *LAR2* veränderte sich nicht signifikant. Zusätzlich zu den dargestellten Ergebnissen wurde auch die Expression der *FLS* untersucht, die Expression war aber so gering, dass kein PCR-Produkt nachgewiesen werden konnte. Die parallel durchgeführte Behandlung mit ProCa führte zu nahezu identischen Expressionsänderungen (Abb. C.6 auf S. 88)

ProCa reguliert durch die veränderten Flavonoidgehalte die Genexpression der Flavonoidgene. Es ist anzunehmen, dass auch die Elicitoren aus *Aureobasidium* über Regulationsmechanismen wirken, wodurch die Ähnlichkeit der Ergebnisse

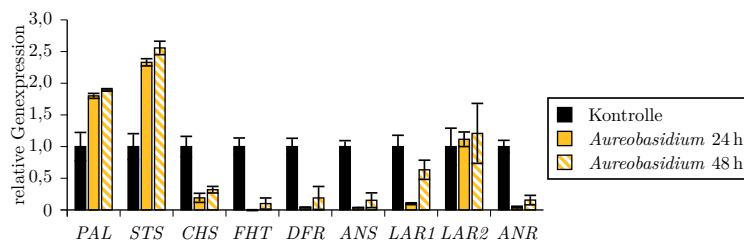


Abbildung C.14: Genexpression bei *in vitro*-Pflanzen nach *Aureobasidium*-Behandlung. Versuch AI1. Werte relativ zur Expression der Kontrolle,  $\pm$  SD.

erklärt werden kann.

Durch eine Behandlung von *in vitro*-Weinpflanzen mit *Aureobasidium*-Extrakt wurde die Expression der *PAL* und *STS* induziert, die meisten untersuchten Gene der Flavonoidbiosynthese wurden in ihrer Expression gehemmt, die Phenylpropanoidbiosynthese wurde somit erhöht und stark in Richtung der Stilbene umgeleitet.

#### **Versuch AI2 – *in vitro*-Pflanzen**

Bei der Auswertung des Versuchs AI2 wurde von der extrahierten RNA dreimal parallel cDNA synthetisiert und die cDNAs anschließend gemischt. Für jede Genexpression wurden drei qPCR-Reaktionen durchgeführt, bei *STS*, *CHS* und *GAPDH* sechs PCRs. Darüber hinaus wurden die Enzymextrakte (Methode B) jeder Probe auf ihre Enzymaktivität hin untersucht. Dazu wurde der PAL-Test dreimal, der CHS- und STS-Test viermal und der ANR-Test zweimal wiederholt.

Die Aktivität der PAL stieg durch die *Aureobasidium*-Behandlung leicht, die der STS stark an. Die CHS- und ANR-Aktivität blieb unverändert (Abb. C.15 auf S. 100). Damit sind auch die Ergebnisse der Enzymaktivität mit den Ergebnissen des Kallusversuchs (Versuch AK1) vergleichbar. Da *in vitro*-Pflanzen offenbar von vornherein weniger STS und mehr CHS-Aktivität als Kallusse haben, war hier auch der CHS-Test aussagekräftig. Ein Konkurrenztest CHS und STS mit weniger p-Cumaroyl-CoA brachte keine zusätzlichen Erkenntnisse. Ein FLS-Test ergab keine sichtbare Enzymaktivität.

Bei den Genexpressionen (Abb. C.15 auf S. 100) zeigte sich deutlich, dass die Expression der *STS* und *PAL* durch die *Aureobasidium*-Behandlung anstieg. Die Analyse der *FLS*-Expression gelang nicht, wahrscheinlich ist die Expression extrem niedrig. Bei den anderen untersuchten Genen zeigte sich kein eindeutiges Bild, da eine der beiden *Aureobasidium*-Behandlungen deutlich von der anderen abwich. Möglicherweise kamen die Unterschiede dadurch zustande, dass bei einem Teil der Proben die *Aureobasidium*-Suspension auf das Medium tropfte und dann über die Wurzeln aufgenommen wurde und bei einem anderen Teil die Aufnahme nur über das Blatt erfolgte.

Bei der Wiederholung der *Aureobasidium*-Behandlung an *in vitro*-Weinpflanzen bestätigte sich die deutliche Induktion der Expression und Enzymaktivität der PAL und STS durch den *Aureobasidium*-Extrakt. Die Änderungen der Expressionen der Flavonoidgene blieben durch die großen Abweichungen der beiden mit *Aureobasidium* behandelten Mischproben unklar.

#### **Versuch AI3 – *in vitro*-Pflanzen**

Die Extraktion von RNA aus den Proben des Versuchs AI3 war sehr schwierig, vor allem bei den mit Formulierung behandelten Proben. Die Qualität der

#### C.4 Ergebnisse und Diskussion – Induktionsversuche

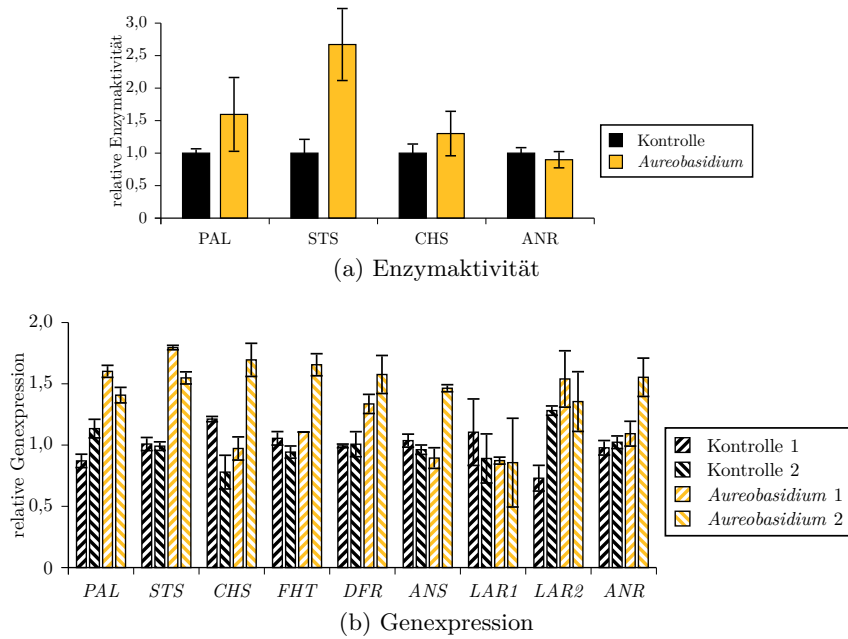


Abbildung C.15: Genexpression (b) und Enzymaktivitäten (a) bei *in vitro*-Pflanzen nach *Aureobasidium*-Behandlung. Versuch AI2. Alle Werte relativ zum Mittelwert der Kontrolle,  $\pm$  SD. Eine y-Achsenheit bei den Enzymaktivitäten bedeutet eine Produktmenge von 1100 dpm Zimtsäure (PAL), 220 dpm RES (STS), 150 dpm NAR (CHS); ANR: relativ Werte.

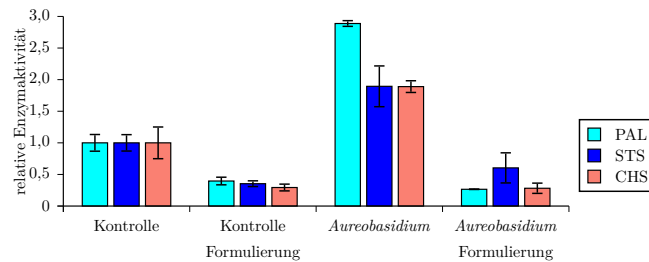


Abbildung C.16: Enzymaktivitäten bei *in vitro*-Pflanzen nach *Aureobasidium*-Behandlung. Versuch AI3. Alle Werte sind relativ zur Kontrolle,  $\pm$  SD, eine y-Achsenheit bedeutet eine Produktmenge von 180 dpm Zimtsäure (PAL), 290 dpm RES (STS), 340 dpm NAR (CHS).

extrahierten RNA war relativ gering, wodurch schon die Werte für die Expression der *GAPDH* zwischen den einzelnen Proben stark unterschiedlich war. Daher sind für diesen Versuch keine auswertbaren Expressionsdaten vorhanden. Die Enzymextraktion dagegen gelang ohne Probleme, die Enzymtests wurden jeweils zweimal durchgeführt.

Durch die zu hohe Konzentration der Formulierung waren die damit behandelten Proben in ihrer Enzymaktivität allgemein stark gehemmt (siehe auch Abschnitt B.3.1.2 auf S. 40). Bei den Proben ohne Formulierung war aber die Aktivität der Enzyme PAL, CHS und STS durch die *Aureobasidium*-Behandlung deutlich erhöht (Abb. C.16 auf S. 100).

Die bei den vorhergehenden Versuchen mit einer *Aureobasidium*-Behandlung von *in vitro*-Weinpflanzen beobachtete Induktion der Stilbenbiosynthese konnte hier bezüglich der erhöhten Enzymaktivität von PAL und STS reproduziert werden. Zusätzlich wurde bei diesem Versuch auch ein Anstieg der CHS-Enzymaktivität beobachtet.

#### C.4.4.3 Blüten

##### Versuch AB1 – Blüten Gewächshaus

Ein erster Versuch zum Einfluss einer Behandlung mit *Aureobasidium*-Extrakt auf Weinblüten wurde an im Gewächshaus kultivierten Pflanzen durchgeführt. Im Folgenden werden nur die Ergebnisse der Sorten ‘Müller-Thurgau’ und ‘Regent’ betrachtet, da sich die behandelten ‘Spätburgunder’-Pflanzen im nachhinein als Sortengemisch herausstellten. Es wurden von jeder Probe zwei Enzymaufarbeitungen mit der Methode B durchgeführt und gemischt. Jeder Enzymtest wurde viermal wiederholt. Für die Analyse der Genexpression wurde für jede Probe eine RNA-Extraktion durchgeführt. Aus jeder RNA wurde dreimal parallel cDNA synthetisiert, diese cDNA-Pools wurden gemischt und dann jeweils in drei qPCR-Reaktionen untersucht.

Die in Abb. C.17 auf S. 102 dargestellten Ergebnisse der Enzymtests zeigen deutlich, dass die *Aureobasidium*-Behandlung bei beiden untersuchten Sorten die Aktivität der STS stark ansteigen ließ, mit einem Maximum schon 24 h nach der Behandlung. Die CHS- und PAL-Aktivität scheint im Lauf der Entwicklung anzusteigen, unabhängig von der Behandlung. Bei ‘Regent’ war dies besonders deutlich ausgeprägt. Insbesondere bei der Sorte ‘Regent’ scheint 72 h nach der Behandlung die Aktivität dieser beiden Enzyme durch die Behandlung mit *Aureobasidium*-Extrakt geringer als nach der Kontrollbehandlung zu sein.

Bei den Ergebnissen der Genexpression (‘Müller-Thurgau’ Abb. C.18 auf S. 103 und ‘Regent’ Abb. C.19 auf S. 104) ist zunächst auffällig, dass sich im Verlauf



## C.4 Ergebnisse und Diskussion – Induktionsversuche

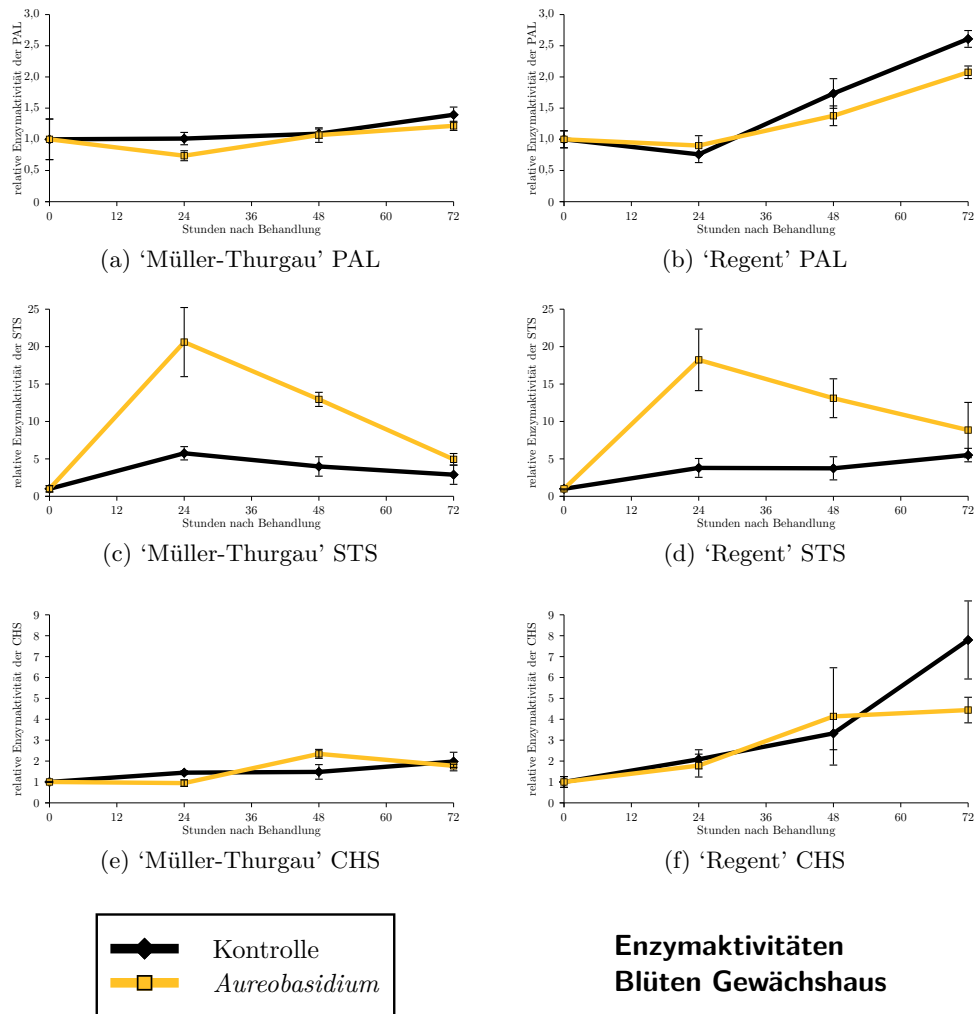


Abbildung C.17: Enzymaktivitäten bei *Aureobasidium*-behandelten Blüten im Gewächshaus, 'Müller-Thurgau' (links) und 'Regent' (rechts). Versuch AB1. Alle Werte sind relativ zur Kontrolle zum Zeitpunkt Null,  $\pm$  SD. Eine y-Achseneneinheit entspricht bei 'Müller-Thurgau' einer Produktmenge von 3100 dpm Zimtsäure (PAL) 30 dpm RES (STS) bzw. 3400 dpm NAR (CHS). Bei 'Regent' 2200 dpm Zimtsäure (PAL), 15 dpm RES (STS) bzw. 1200 dpm NAR (CHS).

## C.4 Ergebnisse und Diskussion – Induktionsversuche

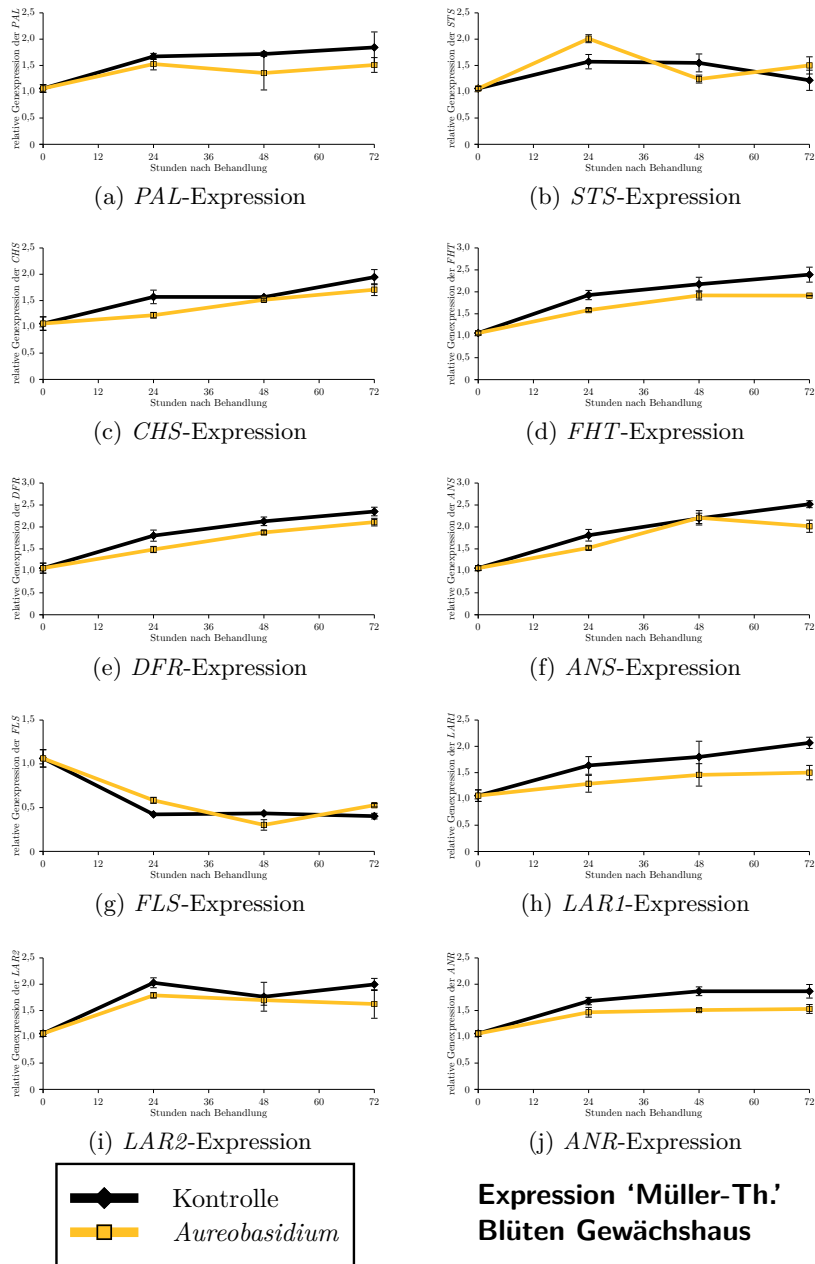


Abbildung C.18: Genexpression bei *Aureobasidium*-behandelten Blüten 'Müller-Thurgau' im Gewächshaus. Versuch AB1. Alle Werte sind relativ zur Kontrolle zum Zeitpunkt Null,  $\pm$  SD.

### C.4 Ergebnisse und Diskussion – Induktionsversuche

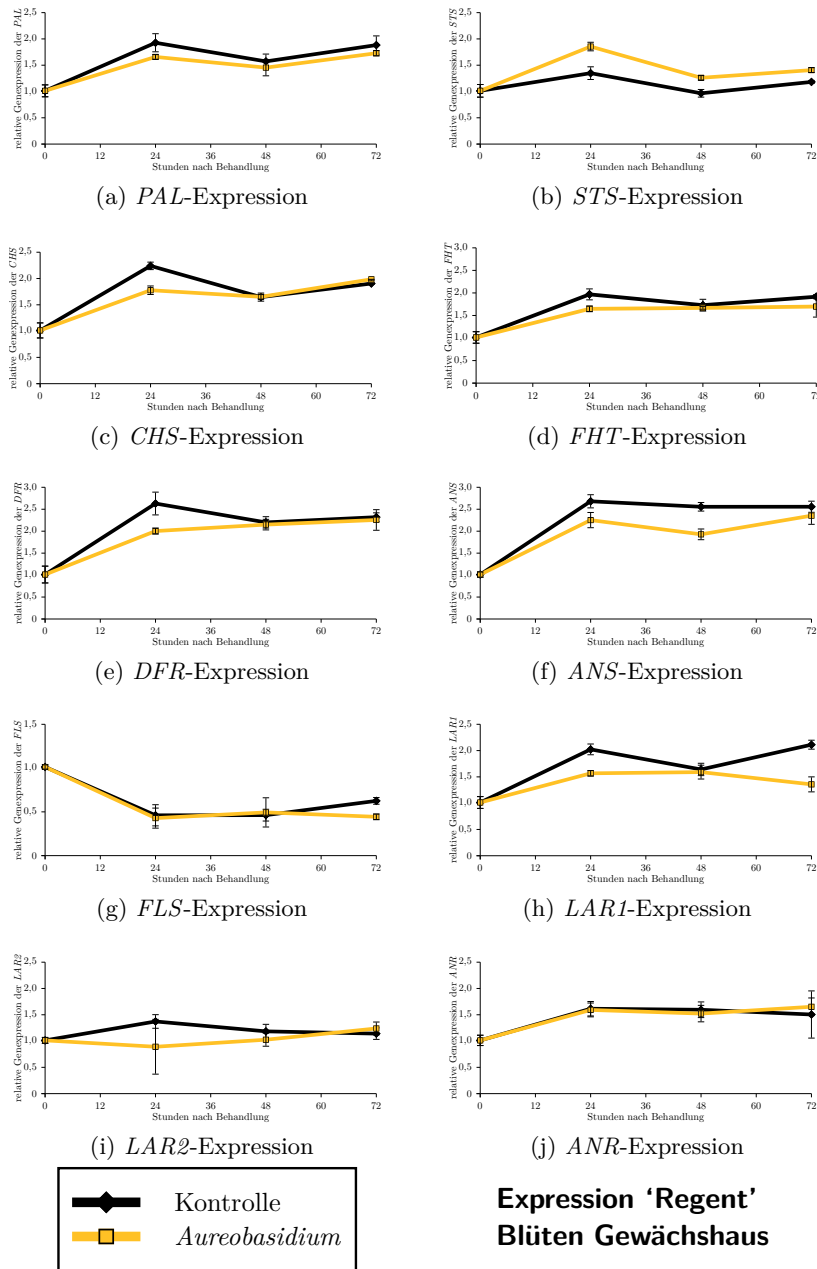


Abbildung C.19: Genexpression bei *Aureobasidium*-behandelten Blüten 'Regent' im Gewächshaus. Versuch AB1. Alle Werte sind relativ zur Kontrolle zum Zeitpunkt Null,  $\pm$  SD.

des Experiments die Expression aller Gene auch bei der Kontrollbehandlung veränderte. Meist stieg die Expression, vor allem zwischen Versuchsbeginn und 24 h nach Behandlung, wahrscheinlich durch Entwicklungsvorgänge beim Übergang von der Blüte zur frühen Fruchtentwicklung, möglicherweise aber auch durch einen Einfluss des Leermediums. Abweichend davon ist die *FLS*, deren Expression während des Versuchs stark abnahm. Für die *FLS*, deren Produkte für die Pollenfertilität und den UV-Schutz junger Zellen wichtig sind, wurde eine ähnliche Abnahme während der Entwicklung auch schon im Versuch E2 beobachtet (Abschnitt C.4.2 auf S. 82).

Dagegen ist allein auf die Expression der *STS* ein induzierender Effekt der *Aureobasidium*-Behandlung erkennbar. Schon 24 h nach der Behandlung scheint bei beiden Sorten das Maximum der Induktion erreicht zu werden. Alle anderen untersuchten flavonoidspezifischen Gene sowie die *PAL* zeigten eine teils deutliche, teils tendenzielle Verminderung der Expression durch die *Aureobasidium*-Behandlung. Bei diesem Versuch konnte, im Gegensatz zu früheren, keine Induktion der *PAL*-Expression beobachtet werden. Offenbar wurde bei diesem Versuch p-Cumaroyl-CoA in Richtung Stilbene umgeleitet, ohne die Phenylpropanoidbiosynthese als Ganzes zu verstärken.

Bei der HPLC-Analyse dieses Versuchs [Rühmann, unveröffentlicht] wurden in Übereinstimmung mit den hier erzielten Ergebnissen deutlich erhöhte Stilbenkonzentrationen durch die *Aureobasidium*-Behandlung gemessen. Jedoch wurden tendenziell auch größere Mengen von Flavonoiden, insbesondere Flavanolen und Flavonolen, durch die *Aureobasidium*-Behandlung gefunden.

Zusammenfassend war bei der Behandlung von Blüten im Gewächshaus mit *Aureobasidium*-Extrakt zu beobachten, dass sowohl bei ‘Müller-Thurgau’ als auch bei ‘Regent’ die Gene und Enzyme der Phenylpropanoid- (*PAL*) und Flavonoidbiosynthese konstant blieben oder leicht gehemmt wurden, die Stilbenbiosynthese durch die *STS* aber deutlich erhöht wurde.

#### **Versuch AB2 – Blüten Freiland**

Dieser Versuch sollte zeigen, ob auch im Freiland kultivierte Weinblüten auf eine Behandlung mit *Aureobasidium*-Extrakt reagieren. Da das Maximum der *STS*-Aktivität beim Versuch AB1 bei 24 h nach Behandlung lag, wurden bei dieser zweiten Behandlung von Blüten die Proben schon 12 h und 24 h nach der Behandlung entnommen. Von jeder Probe wurden zwei Enzymaufarbeitungen (Methode B) vorgenommen, die getrennt analysiert wurden. Insgesamt wurden für jedes Enzym vier Tests durchgeführt. Für die Expressionsanalysen wurden aus einer RNA-Extraktion drei cDNA-Synthesen durchgeführt und gemischt, diese wurden in je drei qPCR-Reaktionen analysiert.

Bei den Kontrollen zeigte sich, dass die Aktivität der *STS* während des

### C.4 Ergebnisse und Diskussion – Induktionsversuche

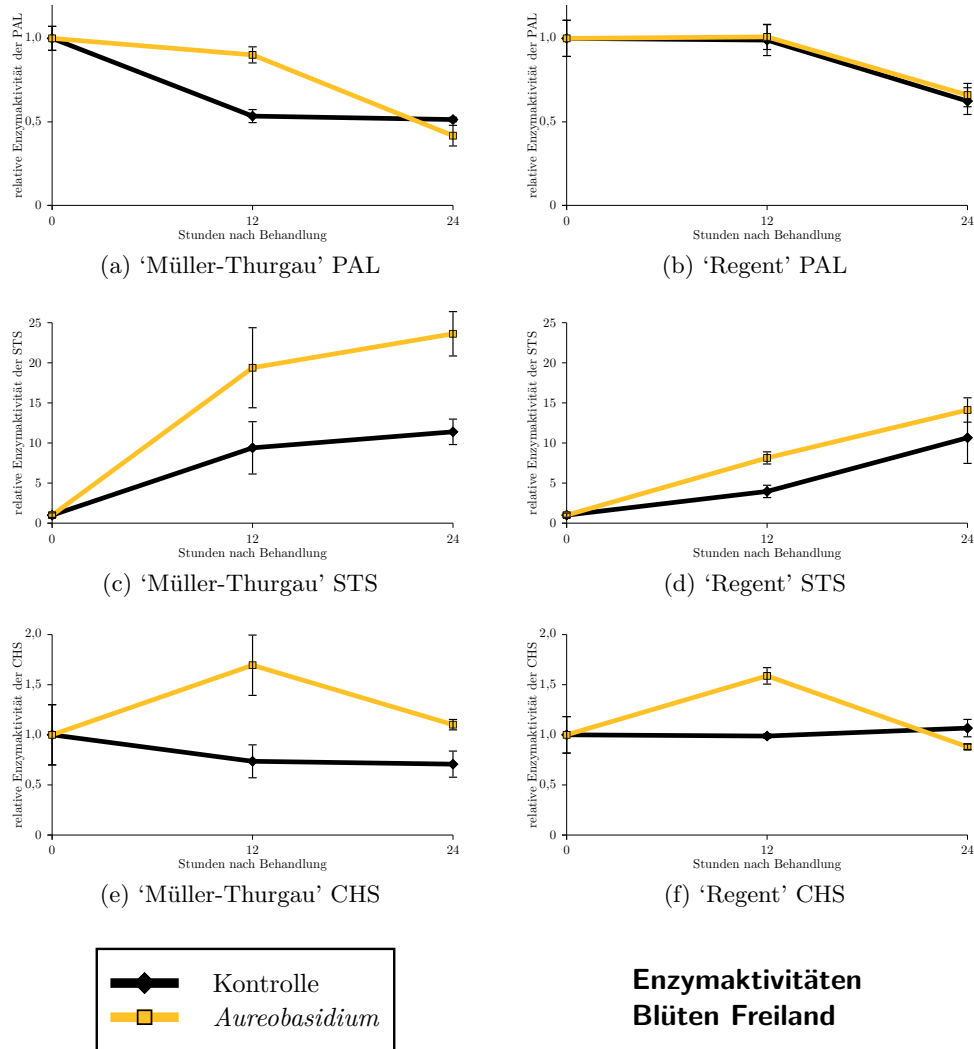


Abbildung C.20: Enzymaktivitäten bei *Aureobasidium*-behandelten Blüten im Freiland, 'Müller-Thurgau' (links) und 'Regent' (rechts). Versuch AB2. Alle Werte sind relativ zur Kontrolle 0 h,  $\pm$  SD, eine y-Achseneneinheit bedeutet eine Produktmenge von 2000 dpm Zimtsäure (PAL), 50 dpm RES (STS) bzw. 2000 dpm NAR (CHS).

## C.4 Ergebnisse und Diskussion – Induktionsversuche

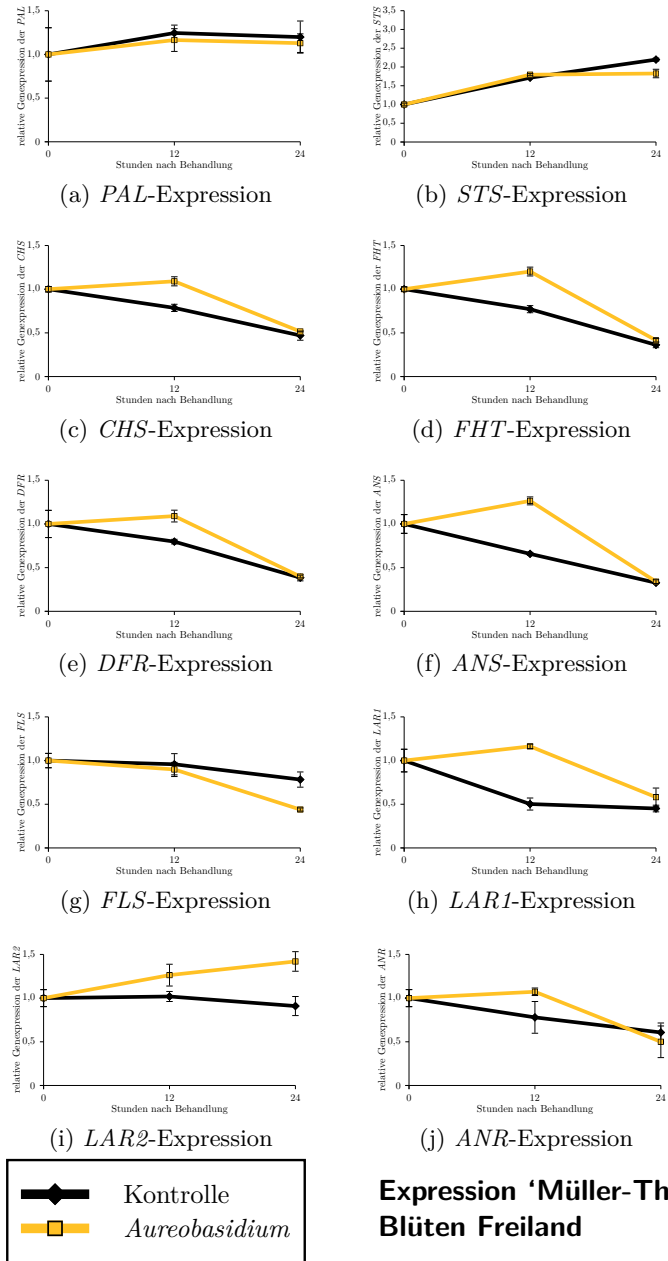


Abbildung C.21: Genexpression bei *Aureobasidium*-behandelten Blüten 'Müller-Thurgau' im Freiland. Versuch AB2. Alle Werte relativ zur Kontrolle 0 h, ± SD.

## C.4 Ergebnisse und Diskussion – Induktionsversuche

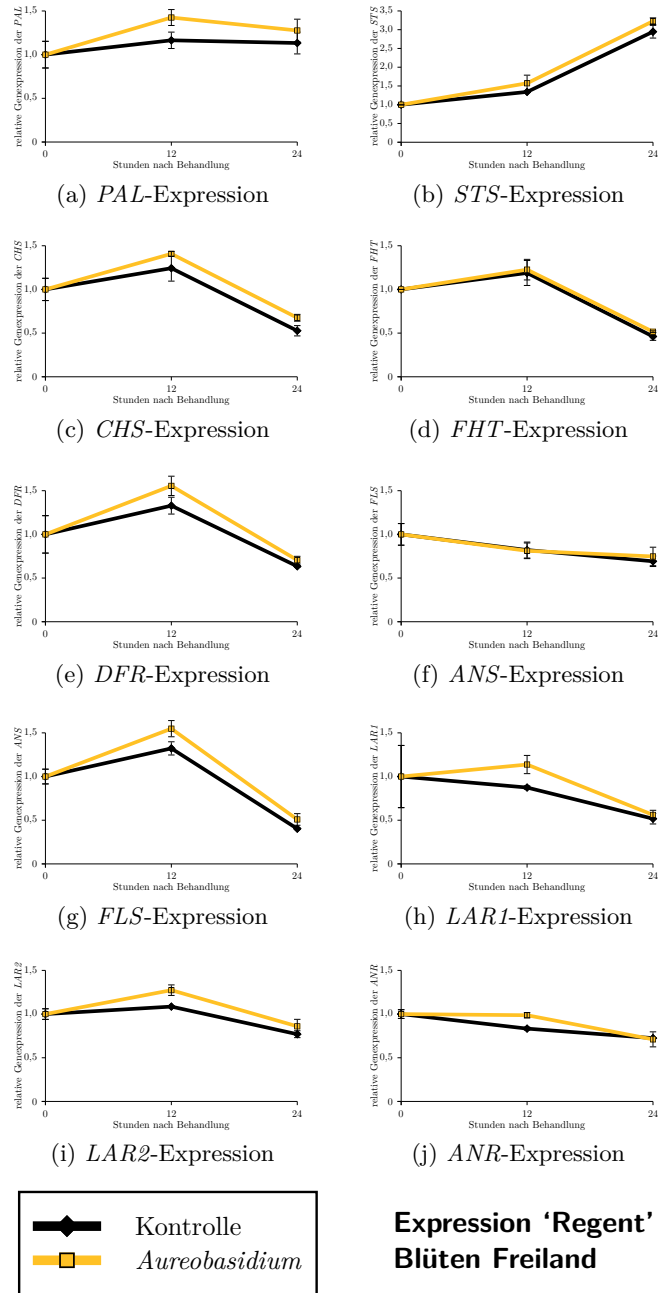


Abbildung C.22: Genexpression bei *Aureobasidium*-behandelten Blüten 'Regent' im Freiland. Versuch AB2. Alle Werte relativ zur Kontrolle 0h, ± SD.

#### C.4 Ergebnisse und Diskussion – Induktionsversuche

Versuchs anstieg, entweder durch einen Einfluss des Leermediums auf die Blüten oder wahrscheinlicher durch den normalen Entwicklungsvorgang. Die STS-Aktivität in den mit *Aureobasidium* behandelten Blüten stieg ebenfalls, allerdings auf deutlich höherem Niveau als bei den Kontrollen (siehe Abb. C.20 auf S. 106). Die CHS-Aktivität war lediglich 12 h nach Behandlung bei den *Aureobasidium*-Behandlungen deutlich höher. Nach 24 h war kein Unterschied zwischen den Behandlungen mehr sichtbar. Bei der Aktivität der PAL verhielten sich die beiden untersuchten Sorten ‘Regent’ und ‘Müller-Thurgau’ unterschiedlich. Bei ‘Regent’ blieb die Aktivität zunächst (bis 12 h) gleich und verminderte sich dann (24 h), bei der Kontrolle ebenso wie bei der *Aureobasidium*-Behandlung. Bei der Kontrolle von ‘Müller-Thurgau’ dagegen sank die PAL-Aktivität bereits nach 12 h, die bei der *Aureobasidium*-Behandlung allerdings erst nach 24 h, wodurch die Aktivität 12 h nach Versuchsbeginn bei der *Aureobasidium*-Behandlung höher als bei der Kontrolle war.

Die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen sind in Abb. C.21 auf S. 107 für die Sorte ‘Müller-Thurgau’ und in Abb. C.22 auf S. 108 für die Sorte ‘Regent’ dargestellt. Während des Versuchsverlaufs änderte sich die Expression der meisten Gene auch bei der Kontrollvariante. Bei beiden Sorten stieg die Expression der *PAL* schwach, die der *STS* stark an. Bei ‘Müller-Thurgau’ sank die Expression aller anderen untersuchten Gene im Laufe der Zeit ab. Bei ‘Regent’ hingegen sank nur die Expression von *ANR*, *LAR1* und *FLS* stetig, bei den anderen untersuchten Genen (*CHS*, *LAR1*, *ANS*, *DFR* und *FHT*) war zunächst ein geringer Anstieg vom Zeitpunkt 0 h zum Zeitpunkt 12 h zu beobachten, dann ein starkes Absinken, so dass die Expression zum Zeitpunkt 24 h wieder deutlich geringer als zum Versuchsbeginn war. Möglicherweise spielen hierbei auch Einflüsse durch die unterschiedlichen Tageszeiten der Probenahmen eine Rolle.

Der Einfluss der *Aureobasidium*-Behandlung auf die Genexpression war insgesamt bei ‘Regent’ deutlich schwächer als bei ‘Müller-Thurgau’. Bei der Sorte ‘Regent’ war während des gesamten Versuchs eine leichte Erhöhung der Expression von *STS*, *PAL*, *CHS* und *LAR2* durch die *Aureobasidium*-Behandlung zu beobachten. Zusätzlich war die Expression von *ANR*, *LAR1*, *ANS* und *DFR* 12 h nach *Aureobasidium*-Behandlung höher als bei der Kontrollvariante, bei diesen Genen war allerdings 24 h nach der Behandlung kein Einfluss mehr feststellbar. Die Expression von *FHT* und *FLS* wurden durch die *Aureobasidium*-Behandlung nicht signifikant beeinflusst. Bei der Sorte ‘Müller-Thurgau’ war ebenfalls bei den meisten untersuchten Genen (*CHS*, *ANR*, *LAR1*, *LAR2*, *ANS*, *DFR* und *FHT*) die Expression 12 h nach der Behandlung deutlich höher als bei der Kontrolle und sank, mit Ausnahme der *LAR2*, 24 h danach wieder auf das Niveau der Kontrolle. Im Gegensatz dazu und auch im Unterschied zu



#### C.4 Ergebnisse und Diskussion – Induktionsversuche

‘Regent’ sank die Expression von *STS* und *FLS*, insbesondere 24 h nach der *Aureobasidium*-Behandlung. Die Expression der *PAL* wurde nicht beeinflusst.

Die Korrelation der Ergebnisse der Genexpressionsanalysen mit den entsprechenden Enzymaktivitäten war bei diesem Versuch relativ schlecht. Insbesondere bei der *STS* war eine deutliche Steigerung der Enzymaktivität durch die *Aureobasidium*-Behandlung zu erkennen, aber nur eine sehr schwache Induktion (‘Regent’) oder sogar eine leichte Hemmung (‘Müller-Thurgau’) der Genexpression. Neben methodischen Fehlern bei der Analyse von Genexpression oder Enzymaktivität kommen auch zusätzliche, bei den vorhergehenden Versuchen nicht beobachtete Effekte des *Aureobasidium*-Extrakts in Frage. Möglicherweise war eine weitere Induktion der durch Umweltfaktoren schon erhöhten *STS*-Expression nicht mehr möglich und es ist nur noch eine mögliche Wirkung der *Aureobasidium*-Behandlung auf posttranslationale Modifikationen oder direkt auf die Enzymaktivität sichtbar.

Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse der HPLC-Analysen [Rühmann, unveröffentlicht]. Insgesamt wurde die Konzentration der Flavonoide und Stilbene durch die *Aureobasidium*-Behandlung bei ‘Regent’ tendenziell, bei ‘Müller-Thurgau’ deutlich vermindert.

Die *STS*-Expression (Abb. C.23 auf S. 111) der Blüten im Freiland (Versuch AB2) war schon bei der unbehandelten Kontrolle K0 höher als die von Blüten im Gewächshaus (Versuch AB1). Ursachen für diese Unterschiede könnten die Behandlung unterschiedlicher Blütenstadien, die höhere UV-Strahlung im Freiland oder ein latenter Pathogenbefall und damit eine *STS*-Induktion unabhängig von der Behandlung sein.

Auffällig ist weiterhin, dass die Expression und Aktivität der CHS sowie die Expression weiterer Gene der Flavonoidbiosynthese durch die *Aureobasidium*-Behandlung bei dem Versuch im Gewächshaus (Versuch AB1) kaum verändert wurde, beim Versuch im Freiland (Versuch AB2) jedoch deutlich erhöht wurde. Möglicherweise ist für eine induzierende Wirkung von *Aureobasidium*-Extrakt auf die Genexpression und Enzymaktivität von Genen der Flavonoidbiosynthese zusätzlich UV-Licht notwendig.

Insgesamt konnte bei der Behandlung von Blüten im Freiland mit *Aureobasidium*-Extrakt eine geringe Steigerung der Expression und Enzymaktivität von Genen der Flavonoidbiosynthese beobachtet werden, vor allem bei der Sorte ‘Müller-Thurgau’. Die Expression von *PAL* und *STS* war dagegen unverändert oder sogar leicht reduziert. Im Gegensatz dazu war die *STS*-Enzymaktivität deutlich gestiegen, die Ursache hierfür konnte nicht geklärt werden.

## C.4 Ergebnisse und Diskussion – Induktionsversuche

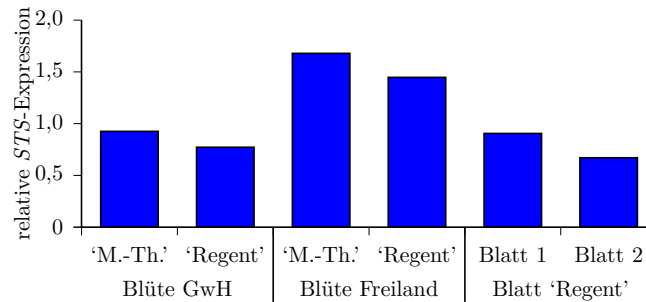


Abbildung C.23: Vergleich der Genexpression der *STS* bei Blüten im Gewächshaus (GwH) und im Freiland. 'Müller-Thurgau' ('M.-Th.') und 'Regent'. Versuch AB1 und AB2, jeweils die Kontrolle vor Versuchsbeginn (K0). Zum Vergleich junge Blätter der Sorte 'Regent' (Versuch E1).

### C.4.5 Vergleich und Diskussion aller Versuchsergebnisse

#### ProCa

Im Freiland (Versuche P1 und P2) wurde durch eine ProCa-Behandlung, und verstärkt bei einer gleichzeitigen Behandlung mit den Pflanzenstärkungsmitteln Myco-Sin oder Milsana, die *STS*-Expression in Weinblättern deutlich gesteigert. Die Phenylpropanoidbiosynthese wurde also vermutlich in Richtung der Stilbene umgeleitet. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt allein durch den Wirkstoff ProCa, nicht aber durch die Leerformulierung des Präparats, zustande kommt.

Bei *in vitro*-Pflanzen war der Effekt noch deutlicher, da zusätzlich die Expression der *PAL*, und damit die Phenylpropanoidbiosynthese, erhöht war und andererseits aber die Expression der Flavonoidgene verringert war. Ursache für die unterschiedliche Intensität der Reaktion könnte neben dem unterschiedlichen physiologischen Zustand der Blätter im Freiland und *in vitro* die unterschiedliche Aufnahme des Wirkstoffs sein, im Freiland über die Blattoberfläche, *in vitro* über die Wurzel, und damit unterschiedliche Wirkstoffkonzentrationen im Gewebe. Es ist bekannt, dass ProCa durch die Wurzeln aufgenommen und in die gesamte Pflanze transportiert wird [Rademacher, unveröffentlicht].

Es wurde bereits gezeigt, dass auch eine Behandlung von Apfelblättern mit ProCa nicht nur die Enzymaktivitäten der direkt durch ProCa gehemmten Enzyme (FHT, FLS, ANS), sondern auch die Expression von Genen der Flavonoidbiosynthese beeinflusst [50]. Es kann vermutet werden, dass diese Wirkung des ProCa auf veränderten Flavonoidkonzentrationen beruht, die dann möglicherweise, wie in anderen Stoffwechselwegen oft beobachtet, über Rück-

kopplung auf die Expression der Gene der Flavonoidbiosynthese wirken. Bei einer Regulation der Genexpression über die Produktmenge, z. B. die durch die Blockierung der FHT verringerten Flavonole oder Proanthocyanidine, könnte die Expression von frühen Genen der Phenylpropanoidbiosynthese, z. B. der *PAL*, gesteigert werden. Die Expression von nachfolgenden Genen, wie z. B. der *ANR*, könnte verringert werden, da nicht genügend Substrate zur Verfügung stehen. Durch die Blockierung der FHT-Enzymaktivität kommt es zu einem Rückstau von ERI, wodurch, wie in Versuch P1 beobachtet, die Expression der *DFR* gesteigert werden könnte, da diese in der Lage ist, ERI zu Luteoforol umzuwandeln. Zudem könnte die *CHS*-Expression gehemmt werden, da diese über ihre indirekten Produkte, die Flavanone, reguliert werden könnte. Durch die relativ hohen ERI-Konzentrationen, und die damit eventuell verbundene verringerte *CHS*-Expression, entsteht möglicherweise auch ein Rückstau des *CHS*-Substrats p-Cumaroyl-CoA. Nach einer Behandlung von Apfelbäumen mit ProCa wurden schon erhöhte Gehalte von Hydroxyzimtsäuren beschrieben [112]. Eine Erklärung für die beobachtete verstärkte *STS*-Expression könnte demnach eine erhöhte Menge des *STS*-Substrats p-Cumaroyl-CoA sein.

#### **Milsana**

In dem Versuch zur Behandlung von Weinblättern mit dem Pflanzenstärkungsmittel Milsana konnten nur geringe Veränderungen der Genexpression gemessen werden. Bei einer gemeinsamen Anwendung von Milsana mit ProCa jedoch wurde die Wirkung des ProCa, also eine gestiegene *STS*-Expression, gegenüber einer alleinigen Anwendung von ProCa deutlich gesteigert.

Das Fehlen deutlicher Effekte auf die Genexpression durch alleinige Anwendung von Milsana ist insofern erstaunlich, da in Feldversuchen eine sehr gute Wirkung von Milsana gegen Echten Mehltau an Weinreben festgestellt worden war [123]. Aus Versuchen an Gurken ist zudem bekannt, dass Milsana eine Erhöhung der Enzymaktivität und Genexpression von *PAL*, *CHS* und *CHI* sowie der Flavonoid-Konzentrationen zur Folge haben kann [52, 70]. Trotzdem ist nicht auszuschließen, dass der Wirkmechanismus von Milsana bei Weinreben unabhängig vom Flavonoid- und Stilbenmetabolismus ist. Die Probenahme bei dem durchgeführten Versuch (P1) erfolgte zwei Tage nach der Milsana-Behandlung, weil in der Literatur dieser Zeitpunkt als Maximum der Induktion bei der Milsana-Behandlung von Gurken genannt wird [52, 70]. Möglicherweise ist die Reaktion von Weinreben auf Milsana jedoch schneller bzw. weniger lang andauernd, so dass in diesem Versuch nach zwei Tage keine Wirkung auf die Genexpression mehr festzustellen war. Da keine Inhaltsstoff-Analysen vorliegen, ist nicht bekannt, inwieweit abwehrrelevante sekundäre Inhaltsstoffe durch die

Milsana-Behandlung zusätzlich gebildet wurden.

##### **Myco-Sin**

Bei der Behandlung von Weinblättern mit dem Pflanzenstärkungsmittel Myco-Sin konnte keine signifikante Änderung der Genexpression beobachtet werden. Dagegen konnte jedoch eine tendenziell gesteigerte Wirkung von ProCa bei einer gemeinsamen Behandlung, also eine gestiegene *STS*-Expression, beobachtet werden.

Ähnlich wie für die Ergebnisse der Milsana-Behandlung gilt auch hier, dass der Termin der Probenahme möglicherweise zu spät war, um direkte Einflüsse einer Behandlung von Myco-Sin auf die Expression von Genen der Phenylpropanoidbiosynthese festzustellen. Die aus der Literatur bekannte gute Wirkung von Myco-Sin gegen den Falschen Mehltau an Weinreben [123] könnte alternativ hauptsächlich auf die direkte Wirkung der enthaltenen Gesteinsmehle auf die Pathogene zurückzuführen sein [159] und nicht auf eine Resistenzinduktion.

Im Gegensatz zur Myco-Sin-Behandlung von Weinblättern konnte bei Versuchen mit Weinkallussen eine deutliche Induktion des Phenylpropanoidstoffwechsels und der Stilbensynthese erreicht werden. Durch Myco-Sin oder den Hefebestandteil dieses Präparats wurden ähnliche, wenngleich schwächere, Effekte wie durch eine Behandlung mit *Aureobasidium*-Extrakt beobachtet, also eine verstärkte Phenylpropanoidbiosynthese und eine Umlenkung in Richtung der Stilbene, der wichtigsten Phytoalexine der Weinrebe. Zumindest für dieses *in vitro*-Testsystem konnte also eine resistenzinduzierende Wirkung des in Myco-Sin enthaltenen Hefeextrakts auf Weinreben nachgewiesen werden.

##### ***Aureobasidium*-Extrakt**

Bei den beiden Versuchen zur Behandlung von Weinkallussen mit *Aureobasidium*-Extrakt zeigte sich eine starke Induktion der Expression und Enzymaktivität von PAL und STS. Die Reaktion der Kallusse war schon bei den frühesten Proben, 5 h nach Behandlung, deutlich zu beobachten.

Alle Versuche mit einer *Aureobasidium*-Behandlung von *in vitro*-Weinpflanzen zeigten genau wie die Kallusse eine deutliche Induktion von PAL und STS, bei der Genexpression ebenso wie bei der Enzymaktivität, die Biosynthese der Polyphenole und der Stilbene war also erhöht. Das Verhalten von CHS und den weiteren untersuchten Flavonoidgenen war nicht einheitlich, teils wurden diese in ihrer Expression deutlich gehemmt (Versuch AI1), teils waren sie unverändert oder induziert (Versuch AI2, AI3). Eine Ursache für diese Unterschiede könnte die unterschiedliche Aufnahme der Wirkstoffe über die Wurzel (Versuch AI1) oder über das Blatt (Versuch AI2, AI3) sein.

Die Effekte der *Aureobasidium*-Behandlung bei Blüten waren insgesamt

schwächer als die bei Kallussen und *in vitro*-Pflanzen beobachteten Effekte. Im Gewächshaus war eine Induktion der *STS*-Genexpression und der *STS*-Enzymaktivität festzustellen, im Freiland waren die Ergebnisse zur Genexpression und Enzymaktivität der *STS* widersprüchlich.

Die Behandlung von Weinreben mit *Aureobasidium*-Extrakt bewirkt also generell Expressionsänderungen von Genen der Phenylpropanoidbiosynthese, entweder direkt oder über eine Hemmung oder Induktion von Regulationsgenen, die ihrerseits als Transkriptionsfaktoren die Expression von Genen der Phenylpropanoidbiosynthese oder anderen, hier nicht untersuchten Abwehrgenen hemmen oder induzieren. Das hier untersuchte Isolat von *Aureobasidium* wirkt also als Resistenzinduktor. Wirksamer Bestandteil des *Aureobasidium*-Extrakts sind vermutlich pilzliche Zellwände, die als Elicitoren wirken.

Als Resistenzinduktoren bei *Vitis* wurden bisher hauptsächlich Teile abgetöteter pathogener Organismen (*Phytophthora* [93, 151], *Botrytis* [110]) verwendet. Auch Hefeextrakt (*Saccharomyces cerevisiae*) induziert die Resistenz von *Vitis* gegen Pathogene [28]. Dabei wurde jeweils eine Induktion der Expression von *PAL*, *STS* und teilweise von Genen der Flavonoidbiosynthese beobachtet. Die Reaktion erfolgte stets, wie auch im Versuch AK2 gefunden, bereits nach wenigen Stunden (4 h–9 h), der Höhepunkt der Induktion lag bei etwa 24 h nach der Behandlung.

Der nichtpathogene, hefeähnliche Pilz *Aureobasidium* ist ubiquitär und wurde bereits von den Blattoberflächen verschiedener Pflanzenarten isoliert [45], sowie als Endophyt aus Knospen und Früchten von Weinreben [41]. Der hier verwendete Stamm wurde von der Oberfläche von Apfelblättern isoliert [115]. Neben einigen Berichten über eine induzierte Resistenz durch *Aureobasidium* [2] gibt es auch Berichte über Isolate, die antimikrobielle Metaboliten produzieren (Aureobasidine [138]). Andere Quellen gehen von einer antagonistischen Wirkung über eine schnelle Besiedlung von Wunden [41] oder Nährstoffkonkurrenz und extrazelluläre Exochitinasen und Glucanasen [30] aus. Das Pflanzenstärkungsmittel »Blossom-Protect«<sup>1</sup> enthält lebende *Aureobasidium*-Sporen und soll vor allem gegen Feuerbrand, aber auch gegen Lagerfäulen bei Apfel wirken [86].

Es kann also festgestellt werden, dass der Extrakt von *Aureobasidium* ein gutes Potential als Pflanzenstärkungsmittel hat. Der Extrakt des hier getesteten Isolats wirkt bei verschiedenen Geweben von Weinreben als Resistenzinduktor, das heißt er führt zu einer erhöhten Biosynthese von Phenylpropanoiden, insbesondere von Stilbenen. Zumindest bei Infektionsversuchen mit *Botrytis* an Weinkallussen konnte eine deutliche Reduktion des Befalls durch *Aureobasidium* erreicht werden.

---

<sup>1</sup> *Blossom-Protect*. URL: [www.bio-protect.de](http://www.bio-protect.de)

## **Teil D**

# **Ausblick und Zusammenfassung**

## D.1 Ausblick

### D.1.1 Klonierung und heterologe Expression

Durch zahlreiche Projekte zur Sequenzierung von ESTs aus *Vitis* (The Gene Index Project<sup>1</sup>) waren schon zu Beginn der Arbeiten (2003) ca. 100 000 EST-Sequenzen vorhanden, inzwischen sind es fast 200 000. Dies ist eine sehr nützliche Datenbasis für die Klonierung neuer, vollständiger cDNA-Sequenzen, von denen bislang nur Sequenzfragmente oder homologe Sequenzen aus anderen Pflanzenarten bekannt sind. Die Sequenz der *LAR1* konnte beispielsweise vollständig aus vorhandenen EST-Sequenzen zusammengesetzt werden. Wenn allerdings, wie hier im Fall der *LAR2*, nicht für die gesamte Sequenz EST-Fragmente vorhanden sind, müssen zusätzlich aufwändigere RACE-Verfahren zur Vervollständigung der Sequenzen eingesetzt werden. Da *Vitis* der einzige wirtschaftlich wichtige Vertreter der Vitaceae ist, können in solchen Fällen keine Sequenzen eng verwandter Spezies als Grundlage für Klonierungen verwendet werden, wie diese beispielsweise bei Birne durch Sequenzinformationen von Apfel möglich ist [49].

Weltweit sind momentan mehrere Institute involviert, das *Vitis*-Genom vollständig zu sequenzieren (International Grape Genome Program<sup>2</sup>). Das *Vitis*-Genom ist zwar noch nicht vollständig veröffentlicht, jedoch werden seit Anfang des Jahres 2007 zahlreiche *whole genome shotgun* Sequenzen aus diesen Projekten in GenBank publiziert. Über die auf Vitaceae eingegrenzte BlastN-Suche konnten so nachträglich die vollständigen genomischen Sequenzen sämtlicher in dieser Arbeit klonierten cDNAs gefunden werden. Über den Vergleich mit bekannten cDNAs aus anderen Pflanzen, und damit der Identifikation der Exon-Bereiche, konnte so z. B. eine vollständige, putative mRNA-Sequenz für eine *GAPDH* aus *Vitis* zusammengestellt werden. Sobald das *Vitis*-Genom vollständig veröffentlicht ist, wird die Klonierung von vollständigen cDNAs noch einfacher werden. Insbesondere könnten so sehr schnell alle im Genom vorkommenden Genkopien identifiziert und kloniert werden und die entsprechenden Enzyme dann nach heterologer Expression vergleichend charakterisiert

---

<sup>1</sup>*Grape Gene Index*. URL: <http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=grape>

<sup>2</sup>*International Grape Genome Program*. URL: <http://www.vitaceae.org>

## D.1 Ausblick

werden. Da dann die aufwändige Klonierung von Promotorsequenzen, etwa durch *Chromosome Walking*-Techniken, entfällt, wird dies auch Studien zur Regulation interessierender Gene erleichtern.

### D.1.2 Induktion der Phenylpropanoidbiosynthese

Für die weitergehende Analyse der Genexpressionen wäre zusätzlich zu den hier durchgeführten Endpunkt-qPCRs ein Einsatz von Microarrays denkbar. Einerseits könnten so die qPCR-Ergebnisse mit einer anderen Methode bestätigt werden, andererseits könnte die Expression von deutlich mehr Genen, auch aus anderen Stoffwechselwegen als der Phenylpropanoidbiosynthese, analysiert werden. Besonders interessant wäre neben Genen der Pathogenabwehr auch die Quantifizierung der Expression von Regulatorgenen, etwa mit quantitativer RealTime-PCR. Durch deren extrem niedrige Expression gelangen eigene Versuche mit Endpunkt-qPCRs von *Myb*-Faktoren nicht. So könnte der Wirkungsmechanismus der eingesetzten Resistenzinduktoren detaillierter aufgeklärt werden.

Aufgrund des positiven Effekts einer Behandlung mit ProCa auf die Expression der *STS* bei Weinblättern wären weitere Versuche interessant, bei denen durch frühere Probenahmeterminen der Zeitverlauf der Induktion analysiert werden könnte. Darüber hinaus könnten Infektionsversuche durchgeführt werden, um zu untersuchen, ob sich die beobachteten Veränderungen der Genexpression durch eine Behandlung mit ProCa auf die Resistenz gegenüber Pathogenen auswirken.

Insbesondere da die Behandlung von Weinkallussen mit dem Hefebestandteil des Präparats Myco-Sin eine deutliche Induktion der Phenylpropanoidbiosynthese zeigte, wären weitere Versuche mit Myco-Sin-Blattbehandlungen mit zusätzlichen, früheren Probenahmeterminen interessant.

Aufgrund der guten Wirkung des *Aureobasidium*-Extrakts als Resistenzinduktor bei verschiedenen Geweben der Weinrebe und der erreichten Befallsreduktion zumindest bei Infektionsversuchen mit *Botrytis* an Weinkallussen, hat dieser Extrakt ein gutes Potential als Pflanzenstärkungsmittel. Vor einer möglichen Anwendung in der Praxis sind jedoch weitere Versuche, insbesondere unter Freilandbedingungen, notwendig. Infektionsversuche mit *Botrytis*, aber auch mit anderen Pathogenen wie Echtem Mehltau, könnten zeigen, inwieweit die Induktion von Phytoalexinen durch *Aureobasidium*-Extrakt tatsächlich zu geringerem Befall führt.



## D.2 Zusammenfassung (deutsch)

Der Anbau der Weinrebe (*Vitis vinifera* L.), einer weltweit kulturell und wirtschaftlich bedeutenden Kulturpflanze, wird durch eine Vielzahl von Pathogenen bedroht. Insbesondere für den ökologischen, aber auch für den integrierten Weinbau sind neue Möglichkeiten zur Bekämpfung pilzlicher Krankheiten unter Verwendung umweltschonender Agentien wichtig. Eine solche Möglichkeit bietet die Induktion pflanzeigener Abwehrstoffe wie Flavonoide und vor allem Stilbene als die wichtigsten Phytoalexine der Weinrebe.

In dieser Arbeit wurde die Biosynthese dieser Sekundärmetaboliten bei *Vitis* durch die Klonierung von ausgewählten Genen der Phenylpropanoidbiosynthese und die Charakterisierung der rekombinanten Enzyme analysiert. Darauf aufbauend wurde in verschiedenen Geweben der Weinrebe analysiert, inwieweit die Pflanzenstärkungsmittel Milsana und Myco-Sin, der Wachstumsregulator Prohexadion-Ca (ProCa) und der Extrakt eines hefeähnlichen Epiphyten (*Aureobasidium pullulans*) die Flavonoid- und Stilbenbiosynthese positiv beeinflussen.

Die für Schlüsselenzyme der Phenylpropanoidbiosynthese kodierenden cDNAs der Phenylalanin-Ammonia-Lyase (*PAL*), der Stilbensynthase (*STS*) und der Chalkonsynthase (*CHS*) wurden aus den untersuchten Sorten kloniert und durch heterologe Expression, im Fall der *PAL* erstmals bei *Vitis*, auf ihre Enzymaktivität getestet und damit verifiziert. Die bekannten Sequenzen zweier Dioxygenasen der Flavonoidbiosynthese, der Flavanon 3 $\beta$ -Hydroxylase (*FHT*) und der Anthocyanidinsynthase (*ANS*), wurden ebenfalls erstmals für *Vitis* durch heterologe Expression in ihrer Funktion bestätigt. Darüber hinaus wurden die cDNAs der für die Proanthocyanidinsynthese bedeutenden Enzyme Anthocyanidinreduktase (*ANR*) und Leukoanthocyanidinreduktase (*LAR*) kloniert und ebenfalls durch heterologe Expression in Hefe bestätigt und charakterisiert. Für die *ANR* war aus *Vitis* zuvor nur eine aus ESTs zusammengesetzte Sequenz bekannt. Für die *LAR*, für die zwei deutlich unterschiedliche Sequenzen *LAR1* und *LAR2* nachgewiesen werden konnten, waren nur einzelne EST-Sequenzen veröffentlicht. Die Sequenz der *LAR1* konnte vollständig aus EST-Sequenzen zusammengesetzt und anschließend kloniert werden, die der *LAR2* wurde durch RACE-Techniken vervollständigt und dann ebenfalls vollständig kloniert. Somit sind zwei wichtige Gene für die Synthese der Catechine und Proanthocyanidine, welche neben den Stilbenen als Resistenzfaktoren fungieren, bekannt.

## D.2 Zusammenfassung (deutsch)

Bei der Behandlung von Weinblättern von Freilandpflanzen wurde durch eine ProCa-Behandlung die *STS*-Expression in Weinblättern deutlich gesteigert, die Phenylpropanoidbiosynthese wurde also vermutlich in Richtung der Stilbene umgeleitet. Dies zeigte sich verstärkt bei einer gleichzeitigen Behandlung von ProCa mit den Pflanzenstärkungsmitteln Myco-Sin oder Milsana. Bei der Behandlung von *in vitro*-Pflanzen mit ProCa war die Umleitung in Richtung Stilbene noch deutlicher, da zusätzlich die Expression der *PAL*, und damit die Phenylpropanoidbiosynthese, erhöht war und andererseits aber die Expression der untersuchten Gene der Flavonoidbiosynthese verringert war. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt allein durch den Wirkstoff ProCa, nicht aber durch die Leerformulierung des Präparats, zustande kommt.

Die alleinige Anwendung von Myco-Sin oder Milsana zeigte bei Blättern keine signifikanten Änderungen der Expression der untersuchten Gene. Im Gegensatz dazu konnte bei Versuchen mit Weinkallus durch Myco-Sin oder den Hefebestandteil dieses Präparats eine deutliche Steigerung der Genexpression und Enzymaktivität von *PAL* und *STS* erreicht werden. Die Phenylpropanoidbiosynthese wird also vermutlich verstärkt und in Richtung der Stilbene umgeleitet, der wichtigsten Phytoalexine der Weinrebe. Zumindest für dieses *in vitro*-Testsystem konnte somit bisher eine resistenzinduzierende Wirkung des in Myco-Sin enthaltenen Hefeextrakts auf Weinreben nachgewiesen werden.

Mit *Aureobasidium*-Extrakt behandelte Weinkallusse zeigten in mehreren Versuchen eine starke Induktion der Expression und Enzymaktivität der *PAL* und *STS*. Die Reaktion der Kallusse war schon bei den frühesten Proben, 5 h nach Behandlung, deutlich zu beobachten. Alle Versuche mit einer *Aureobasidium*-Behandlung von *in vitro*-Weinpflanzen zeigten genau wie die Kallusse eine deutliche Induktion von *PAL* und *STS*, bei der Genexpression ebenso wie bei der Enzymaktivität, die Biosynthese der Polyphenole und der Stilbene war erhöht. Das Verhalten von *CHS* und den weiteren untersuchten Genen der Flavonoidbiosynthese war bei den *in vitro*-Pflanzen nicht einheitlich, teils wurden diese in ihrer Expression deutlich gehemmt, teils waren sie unverändert oder induziert. Bei Blüten waren die Effekte der *Aureobasidium*-Behandlung insgesamt schwächer als die bei Kallussen und *in vitro*-Pflanzen beobachteten Effekte. Bei im Gewächshaus kultivierten Pflanzen war eine Induktion der *STS*-Genexpression und der *STS*-Enzymaktivität festzustellen. Für Freilandpflanzen, dem komplexesten System, waren die Ergebnisse zur Genexpression und Enzymaktivität der *STS* bisher widersprüchlich.

Der Extrakt von *Aureobasidium* hat ein gutes Potential als Pflanzenstärkungsmittel, da er in verschiedenen Geweben von Weinreben als Resistenzinduktor wirkt. Zumindest bei Infektionsversuchen mit *Botrytis* an Weinkallussen konnte eine deutliche Reduktion des Befalls durch *Aureobasidium* erreicht werden.

## D.3 Abstract (English)

The cultivation of grapevine (*Vitis vinifera* L.), a culturally and commercially important crop plant worldwide, is threatened by a multitude of pathogens. New options against fungal pathogens using environmentally friendly agents are important, especially for organic viticulture, but also for integrated pest management. One possible option is the induction of plant defence metabolites like flavonoids and especially stilbenes, the most important phytoalexins in grapevines.

Within the scope of this work the biosynthesis of these secondary metabolites in *Vitis* was analysed by cloning selected genes of the phenylpropanoid biosynthesis and by characterisation of the recombinant enzymes. On this basis it was analysed in various tissues, to what extent the flavonoid and stilbene biosynthesis was beneficially influenced by the plant resistance inductors Mil-sana and Myco-Sin, the growth regulator Prohexadione-Ca (ProCa), and the extract of an epiphytic yeast-like fungus (*Aureobasidium pullulans*).

The cDNAs encoding key enzymes of the phenylpropanoid pathway, namely phenylalanine ammonia lyase (*PAL*), stilbene synthase (*STS*), and chalcone synthase (*CHS*), were cloned from the studied cultivars and then tested and verified for enzyme activities by heterologous expression in yeast, in case of *PAL* for the first time in *Vitis*. The known sequences of two dioxygenases of the flavonoid biosynthesis, flavanone 3 $\beta$ -hydroxylase (*FHT*), and anthocyanidin synthase (*ANS*), were also functionally verified for the first time in *Vitis* by heterologous expression. Furthermore, the cDNAs for two important enzymes of the proanthocyanidin biosynthesis, anthocyanidin reductase (*ANR*) and leucoanthocyanidin reductase (*LAR*), were cloned and likewise verified and characterised by heterologous expression in yeast. In case of the *ANR*, only a sequence composed of ESTs had been published for *Vitis*. In case of *LAR*, where two distinctly different sequences *LAR1* and *LAR2* were detected, only some individual ESTs were available. It was possible to construct and then clone the complete coding sequence of *LAR1* from these EST fragments. The sequence of *LAR2* was completed by RACE techniques and afterwards the complete coding sequence was cloned as well. Consequently, two important genes for the biosynthesis of catechins and proanthocyanidins, which act as resistance factors in addition to stilbenes, are now known.

### D.3 Abstract (English)

When grape leaves of outdoor grown plants were treated with ProCa the expression of *STS* in grape leaves was increased significantly, indicating a redirection of the biosynthesis of phenylpropanoids towards stilbenes. This effect was even intensified after a combined treatment of ProCa with the plant resistance inducers Myco-Sin or Milsana. Following a treatment with ProCa of *in vitro* plantlets, the redirection towards stilbenes was even more pronounced, because the expression of *PAL*, and therefore the biosynthesis of phenylpropanoids, was additionally increased and on the other hand, the expression of the analysed genes of the flavonoid biosynthesis was reduced. It was demonstrated, that this effect was caused by the agent ProCa itself, and not by the formulation of the product.

The sole treatment of grape leaves with Myco-Sin or Milsana did not show significant changes of expression for the analysed genes. In contrast to this, in experiments with grape calluses a treatment of Myco-Sin or the yeast component of this product caused a marked increase of gene expression and enzyme activity of *PAL* and *STS*. This also indicates, that the phenylpropanoid biosynthesis is increased and redirected to the synthesis of stilbenes, the most important phytoalexins of grapevines. In this way, at least for this *in vitro* test system, resistance inducing properties of the yeast extract contained in Myco-Sin could be demonstrated.

Applying *Aureobasidium* extract to grape calluses, several experiments showed a strong increase of gene expression and enzyme activities of *PAL* and *STS*. The reaction could be observed even in the earliest samples, drawn 5 h after treatment. All experiments with an *Aureobasidium* treatment of *in vitro* grape plantlets showed, as observed in calluses, a remarkable increase of *PAL* and *STS* gene expression and enzyme activities, the biosynthesis of phenylpropanoids and stilbenes was increased. The characteristics of *CHS* and the other analysed flavonoid biosynthesis genes were not consistent in the different experiments on *in vitro* plantlets. Partly, their expression was significantly reduced, partly it was unchanged or even induced. On grape flowers, the effects of an *Aureobasidium* treatment were altogether weaker than those observed for calluses and *in vitro* plantlets. In greenhouse cultivated plants, an induction of *STS* gene expression and *STS* enzyme activity was found. However, the results for *STS* gene expression and enzyme activity for outdoor grown plants, the most complex system, were not consistent so far.

The extract of *Aureobasidium* could potentially be a good remedy for integrated pest management because of its resistance induction in various tissues of grapevine. At least in infection studies with *Botrytis* in grape calluses, a significant reduction of infection was caused by an *Aureobasidium* treatment.

## D.4 Publikationen

Im Rahmen dieser Arbeit war ich an folgenden Publikationen zu weiteren Themenbereichen maßgeblich beteiligt:

### **ANR und LAR (Weinrebe und Apfel)**

J. Pfeiffer, C. Kühnel, J. Brandt, D. Duy, P. A. N. Punyasiri, G. Forkmann und T. C. Fischer. »Biosynthesis of flavan 3-ols by leucoanthocyanidin 4-reductases and anthocyanidin reductases in leaves of grape (*Vitis vinifera* L.), apple (*Malus x domestica* Borkh.) and other crops«. In: *Plant Physiology and Biochemistry* 44.5–6 (2006). 323–334. DOI: 10.1016/j.plaphy.2006.06.001

### **Flavonoidbiosynthese der Birne**

T. C. Fischer, C. Gosch, J. Pfeiffer, H. Halbwirth, C. Halle, K. Stich und G. Forkmann. »Flavonoid genes of pear (*Pyrus communis*)«. In: *Trees – Structure and Function* 21 (2007). in press. DOI: 10.1007/s00468-007-0145-z

### **Konferenzbeiträge**

- »Induktion von Polyphenol-Resistenzfaktoren bei Wein«  
43. Gartenbauwissenschaftlichen Tagung in Potsdam, 22.–25.02.2006
- »Induction of Phenylpropanoid Resistance Factors in Grapevine«  
23. International Conference on Polyphenols in Winnipeg 22.–25.8.2006

Beteiligung an folgenden Tagungsbeiträgen:

- »Aufklärung von Abwehrreaktionen ausgewählter Kulturpflanzen.«  
LGL Fachtagung Gentechnik und Umweltschutz in Oberschleißheim, 13.10.2005
- »Flavonoids in strawberry« und  
»The cloning of pear (*Pyrus communis*) flavonoid cDNAs via apple (*Malus* sp.) sequence information as a general approach for pear gene cloning«  
Plant Genetics Conference in Kiel, 20.–23.09.2006
- »Die Klonierung von Birnen (*Pyrus communis*)-Flavonoid cDNAs über Apfel (*Malus* sp.) Sequenzinformation als eine generelle Methode zur Klonierung von Birnen-Genen« und  
»Induktion von Resveratrolderivaten in Weinblüten (*Vitis vinifera*) durch epiphytisch isolierte *Aureobasidium pullulans* Stämme.«  
44. Gartenbauwissenschaftlichen Tagung in Erfurt, 21.–23.02.2007

**Teil E**

**Anhang**

## Tabellen

Gen	Sorte	GenBank	Länge	getestete Substrate
<i>PAL</i>	'Spätburgunder'	EF192469	2133 bp 710 AS	Phenylalanin
<i>STS</i>	'Spätburgunder'	EF192465	1179 bp 392 AS	p-Cumaroyl-CoA, Kaffeoyl-CoA
<i>CHS</i>	'Spätburgunder'	EF192464	1182 bp 393 AS	p-Cumaroyl-CoA, Kaffeoyl-CoA
<i>FHT</i>	'Regent'	EF192467	1092 bp 363 AS	NAR, ERI
<i>ANS</i>	'Regent'	EF192468	1068 bp 355 AS	LPg, LCy
<i>LAR1</i>	'Regent'	DQ129685	1041 bp 346 AS	DHK, DHQ, DHM, ERI
<i>LAR2</i>	'Regent'	DQ129686	1089 bp 362 AS	DHK, DHQ, DHM, ERI
<i>ANR</i>	'Spätburgunder'	DQ129684	1017 bp 338 AS	Pg, Cy, Dp, Pn, Pt, Mv

Tabelle E.1: Übersicht aller vollständig klonierten und heterolog exprimierten cDNAs von Genen der Phenylpropanoidbiosynthese. Alle getesteten Substrate zeigten einen Umsatz.

Tabellen

	CAW	BAW	6 % Essig
Phenylalanin	55		67
trans-Zimtsäure	98		54
trans-Resveratrol	29		
cis-Resveratrol	70		
Naringenin	85	92	20
Eriodictyol	61	86	20
Pentahydroxyflavanon	28		
Dihydrokaempferol	65	89	
Dihydroquercetin	35	80	40
Dihydromyricetin	12	72	
Kaempferol	69	83	
Quercetin	34	66	34
Myricetin		42	
Leukopelargonidin	18	80	
Leukocyanidin	10	55	68
Leukodelphinidin	4		
Pelargonidin		80	
Cyanidin	14	67	6
Delphinidin		42	
Paeonidin		71	
Petunidin		52	
Malvidin		58	
Afzelechin		77	
Catechin	10	61	43
Gallocatechin		42	
Epiafzelechin		71	
Epicatechin	10	47	35
Epigallocatechin		26	
Luteoforol	20	81	19
Luteoliflavan	25	78	16

Tabelle E.2:  $R_f$ -Werte verschiedener Flavonoide bei der Dünnschichtchromatographie in den Laufmitteln CAW, BAW und 6 % Essigsäure mit Cellulose-DC-Platten



Tabellen

	Gewebe	Sorten	Ergebnisse
E1	Blatt	R (5 Stadien)	Maximum der Expression: Stadien 2 und 3, <i>FLS</i> : Maximum Stadium 1
E2	Frucht	R (6 Stadien)	Maximum der Expression: junge Früchte, <i>FLS</i> : Blüten; Anstieg (alle außer <i>LAR2</i> ) bei reifenden Früchten

(a) Entwicklungsstadien

	Sorten	Termin	Behandlung	Ergebnisse
P1	(B), M, R	3 d	ProCa Mil., Myc. Kombi.	<i>STS</i> -Expression ↗ Expression ↔ <i>STS</i> -Expression ↑
P2	(B), M	4 d	ProCa Form.	<i>STS</i> -Expression ↗ <i>STS</i> -Expression ↘
P3	N ( <i>in vitro</i> )	24, 48 h	ProCa	Expression: <i>STS</i> ↑, <i>PAL</i> ↑, Flavonoidgene ↓

(b) ProCa – Blattbehandlungen. Mil.: Milsana, Myc.: Myco-Sin; Kombi.: ProCa + Milsana, ProCa + Myco-Sin, Form.: ProCa-Formulierung

Tabelle E.3: Übersicht aller Versuche zur Induktion der Phenylpropanoidbiosynthese. B: ‘Blauer Spätburgunder’, M: ‘Müller-Thurgau’, N: ‘Nero’, R: ‘Regent’. Änderung von Expression und Enzymaktivität: ↗: geringer, ↑: deutlicher Anstieg; ↘: geringe, ↓: deutliche Reduktion; ↔: keine signifikante Änderung.

Tabellen

	Sorte	Termin	Behandlung	Ergebnisse
AK1	N	24, 48, 72 h	<i>Aureo.</i>	Expression und Enzymaktivität STS ↑, PAL ↑
			(Hefe) Myc.	Expression und Enzymaktivität STS ↗, PAL ↗
			<i>Botrytis</i>	Infektion durch <i>Aureo.</i> reduziert
AK2	R	0, 5, 7,5, 10, 24, 48 h	<i>Aureo.</i>	Expression und Enzymaktivität STS ↑, PAL ↑; Maximum nach 10 h
		24 h	(Hefe) Myc.	Expression und Enzymaktivität STS ↗, PAL ↗

(c) *Aureobasidium*-Extrakt – Kallus. N: ‘Nero’, R: ‘Regent’. *Aureo.*: *Aureobasidium*-Extrakt, (Hefe) Myc.: Myco-Sin und Hefebestandteil von Myco-Sin, *Botrytis*: Infektion mit *Botrytis*

	Applikation	Termin	Form.?	Ergebnisse
AI1	Medium	24, 48 h	ja	Expression: <i>STS</i> ↑, <i>PAL</i> ↑, Flavonoidgene ↓
AI2	Besprühen	24 h	nein	Expression und Enzymaktivität: <i>STS</i> ↑, <i>PAL</i> ↑; Expression Flavonoidgene ↔/↗
AI3	Besprühen	24 h	nein	Enzymaktivität <i>PAL</i> ↑, <i>STS</i> ↑, <i>CHS</i> ↑
			ja	alle Enzymaktivitäten (auch Kontrolle) ↓

(d) *Aureobasidium*-Extrakt – *in vitro*-Pflanzen ‘Nero’; Medium: Zugabe der *Aureobasidium*-Suspension zum Kulturmedium, Besprühen: Besprühen der Blätter; Form.: ProCa-Formulierung

Tabelle E.3: (Fortsetzung) Übersicht aller Versuche zur Induktion der Phenylpropanoidbiosynthese. Änderung von Expression und Enzymaktivität: ↗: geringer, ↑: deutlicher Anstieg; ↘: geringe, ↓: deutliche Reduktion; ↔: keine signifikante Änderung.

## Tabellen

	Ort	Termin	Ergebnisse
AB1	GwH	0, 24, 48, 72 h	Expression <i>STS</i> ↗, Enzymaktivität STS ↑, Expression Flavonoidgene ↘
AB2	Freiland	0, 12, 24 h	Enzymaktivität STS ↑, Expression <i>STS</i> ↔, Flavonoidgene ↗

(e) *Aureobasidium*-Extrakt – Blüten ('Blauer Spätburgunder'), 'Müller-Thurgau', 'Regent'.

Tabelle E.3: (Fortsetzung) Übersicht aller Versuche zur Induktion der Phenylpropanoidbiosynthese. Änderung von Expression und Enzymaktivität: ↗: geringer, ↑: deutlicher Anstieg; ↘: geringe, ↓: deutliche Reduktion; ↔: keine signifikante Änderung.

## Literatur

- [1] Abrahams, S., E. Lee, A. R. Walker, G. J. Tanner, P. J. Larkin und A. R. Ashton. »The Arabidopsis TDS4 gene encodes leucoanthocyanidin dioxygenase (LDOX) and is essential for proanthocyanidin synthesis and vacuole development«. In: *The Plant Journal* 35.5 (2003). 624–636. DOI: 10.1046/j.1365-3113X.2003.01834.x.
- [2] Adikaram, N. K. B., D. C. Joyce und L. A. Terry. »Biocontrol activity and induced resistance as a possible mode of action for *Aureobasidium pullulans* against grey mould of strawberry fruit«. In: *Australasian Plant Pathology* 31.3 (2002). 223–229. DOI: 10.1071/AP02017.
- [3] Adrian, M., P. Jeandet, R. Bessis und J. M. Joubert. »Induction of Phytoalexin (Resveratrol) Synthesis in Grapevine Leaves Treated with Aluminum Chloride (AlCl<sub>3</sub>)«. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44.8 (1993). 1979–1981. DOI: 10.1021/jf950807o.
- [4] Adrian, M., P. Jeandet, A. C. Douillet-Breuil, L. Tesson und R. Bessis. »Stilbene Content of Mature *Vitis vinifera* Berries in Response to UV-C Elicitation«. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48.12 (2000). 6103–6105. DOI: 10.1021/jf0009910.
- [5] Adrian, M., P. Jeandet, J. Veneau, L. A. Weston und R. Bessis. »Biological Activity of Resveratrol, a Stilbenic Compound from Grapevines, Against *Botrytis cinerea*, the Causal Agent for Gray Mold«. In: *Journal of Chemical Ecology* 23.7 (1997). 1689–1702. DOI: 10.1023/B:JOEC.0000006444.79951.75.
- [6] Adrian, M., H. Rajaei, P. Jeandet, J. Veneau und R. Bessis. »Resveratrol oxidation in *Botrytis cinerea* conidia«. In: *Phytopathology* 88.5 (1998). 472–476. URL: <http://www.apsnet.org/phyto/+toc/1998/pmy98tp.htm>.
- [7] Alokam, S., Y. Li, W. Li, C. C. Chinnappa und D. M. Reid. »Photoregulation of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and chalcone synthase (CHS) in the accumulation of anthocyanin in alpine and prairie ecotypes of *Stellaria longipes* under varied R/FR«. In: *Physiologia Plantarum* 116.4 (2002). 531–538. DOI: 10.1034/j.1399-3054.2002.1160412.x.

## Literatur

- [8] Ambrosi, H., E. Dettweiler, E. H. Rühl, J. Schmid und F. Schumann. *Farbatlas Rebsorten – 300 Sorten und ihre Weine*. Verlag Eugen Ulmer, 1994.
- [9] Austin, M. B., und J. P. Noel. »The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases«. In: *Natural Product Reports* 20.1 (2003). 79–110. DOI: 10.1039/b100917f.
- [10] Austin, M. B., M. E. Bowman, J.-L. Ferrer, J. Schröder und J. P. Noel. »An aldol switch discovered in stilbene synthases mediates cyclization specificity of type III polyketide synthases.«. In: *Chemistry & Biology* 11.9 (2004). 1179–1194. DOI: 10.1016/j.chembiol.2004.05.024.
- [11] Baiges, I., und A. Mas. »Good quality Vitis RNA obtained from an adapted DNA isolation Protocol«. In: *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 37.1 (2003). 59–61.
- [12] Bais, A. J., P. J. Murphy und I. B. Dry. »The molecular regulation of stilbene phytoalexin biosynthesis in Vitis vinifera during grape berry development«. In: *Australian Journal of Plant Physiology* 27.5 (2000). 425–433. DOI: 10.1071/PP00007.
- [13] Bais, H. P., R. Vepachedu, S. Gilroy, R. M. Callaway und J. M. Vivanco. »Allelopathy and Exotic Plant Invasion: From Molecules and Genes to Species Interactions«. In: *Science* 201.5638 (2003). 1377–1380. DOI: 10.1126/science.1083245.
- [14] Baudry, A., M. A. Heim, B. Dubreucq, M. Caboche, B. Weisshaar und L. Lepiniec. »TT2, TT8, and TTG1 synergistically specify the expression of BANYULS and proanthocyanidin biosynthesis in Arabidopsis thaliana«. In: *The Plant Journal* 39.3 (2004). 366–380. DOI: 10.1111/j.1365-3113X.2004.02138.x.
- [15] Bazzi, C., C. Messina, L. Tortoreto, E. Stefani, F. Bini, A. Brunelli, C. Andreotti, E. Sabatini, F. Spinelli, G. Costa, S. Hauptmann, G. Stammler, S. Doerr, J. Marr und W. Rademacher. »Control of Pathogen Incidence in Pome Fruits and Other Horticultural Crop Plants with Prohexadione-Ca«. In: *European Journal of Horticultural Science* 68.3 (2003). 108–114.
- [16] Bézier, A., B. Lambert und F. Baillieul. »Study of defense-related gene expression in grapevine leaves and berries infected with Botrytis cinerea«. In: *European Journal of Plant Pathology* 108.2 (2002). 111–120.

## Literatur

- [17] Bogs, J., A. Ebadi, D. McDavid und S. P. Robinson. »Identification of the Flavonoid Hydroxylases from Grapevine and Their Regulation during Fruit Development«. In: *Plant Physiology* 140.1 (2006). 279–291. DOI: 10.1104/pp.105.073262.
- [18] Bogs, J., M. O. Downey, J. S. Harvey, A. R. Ashton, G. J. Tanner und S. P. Robinson. »Proanthocyanidin Synthesis and Expression of Genes Encoding Leucoanthocyanidin Reductase and Anthocyanidin Reductase in Developing Grape Berries and Grapevine Leaves«. In: *Plant Physiology* 139.2 (2005). 652–663. DOI: 10.1104/pp.105.064238.
- [19] Bogs, J., F. W. Jaffé, A. M. Takos, A. R. Walker und S. P. Robinson. »The Grapevine Transcription Factor VvMYBPA1 Regulates Proanthocyanidin Synthesis during Fruit Development«. In: *Plant Physiology* 143.3 (2007). 1347–1361. DOI: 10.1104/pp.106.093203.
- [20] Boss, P. K., C. Davies und S. P. Robinson. »Analysis of the Expression of Anthocyanin Pathway Genes in Developing *Vitis vinifera* L. cv Shiraz Grape Berries and the Implications for Pathway Regulation«. In: *Plant Physiology* 111.4 (1996). 1059–1066. URL: <http://www.plantphysiol.org/cgi/content/abstract/111/4/1059>.
- [21] Boss, P. K., C. Davies und S. P. Robinson. »Expression of anthocyanin biosynthesis pathway genes in red and white grapes«. In: *Plant Molecular Biology* 32.3 (1996). 565–569. DOI: 10.1007/BF00019111.
- [22] Boukharta, M., M. Girardin und M. Metche. »Procyanidines galloylées du sarment de vigne (*Vitis vinifera*) : Séparation et identification par chromatographie liquide haute performance et chromatographie en phase gazeuse«. In: *Journal of Chromatography A* 455 (1988). 406–409. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)82147-6.
- [23] Bradford, M. M. »A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding«. In: *Analytical Biochemistry* 72.1-2 (1976). 248–254. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- [24] Breuil, A.-C., P. Jeandet, M. Adrian, F. Chopin, N. Pirio, P. Meunier und R. Bessis. »Characterization of a Pterostilbene Dehydrodimer Produced by Laccase of *Botrytis cinerea*«. In: *Phytopathology* 89.4 (1999). 298–302. URL: <http://www.apsnet.org/phyto/+toc/1999/pap99tp.htm>.

## Literatur

- [25] Breuil, A.-C., M. Adrian, N. Pirio, P. Meunier, R. Bessis und P. Jeandet. »Metabolism of Stilbene Phytoalexins by *Botrytis cinerea*: 1. Characterization of a Resveratrol Dehydrodimer«. In: *Tetrahedron Letters* 39.7 (1998). 537–540. DOI: 10.1016/S0040-4039(97)10622-0.
- [26] Burbulis, I. E., M. Iacobucci und B. W. Shirley. »A Null Mutation in the First Enzyme of Flavonoid Biosynthesis Does Not Affect Male Fertility in Arabidopsis«. In: *The Plant Cell* 8.6 (1996). 1013–1025. URL: <http://www.plantcell.org/cgi/content/abstract/8/6/1013>.
- [27] Burbulis, I. E., und B. Winkel-Shirley. »Interactions among enzymes of the Arabidopsis flavonoid biosynthetic pathway«. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 96.22 (1999). 12929–12934. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?tool=pmcentrez&artid=23169>.
- [28] Busam, G., K. T. Junghanns, R. E. Kneusel, H.-H. Kassemeyer und U. Matern. »Characterization and Expression of Caffeoyl-Coenzyme A 3-O-Methyltransferase Proposed for the Induced Resistance Response of *Vitis vinifera* L.«. In: *Plant Physiology* 115.3 (1997). 1039–1048. URL: <http://www.plantphysiol.org/cgi/content/abstract/115/3/1039>.
- [29] Cantos, E., J. C. Espín und F. A. Tomás-Barberán. »Postharvest Stilbene-Enrichment of Red and White Table Grape Varieties Using UV-C Irradiation Pulses«. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50.22 (2002). 6322–6329. DOI: 10.1021/jf020562x.
- [30] Castoria, R., F. D. Curtis, G. Lima, L. Caputo, S. Pacifico und V. D. Cicco. »*Aureobasidium pullulans* (LS-30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits: study on its modes of action«. In: *Postharvest Biology and Technology* 22.1 (2001). 7–17. DOI: 10.1016/S0925-5214(00)00186-1.
- [31] Clarke, O., und M. Rand. *Clarke's grosses Lexikon der Rebsorten*. Droemer Knauer, 2001.
- [32] Daayf, F., A. Schmitt und R. R. Bélanger. »Evidence of Phytoalexins in Cucumber Leaves infected with Powdery Mildew following Treatment with Leaf Extracts of *Reynoutria sachalinensis*«. In: *Plant Physiology* 113.3 (1997). 719–727. URL: <http://www.plantphysiol.org/cgi/content/abstract/113/3/719>.
- [33] Dangelmayr, B. »Nachweis von Enzymen der Flavonoidbiosynthese und der genetischen Kontrolle von Chalkon-Isomerase-Aktivität in Blüten«. Diss. Fakultät für Biologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, 1982.

## Literatur

- [34] Deiml, B. »Klonierung und Charakterisierung von Genen der Flavonoidbiosynthese aus Erdbeere (*Fragaria x ananassa*) und der Einfluss von Prohexadion-Ca und Milsana auf die Flavan 3-ol Biosynthese«. Diss. Technische Universität München, Lehrstuhl für Zierpflanzenbau, 2007.
- [35] Dellus, V., W. Heller, H. Sandermann Jr. und A. Scalbert. »Dihydroflavonol 4-reductase activity in lignocellulosic tissues«. In: *Phytochemistry* 45.7 (1997). 1415–1418. DOI: 10.1016/S0031-9422(97)00128-3.
- [36] Deluc, L., F. Barrieu, C. Marchive, V. Lauvergeat, A. Decendit, T. Richard, J.-P. Carde, J.-M. Mérillon und S. Hamdi. »Characterization of a Grapevine R2R3-MYB Transcription Factor That Regulates the Phenylpropanoid Pathway«. In: *Plant Physiology* 140.2 (2006). 499–511. DOI: 10.1104/pp.105.067231.
- [37] Derckel, J.-P., F. Baillieul, S. Manteau, J.-C. Audran, B. Haye, B. Lambert und L. Legendre. »Differential Induction of Grapevine Defenses by Two Strains of *Botrytis cinerea*«. In: *Phytopathology* 89.3 (1999). 197–203. URL: <http://www.apsnet.org/phyto/PDFS/1999/0129-01R.pdf>.
- [38] Dimitrios, B. »Sources of natural phenolic antioxidants«. In: *Trends in Food Science and Technology* 17.9 (2006). 505–512. DOI: 10.1016/j.tifs.2006.04.004.
- [39] Dixon, R. A., D.-Y. Xie und S. B. Sharma. »Proanthocyanidins – a final frontier in flavonoid research?«. In: *New Phytologist* 165.1 (2005). 9–28. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2004.01217.x.
- [40] Dixon, R. A., L. Achnine, P. Kota, C.-J. Liu, M. S. S. Reddy und L. Wang. »The phenylpropanoid pathway and plant defence – a genomics perspective«. In: *Molecular Plant Pathology* 3.5 (2002). 371–390. DOI: 10.1046/j.1364-3703.2002.00131.x.
- [41] Dugan, F. M., S. L. Lupien und G. G. Grove. »Incidence, Aggressiveness and In Planta Interactions of *Botrytis cinerea* and other Filamentous Fungi Quiescent in Grape Berries and Dormant Buds in Central Washington State«. In: *Journal of Phytopathology* 150.7 (2002). 375–381. DOI: 10.1046/j.1439-0434.2002.00774.x.
- [42] Eckermann, C., G. Schröder, S. Eckermann, D. Strack, J. Schmidt, B. Schneider und J. Schröder. »Stilbenecarboxylate biosynthesis: a new function in the family of chalcone synthase-related proteins«. In: *Phytochemistry* 62.3 (2003). 271–286. DOI: 10.1016/S0031-9422(02)00554-X.



## Literatur

- [43] Eckermann, S., G. Schröder, J. Schmidt, D. Strack, R. A. Edrada, Y. Helariutta, P. Elomaa, M. Kotilainen, I. Kilpeläinen, P. Proksch, T. H. Teeri und J. Schröder. »New pathway to polyketides in plants«. In: *Nature* 396.6709 (1998). 387–390. DOI: 10.1038/24652.
- [44] Elad, Y., H. Yunis und T. Katan. »Multiple fungicide resistance to benzimidazoles, dicarboximides and diethofencarb in field isolates of *Botrytis cinerea* in Israel«. In: *Plant Pathology* 41.1 (1992). 41–46. DOI: 10.1111/j.1365-3059.1992.tb02314.x.
- [45] Elmer, P. A. G., und T. Reglinski. »Biosuppression of *Botrytis cinerea* in grapes«. In: *Plant Pathology* 55.2 (2006). 155–177. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2006.01348.x.
- [46] Faria, M. A., M. Beja-Pereira, A. Martins, M. A. Ferreira und M. E. S. Nunes. »Grapevine clones discriminated using stilbene synthase-chalcone synthase markers«. In: *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84.10 (2004). 1186–1192. DOI: 10.1002/jsfa.1803.
- [47] Ferrer, J.-L., J. M. Jez, M. E. Bowman, R. A. Dixon und J. P. Noel. »Structure of chalcone synthase and the molecular basis of plant polyketide biosynthesis«. In: *Nature Structural Biology* 6.8 (1999). 775–784. DOI: 10.1038/11553.
- [48] Fischer, R., I. Budde und R. Hain. »Stilbene synthase gene expression causes changes in flower colour and male sterility in tobacco«. In: *The Plant Journal* 11.3 (1997). 489–498. DOI: 10.1046/j.1365-313X.1997.11030489.x.
- [49] Fischer, T. C., C. Gosch, J. Pfeiffer, H. Halbwirth, C. Halle, K. Stich und G. Forkmann. »Flavonoid genes of pear (*Pyrus communis*)«. In: *Trees – Structure and Function* 21 (2007). in press. DOI: 10.1007/s00468-007-0145-z.
- [50] Fischer, T. C., H. Halbwirth, S. Roemmelt, E. Sabatini, K. Schlangen, C. Andreotti, F. Spinelli, G. Costa, G. Forkmann, D. Treutter und K. Stich. »Induction of polyphenol gene expression in apple (*Malus x domestica*) after the application of a dioxygenase inhibitor«. In: *Physiologia Plantarum* 128.4 (2006). 604–617. DOI: 10.1111/j.1399-3054.2006.00787.x.
- [51] Fischer, T. C., H. Halbwirth, B. Meisel, K. Stich und G. Forkmann. »Molecular cloning, substrate specificity of the functionally expressed dihydroflavonol 4-reductases from *Malus domestica* and *Pyrus communis* cultivars and the consequences for flavonoid metabolism«. In: *Archives*

## Literatur

- of Biochemistry and Biophysics* 412.2 (2003). 223–230. DOI: 10.1016/S0003-9861(03)00013-4.
- [52] Fofana, B., D. J. McNally, C. Labbé, R. Boulanger, N. Benhamou, A. Séguin und R. R. Bélanger. »Milsana-induced resistance in powdery mildew-infected cucumber plants correlates with the induction of chalcone synthase and chalcone isomerase«. In: *Physiological and Molecular Plant Pathology* 61.2 (2002). 121–132. DOI: 10.1006/pmpp.2002.0420.
- [53] Forkmann, G. »Control of pigmentation in natural and transgenic plants«. In: *Current Opinion in Biotechnology* 4.2 (1993). 159–165. DOI: 10.1016/0958-1669(93)90117-F.
- [54] Fujita, A., N. Soma, N. Goto-Yamamoto, H. Shindo, T. Kakuta, T. Koizumi und K. Hashizume. »Anthocyanidin Reductase Gene Expression and Accumulation of Flavan-3-ols in Grape Berry«. In: *American Journal of Enology and Viticulture* 56.4 (2005). 336–342. URL: <http://www.ajevonline.org/cgi/content/abstract/56/4/336>.
- [55] Fujita, A., N. Goto-Yamamoto, I. Aramaki und K. Hashizume. »Organ-Specific Transcription of Putative Flavonol Synthase Genes of Grapevine and Effects of Plant Hormones and Shading on Flavonol Biosynthesis in Grape Berry Skins«. In: *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 70.3 (2006). 632–638. DOI: 10.1271/bbb.70.632.
- [56] Fujita, N., E. Tanaka und M. Murata. »Cinnamaldehyde Inhibits Phenylalanine Ammonia-Lyase and Enzymatic Browning of Cut Lettuce«. In: *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 70.3 (2006). 672–676. URL: [http://www.jstage.jst.go.jp/article/bbb/70/3/70\\_672\\_article](http://www.jstage.jst.go.jp/article/bbb/70/3/70_672_article).
- [57] Gänsbauer, K.-H. »Untersuchungen zum resistenzinduzierenden Inhaltstoff aus *Reynoutria sachalinensis* (F. Schmidt-Nakai) gegen echte Mehltaupilze«. Diss. Naturwissenschaftliche Fakultäten der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, 1996.
- [58] Geuna, F., H. Hartings und A. Scienza. »A New Method for Rapid Extraction of High Quality RNA from Recalcitrant Tissues of Grapevine«. In: *Plant Molecular Biology Reporter* 16.1 (1998). 61–67. DOI: 10.1023/A:1007433910213.
- [59] Goetz, G., A. Fkyerat, N. Métais, M. Kunz, R. Tabacchi, R. Pezet und V. Pont. »Resistance factors to grey mould in grape berries: identification of some phenolics inhibitors of *Botrytis cinerea* stilbene oxidase«. In:

## Literatur

- Phytochemistry* 52.5 (1999). 759–767. DOI: 10.1016/S0031-9422(99)00351-9.
- [60] Gollop, R., S. Farhi und A. Perl. »Regulation of the leucoanthocyanidin dioxygenase gene expression in *Vitis vinifera*«. In: *Plant Science* 161.3 (2001). 579–588. DOI: 10.1016/S0168-9452(01)00445-9.
- [61] Gómez-Míguez, M., S. González-Manzano, M. T. Escribano-Bailón, F. J. Heredia und C. Santos-Buelga. »Influence of Different Phenolic Copigments on the Color of Malvidin 3-Glucoside«. In: *Journal of Agricultural Food Chemistry* 54.15 (2006). 5422–5429. DOI: 10.1021/jf0604586S0021-8561(06)00458-4.
- [62] Gosch, C., I. Puhl, H. Halbwirth, K. Schlangen, S. Roemmelt, C. Andreotti, G. Costa, T. C. Fischer, D. Treutter, K. Stich und G. Forkmann. »Effect of Prohexadione-Ca on Various Fruit Crops: Flavonoid Composition and Substrate Specificity of their Dihydroflavonol 4-Reductases«. In: *European Journal of Horticultural Science* 68.3 (2003). 144–151.
- [63] Goto-Yamamoto, N., G. H. Wan, K. Masaki und S. Kobayashi. »Structure and transcription of three chalcone synthase genes of grapevine (*Vitis vinifera*)«. In: *Plant Science* 162.6 (2002). 867–872. DOI: 10.1016/S0168-9452(02)00042-0.
- [64] Grimmig, B., M. N. Gonzalez-Perez, G. Welzl, J. Penuelas, R. Schubert, R. Hain, B. Heidenreich, C. Betz, C. Langebartels, D. Ernst und H. Sandermann Jr. »Ethylene- and ozone-induced regulation of a grapevine resveratrol synthase gene: different responsive promoter regions«. In: *Plant Physiology and Biochemistry* 40.10 (2002). 865–870. DOI: 10.1016/S0981-9428(02)01448-1.
- [65] Gu, L., M. A. Kelm, J. F. Hammerstone, G. Beecher, J. Holden, D. Haytowitz, S. Gebhardt und R. L. Prior. »Concentrations of Proanthocyanidins in Common Foods and Estimations of Normal Consumption«. In: *The American Society for Nutritional Sciences* 134.3 (2004). 613–617. URL: <http://jn.nutrition.org/cgi/content/full/134/3/613>.
- [66] Halbwirth, H., T. C. Fischer, S. Roemmelt, F. Spinelli, K. Schlangen, S. Peterek, E. Sabatini, C. Messina, J.-B. Speakman, C. Andreotti, W. Rademacher, C. Bazzi, G. Costa, D. Treutter, G. Forkmann und K. Stich. »Induction of Antimicrobial 3-Deoxyflavonoids in Pome Fruit Trees Controls Fire Blight«. In: *Zeitschrift für Naturforschung* 58c.11/12 (2003). 765–770. URL: <http://www.znaturforsch.com/ac/v58c/c58c.htm>.

## Literatur

- [67] Harborne, J. B., und C. A. Williams. »Advances in flavonoid research since 1992«. In: *Phytochemistry* 55.6 (2000). 481–504. DOI: 10.1016/S0031-9422(00)00235-1.
- [68] Hegnauer, R. *Chemotaxonomie der Pflanzen*. Birkhäuser.
- [69] Heller, W., und G. Forkmann. »Biosynthesis of flavonoids«. In: *The Flavonoids: Advances in research since 1986*. Hg. von J. B. Harborne. Chapman & Hall, London, 1993. 499–535.
- [70] Herger, G. »Die Wirkung von Auszügen aus dem Sachalin-Staudenknötchen *Reynoutria sachalinensis* (F. Schmidt) Nakai gegen Pilzkrankheiten, insbesondere Echte Mehltaupilze«. Diss. Fachbereich Biologie der Technischen Hochschul Darmstadt, 1991.
- [71] Herrmann, K. »Über das Vorkommen und die Bedeutung der Anthocyanine in Lebensmitteln«. In: *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A* 148.5 (1972). 290–302. DOI: 10.1007/BF01458722.
- [72] Hesford, F., und H. P. Ruffner. »Roter Wein aus blauen Trauben«. In: *Schweizerische Zeitschrift für Obst- und Weinbau* 136.25 (2000). 649–652.
- [73] Hesford, F., und K. Schneider. »Anthocyane: Die natürlichen Farbstoffe des Weines«. In: *Schweizerische Zeitschrift für Obst- und Weinbau* 133.22 (1997). 559–561.
- [74] Hillebrand, W., D. Lorenz und F. Louis. *Rebschutz*. 10. Aufl. Fachverlag Fraund, 1995.
- [75] Hillebrand, W., H. Lott und F. Pfaff. *Taschenbuch der Rebsorten*. 13. Aufl. Fachverlag Fraund, 2003.
- [76] Hofmann, U., P. Köpfer und A. Werner. *Ökologischer Weinbau*. Ulmer, 1995.
- [77] Jeandet, P., A.-C. Douillt-Breuil, R. Bessis, S. Debord, M. Sbaghi und M. Adrian. »Phytoalexins from the vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism«. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50.10 (2002). 2731–2741. DOI: 10.1021/jf011429s.
- [78] Jez, J. M., J.-L. Ferrer, M. E. Bowman, R. A. Dixon und J. P. Noel. »Dissection of Malonyl-Coenzyme A Decarboxylation from Polyketide Formation in the Reaction Mechanism of a Plant Polyketide Synthase«. In: *Biochemistry* 39.5 (2000). 890–902. DOI: 10.1021/bi991489fS0006-2960(99)01489-0.

## Literatur

- [79] Jez, J. M., M. B. Austin, J.-L. Ferrer, M. E. Bowmann, J. Schröder und J. P. Noel. »Structural control of polyketide formation in plant-specific polyketide synthases«. In: *Chemistry & Biology* 7.12 (2000). 919–930. DOI: 10.1016/S1074-5521(00)00041-7.
- [80] Jez, J. M., M. E. Bowman, R. A. Dixon und J. P. Noel. »Structure and mechanism of the evolutionarily unique plant enzyme chalcone isomerase«. In: *Nature Structural Biology* 7.9 (2000). 789–791. DOI: 10.1038/79025.
- [81] Kennedy, J. A., M. A. Matthews und A. L. Waterhouse. »Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening«. In: *Phytochemistry* 55.1 (2000). 77–85. DOI: 10.1016/S0031-9422(00)00196-5.
- [82] Kobayashi, S., C. K. Ding, Y. Nakamura, I. Nakajima und R. Matsumoto. »Kiwifruits (*Actinidia deliciosa*) transformed with a *Vitis* stilbene synthase gene produce piceid (resveratrol-glucoside)«. In: *Plant Cell Reports* 19.9 (2000). 904–910. DOI: 10.1007/s002990000203.
- [83] Kobayashi, S., M. Ishimaru, K. Hiraoka und C. Honda. »Myb-related genes of the Kyoho grape (*Vitis labruscana*) regulate anthocyanin biosynthesis«. In: *Planta* 215.6 (2002). 924–933. DOI: 10.1007/s00425-002-0830-5.
- [84] Kobayashi, S., N. Goto-Yamamoto und H. Hirochika. »Retrotransposon-Induced Mutations in Grape Skin Color«. In: *Science* 304.5673 (2004). 982. DOI: 10.1126/science.1095011.
- [85] Koes, R., W. Verweij und F. Quattrocchio. »Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways«. In: *Trends in Plant Science* 10.5 (2005). 236–242. DOI: 10.1016/j.tplants.2005.03.002.
- [86] Kunz, S. »Fire blight control in organic fruit growing – systematic investigation of the mode of action of potential control agents«. In: *Proceedings of the 1st International Symposium on Biological Control of Bacterial Plant Diseases*. Bd. 408. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft. 2005. 249–253. URL: [http://www.bba.bund.de/nn\\_805656/DE/veroeff/mitt/mitt\\_\\_node.html\\_\\_nnn=true](http://www.bba.bund.de/nn_805656/DE/veroeff/mitt/mitt__node.html__nnn=true).
- [87] Lorenz, D. H., K. W. Eichhorn, H. Bleiholder, R. Klose, U. Meier und E. Weber. »Phänologische Entwicklungsstadien der Rebe (*Vitis vinifera* L. ssp. *vinifera*). Codierung und Beschreibung nach der erweiterten BBCH-

## Literatur

- Skala«. In: *Viticultural and Enological Science (Die Weinwissenschaft)* 49.2 (1994). 66–70.
- [88] Lotito, S. B., und B. Frei. »Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: Cause, consequence, or epiphenomenon?«. In: *Free Radical Biology and Medicine* 41.12 (2006). 1727–1746. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2006.04.033.
- [89] MacKenzie, D. J., M. A. McLean, S. Mukerji und M. Green. »Improved RNA Extraction from Woody Plants for the Detection of Viral Pathogens by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction«. In: *Plant Disease* 81.2 (1997). 222–226. URL: <http://www.apsnet.org/pd/PDFS/1996/1216-07S.PDF>.
- [90] Makris, D. P., S. Kallithraka und P. Kefalas. »Flavonols in grapes, grape products and wines: Burden, profile and influential parameters«. In: *Journal of Food Composition and Analysis* 19.5 (2006). 396–404. DOI: 10.1016/j.jfca.2005.10.003.
- [91] Manach, C., A. Scalbert, C. Morand, C. Rémésy und L. Jiménez. »Polyphenols: food sources and bioavailability«. In: *American Journal of Clinical Nutrition* 79.5 (2004). 727–747. URL: <http://www.ajcn.org/cgi/content/full/79/5/727>.
- [92] Martens, S. »Genetische, biochemische und molekularbiologische Untersuchungen der Flavonbiosynthese bei Gerbera Hybriden«. Diss. Technische Universität München, Lehrstuhl für Zierpflanzenbau, Lehrgebiet Pflanzenzüchtung, 1995.
- [93] Melchior, F., und H. Kindl. »Coordinate- and elicitor-dependent expression of stilbene synthase and phenylalanine ammonia-lyase genes in *Vitis* cv. Optima«. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 288.2 (1991). 552–557. DOI: 10.1016/0003-9861(91)90234-A.
- [94] Melchior, F., und H. Kindl. »Grapevine stilbene synthase cDNA only slightly differing from chalcone synthase cDNA is expressed in *Escherichia coli* into a catalytically active enzyme«. In: *FEBS letters* 268.1 (1990). 17–20. DOI: 10.1016/0014-5793(90)80961-H.
- [95] Mérillon, J.-M., B. Fauconneau, P. W. Teguog, L. Barrier, J. Vercauteren und F. Huguet. »Antioxidant Activity of the Stilbene Astringin, Newly Extracted from *Vitis vinifera* Cell Cultures«. In: *Clinical Chemistry* 43.6 (1997). 1092–1093. URL: <http://www.clinchem.org/cgi/content/full/43/6/1092>.

## Literatur

- [96] Mo, Y., C. Nagel und L. P. Taylor. »Biochemical Complementation of Chalcone Synthase Mutants Defines a Role for Flavonols in Functional Pollen«. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89.15 (1992). 7213–7217. DOI: 10.1073/pnas.89.15.7213.
- [97] Murashige, T., und F. Skoog. »A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures«. In: *Physiologia Plantarum* 15.3 (1962). 473–497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
- [98] Nakajima, J., Y. Tanaka, M. Yamazaki und K. Saito. »Reaction Mechanism from Leucoanthocyanidin to Anthocyanidin 3-Glucoside, a Key Reaction for Coloring in Anthocyanin Biosynthesis«. In: *The Journal of Biological Chemistry* 276.28 (2001). 25797–25803. DOI: 10.1074/jbc.M100744200.
- [99] Nassuth, A., E. Pollari, K. Helmecky, S. Stewart und S. A. Kofalvi. »Improved RNA extraction and one-tube RT-PCR assay for simultaneous detection of control plant RNA plus several viruses in plant extracts«. In: *Journal of Virological Methods* 90.1 (2000). 37–49. DOI: 10.1016/S0166-0934(00)00211-1.
- [100] OIV – Internationale Organisation für Rebe und Wein. *Lage des weltweiten Weinbausektors im Jahr 2003*. URL: <http://www.oiv.int/de/accueil/index.php>.
- [101] Olmo, H. P. »Grapes«. In: *Evolution of Crop Plants*. Hg. von J. Smartt und N. W. Simmonds. 2. Aufl. Longman Scientific & Technical, 1995.
- [102] Pervaiz, S. »Resveratrol: from grapevines to mammalian biology«. In: *The FASEB Journal* 17.14 (2003). 1975–1985. DOI: 10.1096/fj.03-0168rev.
- [103] Pezet, R., O. Viret, C. Perret und R. Tabacchi. »Latency of Botrytis cinerea Pers.: Fr. and Biochemical Studies During Growth and Ripening of Two Grape Berry Cultivars, Respectively Susceptible and Resistant to Grey Mould«. In: *Journal of Phytopathology* 151.4 (2003). 208–214. DOI: 10.1046/j.1439-0434.2003.00707.x.
- [104] Pezet, R. »Purification and characterization of a 32-kDa laccase-like stilbene oxidase produced by Botrytis cinerea Pers.:Fr.«. In: *FEMS Microbiology Letters* 167.2 (1998). 203–208. DOI: 10.1016/S0378-1097(98)00391-7.

## Literatur

- [105] Pfeiffer, J., C. Kühnel, J. Brandt, D. Duy, P. A. N. Punyasiri, G. Forkmann und T. C. Fischer. »Biosynthesis of flavan 3-ols by leucoanthocyanidin 4-reductases and anthocyanidin reductases in leaves of grape (*Vitis vinifera* L.), apple (*Malus x domestica* Borkh.) and other crops«. In: *Plant Physiology and Biochemistry* 44.5–6 (2006). 323–334. DOI: 10.1016/j.plaphy.2006.06.001.
- [106] Polster, J., H. Dithmar, R. Burgemeister, G. Friedemann und W. Feucht. »Flavonoids in plant nuclei: detection by laser microdissection and pressure catapulting (LMPC), in vivo staining, and uv-visible spectroscopic titration«. In: *Physiologia Plantarum* 128.1 (2006). 163–174. DOI: 10.1111/j.1399-3054.2006.00721.x.
- [107] Pompon, D., B. Louerat, A. Bronine und P. Urban. »Yeast expression of animal and plant P450s in optimized redox environments«. In: *Methods in Enzymology* 272 (1996). 51–64. DOI: 10.1016/S0076-6879(96)72008-6.
- [108] Punyasiri, P. A. N., I. S. B. Abeysinghe, V. Kumar, D. Treutter, D. Duy, C. Gosch, S. Martens, G. Forkmann und T. C. Fischer. »Flavonoid biosynthesis in the tea plant *Camellia sinensis*: properties of enzymes of the prominent epicatechin and catechin pathways«. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 431.1 (2004). 22–30. DOI: 10.1016/j.abb.2004.08.003.
- [109] Reid, K. E., N. Olsson, J. Schlosser, F. Peng und S. T. Lund. »An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development«. In: *BMC Plant Biology* 6.27 (2006). DOI: 10.1186/1471-2229-6-27.
- [110] Repka, V., I. Fischerová und K. Šilhárová. »Biological activity of the elicitor released from mycelium of a grapevine isolate of the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*«. In: *Vitis* 40.4 (2001). 205–212.
- [111] Riaz, S., A. Doligez, R. J. Henry und M. A. Walker. »Grape«. In: *Fruits and Nuts*. Hg. von C. Kole. Bd. 4. Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants. Springer, 2007.
- [112] Roemmelt, S., T. C. Fischer, H. Halbwirth, S. Peterek, K. Schlangen, J.-B. Speakman, D. Treutter, G. Forkmann und K. Stich. »Effect of dioxygenase inhibitors on the resistance-related flavonoid metabolism of apple and pears: Chemical, biochemical and molecular biological aspects«. In: *European Journal of Horticultural Science* 68.3 (2003). 129–136.



## Literatur

- [113] Romero-Pérez, A. I., R. M. Lamuela-Raventós, C. Andrés-Lacueva und M. C. de la Torre-Boronat. »Method for the Quantitative Extraction of Resveratrol and Piceid Isomers in Grape Berry Skins. Effect of Powdery Mildew on the Stilbene Content«. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49.1 (2001). 210–215. DOI: 10.1021/jf000745o.
- [114] Röther, D., L. Poppe, G. Morlock, S. Viergutz und J. Rétey. »An active site homology model of phenylalanine ammonia-lyase from *P. crispum*«. In: *European Journal of Biochemistry* 269.12 (2002). 3065–3075. URL: <http://www.ejbiochem.org/cgi/content/abstract/269/12/3065>.
- [115] Rühmann, S. »Induktion von Sekundärstoffen in *Vitis vinifera* Kalluskulturen durch Hefe-Elicitoren«. Diss. Technische Universität München, Fachgebiet Obstbau, 2005.
- [116] Rühmann, S., D. Treutter, S. Fritsche, K. Briviba und I. Szankowski. »Piceid (Resveratrol Glucoside) Synthesis in Stilbene Synthase Transgenic Apple Fruit«. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54.13 (2006). 4633–4640. DOI: 10.1021/jf0602491.
- [117] Saito, K., M. Kobayashi, Z. Gong, Y. Tanaka und M. Yamazaki. »Direct evidence for anthocyanidin synthase as a 2-oxoglutarate-dependent oxygenase: molecular cloning and functional expression of cDNA from a red forma of *Perilla frutescens*«. In: *The Plant Journal* 17.2 (1999). 181–189. DOI: 10.1046/j.1365-313X.1999.00365.x.
- [118] Sambrook, J., E. F. Fritsch und T. Maniatis. *Molecular Cloning – A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [119] Saslowsky, D. E., C. D. Dana und B. Winkel-Shirley. »An allelic series for the chalcone synthase locus in *Arabidopsis*«. In: *Gene* 255.2 (2000). 127–138. DOI: 10.1016/S0378-1119(00)00304-8.
- [120] Sbaghi, M., P. Jeandet, R. Bessis und P. Leroux. »Degradation of stilbene-type phytoalexins in relation to the pathogenicity of *Botrytis cinerea* to grapevines«. In: *Plant Pathology* 45.1 (1996). 139–144. DOI: 10.1046/j.1365-3059.1996.d01-101.x.
- [121] Sbaghi, M., P. Jeandet, B. Faivre, R. Bessis und J. C. Fournioux. »Development of methods using phytoalexin (resveratrol) assessment as a selection criterion to screen grapevine in vitro cultures for resistance to grey mould (*Botrytis cinerea*)«. In: *Euphytica* 86.1 (1995). 41–47. DOI: 10.1007/BF00035937.

## Literatur

- [122] Schlösser, E. »Preformed Phenols as Resistance Factors«. In: *International Symposium on Natural Phenols in Plant Resistance*. Acta Horticulturae 381. 1994.
- [123] Schmitt, A., S. Kunz, S. Nandi, B. Seddon und A. Ernst. »Use of *Reynoutria sachalinensis* plant extracts, clay preparations and *Brevibacillus brevis* against fungal diseases of grape berries«. In: *10th International Conference on Cultivation Technique and Phytopathological Problems in Organic Fruit-Growing*. Staatliche Lehr- und Versuchsanstalt für Wein- und Obstbau. Weinsberg/Germany 2002. 146–151.
- [124] Schneider, S., und W. R. Ullrich. »Differential induction of resistance and enhanced enzyme activities in cucumber and tobacco caused by treatment with various abiotic and biotic inducers«. In: *Physiological and Molecular Plant Pathology* 45.4 (1994). 291–304. DOI: 10.1016/S0885-5765(05)80060-8.
- [125] Schöppner, A., und H. Kindl. »Purification and properties of a stilbene synthase from induced cell suspension cultures of peanut«. In: *Journal of Biological Chemistry* 259.11 (1984). 6806–6811. URL: <http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/259/11/6806>.
- [126] Schröder, G., J. W. S. Brown und J. Schröder. »Molecular analysis of resveratrol synthase. cDNA, genomic clones and relationship with chalcone synthase.«. In: *European Journal of Biochemistry* 172.1 (1988). 161–169. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1988.tb13868.x.
- [127] Schröder, J. »The Chalcone/Stilbene Synthase-type Family of Condensing Enzymes«. In: *Polyketides and other secondary metabolites including fatty acids and their derivatives*. Hg. von U. Sankawa. Bd. 1. Comprehensive Natural Products Chemistry. Elsevier, Amsterdam, 1999. 749–771.
- [128] Schröder, J., W. Heller und K. Hahlbrock. »Flavanone synthase: Simple and rapid assay for the key enzyme of flavonoid biosynthesis«. In: *Plant Science Letters* 14.3 (1979). 281–286. DOI: 10.1016/0304-4211(79)90083-X.
- [129] Seitz, C., C. Eder, B. Deiml, S. Kellner, S. Martens und G. Forkmann. »Cloning, Functional Identification and Sequence Analysis of Flavonoid 3'-hydroxylase and Flavonoid 3',5'-hydroxylase cDNAs Reveals Independent Evolution of Flavonoid 3',5'-hydroxylase in the Asteraceae Family«. In: *Plant Molecular Biology* 61.3 (2006). 365–381. DOI: 10.1007/s11103-006-0012-0.

## Literatur

- [130] Serazetdinova, L., K. H. Oldach und H. Lörz. »Expression of transgenic stilbene synthases in wheat causes the accumulation of unknown stilbene derivatives with antifungal activity«. In: *Journal of Plant Physiology* 162.9 (2005). 985–1002. DOI: 10.1016/j.jplph.2004.11.005.
- [131] Souquet, J.-M., V. Cheynier, F. Brossaud und M. Moutounet. »Polymeric proanthocyanidins from grape skins«. In: *Phytochemistry* 43.2 (1996). 509–512. DOI: 10.1016/0031-9422(96)00301-9.
- [132] Sparvoli, F., C. Martin, A. Scienza, G. Gavazzi und C. Tonelli. »Cloning and molecular analysis of structural genes involved in flavonoid and stilbene biosynthesis in grape (*Vitis vinifera* L.)«. In: *Plant Molecular Biology* 24.5 (1994). 743–755. DOI: 10.1007/BF00029856.
- [133] Springob, K., J. Nakajima, M. Yamazaki und K. Saito. »Recent advances in the biosynthesis and accumulation of anthocyanins«. In: *Natural Product Reports* 20.3 (2003). 288–303. DOI: 10.1039/b109542k.
- [134] Stark-Lorenzen, P., B. Nelke, G. Hänßler, H. P. Mühlbach und J. E. Thomzik. »Transfer of a grapevine stilbene synthase gene to rice (*Oryza sativa* L.)«. In: *Plant Cell Reports* 16.10 (1997). 668–673. DOI: 10.1007/s002990050299.
- [135] Statistisches Bundesamt Deutschland. *Landwirtschaftliche Bodennutzung – Rebflächen*. Fachserie 3–3.1.5. 2006. URL: <http://www-ec.destatis.de/csp/shop/sfg/n0000.csp?treeid=41000>.
- [136] Suh, D.-Y., J. Kagami, K. Fukuma, N. Iwanami, Y. Yamazaki, H. Yurimoto, Y. Sakai, N. Kato, M. Shibuya, Y. Ebizuka und U. Sankawa. »Chalcone and Stilbene Synthases Expressed in Eucaryotes Exhibit Reduced Cross-Reactivity in Vitro«. In: *Chemical & pharmaceutical bulletin* 48.7 (2000). 1051–1054. URL: <http://ci.nii.ac.jp/naid/110003635598/en/>.
- [137] Szankowski, I., K. Briviba, J. Fleschhut, J. Schönherr, H.-J. Jacobsen und H. Kiesecker. »Transformation of apple (*Malus domestica* Borkh.) with the stilbene synthase gene from grapevine (*Vitis vinifera* L.) and a PGIP gene from kiwi (*Actinidia deliciosa*)«. In: *Plant Cell Reports* 22.2 (2003). 141–149. DOI: 10.1007/s00299-003-0668-8.
- [138] Takesako, K., K. Ikai, F. Haruna, M. Endo, K. Shimanaka, E. Sono, T. Nakamura, I. Kato und H. Yamaguchi. »Aureobasidins, new antifungal antibiotics – Taxonomy, Fermentation, Isolation, and Properties«. In: *Journal of Antibiotics* 44.9 (1991). 919–924. URL: [http:](http://)

## Literatur

- //www.journalarchive.jst.go.jp/english/jnlabstract\_en.php?cdjournal=antibiotics1968&cdvol=44&noissue=9&startpage=919.
- [139] Tanner, G. J., K. T. Francki, S. Abrahams, J. M. Watson, P. J. Larkin und A. R. Ashton. »Proanthocyanidin Biosynthesis in Plants«. In: *The Journal of Biological Chemistry* 278.34 (2003). 31647–31656. DOI: doi: 10.1074/jbc.M302783200.
- [140] Tassoni, A., S. Fornalè, M. Franceschetti, F. Musiani, A. J. Michael, B. Perry und N. Bagni. »Jasmonates and Na-orthovanadate promote resveratrol production in *Vitis vinifera* cv. Barbera cell cultures«. In: *New Phytologist* 166.3 (2005). 895–905. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2005.01383.x.
- [141] Taylor, L. P., und E. Grotewold. »Flavonoids as developmental regulators«. In: *Current Opinion in Plant Biology* 8.3 (2005). 317–323. DOI: 10.1016/j.pbi.2005.03.005.
- [142] Tesnière, C., und C. Verriès. »Molecular cloning and expression of cDNAs encoding alcohol dehydrogenases from *Vitis vinifera* L. during berry development«. In: *Plant Science* 157.1 (2000). 77–88. DOI: 10.1016/S0168-9452(00)00274-0.
- [143] Thomzik, J. E., K. Stenzel, R. Stöcker, P. Schreier, R. Hain und D. J. Stahl. »Synthesis of a grapevine phytoalexin in transgenic tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.) conditions resistance against *Phytophthora infestans*«. In: *Physiological and Molecular Plant Pathology* 51.4 (1997). 265–278. DOI: 10.1006/pmpp.1997.0123.
- [144] Treutter, D. »Significance of Flavonoids in Plant Resistance and Enhancement of Their Biosynthesis«. In: *Plant Biology (Stuttgart)* 7.6 (2005). 581–591. DOI: 10.1055/s-2005-873009.
- [145] Tropf, S., T. Lanz, S. A. Rensing, J. Schröder und G. Schröder. »Evidence that stilbene synthases have developed from chalcone synthases several times in the course of evolution«. In: *Journal of Molecular Evolution* 38.6 (1994). 610–618. DOI: 10.1007/BF00175881.
- [146] Tropf, S., B. Kärcher, G. Schröder und J. Schröder. »Reaction Mechanisms of Homodimeric Plant Polyketide Synthases (Stilbene and Chalcone Synthase)«. In: *Journal of Biological Chemistry* 270.14 (1995). 7922–7928. DOI: 10.1074/jbc.270.14.7922.

## Literatur

- [147] Turnbull, J. J., W. J. Sobey, R. T. Aplin, A. Hassan, J. L. Firmin, C. J. Schofield und A. G. Prescott. »Are anthocyanidins the immediate products of anthocyanidin synthase?«. In: *Chemical Communications* 24 (2000). 2473–2474. DOI: 10.1039/b007594i.
- [148] Turnbull, J. J., A. G. Prescott, C. J. Schofield und R. C. Wilmouth. »Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction of anthocyanidin synthase from *Arabidopsis thaliana*«. In: *Acta Crystallographica Section D* 57.3 (2001). 425–427. DOI: 10.1107/S0907444900019818.
- [149] Walker, A. R., E. Lee, J. Bogs, D. A. J. McDavid, M. R. Thomas und S. P. Robinson. »White grapes arose through the mutation of two similar and adjacent regulatory genes«. In: *The Plant Journal* 49.5 (2007). 772–785. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2006.02997.x.
- [150] Wellmann, F., M. Griesser, W. Schwab, S. Martens, W. Eisenreich, U. Matern und R. Lukačín. »Anthocyanidin synthase from *Gerbera hybrida* catalyzes the conversion of (+)-catechin to cyanidin and a novel procyanidin«. In: *FEBS Letters* 580.6 (2006). 1642–1648. DOI: 10.1016/j.febslet.2006.02.004.
- [151] Wiese, W., B. Vornam, E. Krause und H. Kindl. »Structural organization and differential expression of three stilbene synthase genes located on a 13 kb grapevine DNA fragment«. In: *Plant Molecular Biology* 26.2 (1994). 667–677. DOI: 10.1007/BF00013752.
- [152] Wilmouth, R. C., J. J. Turnbull, R. W. D. Welford, I. J. Clifton, A. G. Prescott und C. J. Schofield. »Structure and Mechanism of Anthocyanidin Synthase from *Arabidopsis thaliana*«. In: *Structure* 10.1 (2002). 93–103. DOI: 10.1016/S0969-2126(01)00695-5.
- [153] Winkel-Shirley, B. »Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology«. In: *Plant Physiology* 126.2 (2001). 485–493.
- [154] Xie, D.-Y., und R. A. Dixon. »Proanthocyanidin biosynthesis – still more questions than answers?«. In: *Phytochemistry* 66.18 (2005). 2127–2144. DOI: 10.1016/j.phytochem.2005.01.008.
- [155] Xie, D.-Y., S. B. Sharma und R. A. Dixon. »Anthocyanidin reductases from *Medicago truncatula* and *Arabidopsis thaliana*«. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 422.1 (2004). 91–102. DOI: 10.1016/j.abb.2003.12.011.

## Literatur

- [156] Xie, D.-Y., S. B. Sharma, E. Wright, Z.-Y. Wang und R. A. Dixon. »Metabolic engineering of proanthocyanidins through co-expression of anthocyanidin reductase and the PAP1 MYB transcription factor«. In: *The Plant Journal* 45.6 (2006). 895–907. DOI: 10.1111/j.1365-3113X.2006.02655.x.
- [157] Xie, D.-Y., S. B. Sharma, N. L. Paiva, D. Ferreira und R. A. Dixon. »Role of Anthocyanidin Reductase, Encoded by BANYULS in Plant Flavonoid Biosynthesis«. In: *Science* 299.5605 (2003). 396–399. DOI: 10.1126/science.1078540.
- [158] Yamaguchi, T., F. Kurosaki, D.-Y. Suh, U. Sankawa, M. Nishioka, T. Akiyama, M. Shibuya und Y. Ebizuka. »Cross-reaction of chalcone synthase and stilbene synthase overexpressed in *Escherichia coli*«. In: *FEBS Letters* 460.3 (1999). 457–461. DOI: 10.1016/S0014-5793(99)01403-9.
- [159] Zeller, W., und P. Laux. »Perspektiven zur Bekämpfung des Feuerbrandes mit biologischen und anderen alternativen Präparaten«. In: *Gesunde Pflanzen* 54.3+4 (2002). 86–91.
- [160] Zheng, D., G. Schröder, J. Schröder und G. Hrazdina. »Molecular and biochemical characterization of three aromatic polyketide synthase genes from *Rubus idaeus*«. In: *Plant Molecular Biology* 46.1 (2001). 1–15. DOI: 10.1023/A:1010642517738.

# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben. Besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Gert Forkmann für die Überlassung des Themas, sein entgegengebrachtes Vertrauen und seine Begleitung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Wilfried Schwab für die Übernahme des Prüfungsausschussvorsitzes und Herrn Prof. Dr. Dieter Treutter für die Übernahme des Coreferats.

Dr. Thilo Fischer für seine stets geöffnete Türe, seine Hilfsbereitschaft und die ungezählten Ratschläge.

Dr. Susanne Rühmann und den Mitarbeitern des Lehrgebiets Obstbau für die gute Zusammenarbeit bei der Durchführung der gemeinsamen Versuche.

Wiebke Rathje und Bettina Deiml für die zahlreichen, in jeder Hinsicht hilfreichen Gespräche.

allen Studenten, die als Diplomanten, Praktikanten und studentische Hilfwissenschaftler mit ihrer Motivation und Begeisterung die Arbeit am Lehrstuhl bereichert haben.

dem Personal des Lehrstuhls für die Pflege der Pflanzen und die Hilfe bei der Gewebekultur und bei Laborarbeiten.

Erna Look und Waltraud Deragisch, auch für ihre Unterstützung bei formalen und bürokratischen Angelegenheiten.

und nicht zuletzt meiner Familie und meinen Freunden, die mich durch die Höhen und Tiefen dieser Arbeit begleitet haben, mir zugehört haben und mich auch immer wieder auf andere Gedanken brachten.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Judith Pfeiffer  
Geboren am 19.07.1977 in Reutlingen  
Familienstand: unverheiratet  
Staatsangehörigkeit: deutsch

## Schulbildung

1983–1987      Grundschule in Metzingen-Neuhausen  
1987–1996      Gymnasium in Metzingen  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

## Berufsausbildung

09/1996–09/1998      Ausbildung zur Gärtnerin (Zierpflanzenbau) bei Gärtnerei  
Dietter, Ofterdingen

## Studium

11/1998–07/2003      Studium der Gartenbauwissenschaften an der TU München  
Abschluss: Dipl.-Ing. agr. (Univ.)  
Diplomarbeit am Lehrstuhl für Zierpflanzenbau: »Klonierung  
von Flavonoid-Genen aus Gerbera-Wildarten«

## Berufliche Tätigkeit

10/2003–06/2005      Wissenschaftliche Angestellte an der TU München, Lehr-  
stuhl für Zierpflanzenbau  
Mitarbeit am Projekt »Induzierte Pathogenabwehr«, geför-  
dert vom Bayerischen Umweltministerium (StMUGV).  
seit 07/2005      Wissenschaftliche Angestellte an der Philipps-Universität  
Marburg, Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie  
Mitarbeit am EU-Projekt »FLAVO – Flavonoids in fruits  
and vegetables: their impact on food quality, nutrition and  
human health«