

Technische Universität München
Wissenschaftszentrum Weihenstephan
für Ernährung, Landnutzung und Umwelt
Fachgebiet Obstbau

**Studien zur Genexpression in Apfelblättern (*Malus domestica*)
nach Inokulation mit *Venturia inaequalis***

Christine Zistler

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

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. R. Matyssek
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. D.R. Treutter
2. Univ.-Prof. Dr. G. Wenzel (schriftliche Beurteilung)
Univ.-Prof. Dr. W. Oßwald (mündliche Prüfung)

Die Dissertation wurde am 11.09.2007 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 11.12.2007 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 <i>Venturia inaequalis</i> - <i>Malus domestica</i> -Interaktion	1
1.1.1 Der Erreger <i>V. inaequalis</i>	1
1.1.2 Resistenzen von Apfel gegenüber <i>V. inaequalis</i>	3
1.1.3 Abwehrmechanismen.....	4
1.1.3.1 Phytoalexine	5
1.1.3.2 PR-Proteine	8
1.2 Bedeutung von Stickstoff für den Metabolismus	9
1.3 Problemstellung und Zielsetzung.....	10
2 Material und Methoden	11
2.1 Material	11
2.1.1 Chemikalien, Kits und Oligonukleotide.....	11
2.1.2 Medien und Puffer	11
2.1.3 Pflanzenmaterial	12
2.1.4 Bakterienstämme und Plasmide.....	13
2.2 Methoden.....	13
2.2.1 <i>V. inaequalis</i> -Inokulation und Probenahme	13
2.2.2 <i>V. inaequalis</i> -Bonitur	14
2.2.3 RNA-Extraktion.....	14
2.2.3.1 Extraktion von Gesamt-RNA aus <i>V. inaequalis</i>	14
2.2.3.2 Extraktion von Gesamt-RNA aus Apfelblättern	15
2.2.3.3 Konzentrationsbestimmung der Gesamt-RNA.....	15
2.2.3.4 Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von RNA.....	16
2.2.4 Plasmid-DNA-Extraktion aus Bakterien.....	16
2.2.5 Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von DNA.....	16
2.2.6 Differentielle cDNA-Banken.....	17
2.2.7 Transformation und Kultivierung von Bakterien.....	18

2.2.8	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	18
2.2.8.1	Standard-PCR und Aufreinigung von PCR-Produkten	18
2.2.8.2	<i>Real-time</i> quantitative reverse Transkription PCR (qRT-PCR).....	18
2.2.8.3	Sequenzier-PCR	20
2.2.9	DNA-Sequenzierung	20
2.2.10	<i>In vitro</i> RNA-Synthese.....	21
2.2.11	Hybridisierung	22
2.2.11.1	Erstellung von Makroarrays.....	22
2.2.11.2	Hybridisierungssonden	22
2.2.11.3	Hybridisierungsbedingungen	22
2.2.11.4	Computergestützte Auswertung von Autoradiogrammen	23
2.2.12	HPLC-Analysen.....	23
2.2.13	Statistische Auswertung	26
3	<i>V. inaequalis</i>-Detektion	29
3.1	Ergebnisse.....	29
3.1.1	<i>V. inaequalis</i> -Bonitur	29
3.1.2	<i>V. inaequalis</i> -Quantifizierung mittels qRT-PCR.....	30
3.1.3	<i>V. inaequalis</i> -Quantifizierung mittels Makroarray.....	32
3.2	Diskussion	33
4	Wachstumsdaten der Freilandbäume	35
4.1	Ergebnisse.....	35
4.1.1	Blatt-N-Gehalt	35
4.1.2	Triebwachstum.....	35
4.1.3	Stammdurchmesser	37
4.1.4	Ertrag.....	37
4.2	Diskussion	38
5	Studien an normal N-versorgten Folienhausbäumen	41
5.1	Ergebnisse.....	41
5.1.1	Genbank „WILD 2004“ und Erstellung des „Makroarrays 2004“.....	41

5.1.2	Genexpression.....	42
5.1.3	Quantifizierung von Flavonoidgenen mittels qRT-PCR.....	44
5.1.4	Phenolische Inhaltsstoffe.....	45
5.2	Diskussion	48
6	Studien an unterschiedlich N-versorgten Folienhausbäumen	53
6.1	Ergebnisse.....	53
6.1.1	Sequenzanalysen der cDNA-Klone der differentiellen Genbanken	53
6.1.1.1	Genbank „Golden Delicious“	53
6.1.1.2	Genbank „Rewena früh“	54
6.1.1.3	Genbank „Rewena ontogenetisch“	54
6.1.2	Erstellung des „Makroarrays 2005“	55
6.1.3	Genexpression.....	55
6.1.3.1	Behandlungsunterschiede	57
6.1.3.2	Sortenunterschiede.....	58
6.1.3.3	N-Unterschiede.....	59
6.1.3.4	Altersunterschiede	60
6.1.3.5	Expressionsanalysen der Flavonoidgene	61
6.1.3.6	Expressionsanalysen unterschiedlich stark infizierter Blätter.....	63
6.1.4	Phenolische Inhaltsstoffe.....	65
6.2	Diskussion	69
7	Studien an Freilandbäumen	75
7.1	Ergebnisse.....	75
7.1.1	Genexpression.....	75
7.1.1.1	Sortenunterschiede.....	76
7.1.1.2	N-Unterschiede.....	77
7.1.1.3	Altersunterschiede	78
7.1.1.4	Expressionsanalysen der Flavonoidgene	80
7.1.2	Phenolische Inhaltsstoffe.....	81
7.2	Diskussion	85

8	Gesamtdiskussion.....	89
8.1	Methodenvalidierung	89
8.2	Genexpression.....	90
8.3	Vergleich der Genexpression in Apfel und Kartoffel	99
8.4	Konkurrenz zwischen Wachstum und Abwehr	100
8.5	<i>pal</i> - und <i>chs</i> -Genexpression und Phenolkonzentrationen	101
8.6	Hypothese über die Mechanismen der Schorfabwehr.....	102
9	Zusammenfassung.....	105
10	Summary	107
11	Literaturverzeichnis.....	109
12	Anhang	119

Abkürzungsverzeichnis

Acc.no.	Zugangscode zur Datenbank (<i>accession number</i>)
ANR	Anthocyanidinreduktase
ANS	Anthocyanidinsynthase
APX	Ascorbatperoxidase
AS	Aminosäure
B	Blatt
bp	Basenpaare
CAD	Cinnamylalkoholdehydrogenase
cDNA	<i>complementary/copy deoxyribonucleic acid</i>
CHI	Chalkonisomerase
CHS	Chalkonsynthase
Ci	Curie (Einheit radioaktiver Aktivität)
CoA	Coenzym A
Ct-Wert	Zyklenzahl (<i>threshold cycle</i>), bei der ein Fluoreszenzsignal einen Schwellenwert signifikant übersteigt
C4H	Zimtsäure 4-Hydroxylase
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DFR	Dihydroflavonol 4-Reduktase
DMAZA	Dimethylaminozimtaldehyd
DNA	Desoxyribonucleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dpi	Tage nach Inokulation (<i>days post inoculation</i>)
dpm	Zerfälle pro Minute (<i>decays per minute</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat
EST	<i>expressed sequence tag</i>
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
E-Wert	Erwartungswert

FAD	Formamid-Dextranblau
FGT	Flavonoid 3- <i>O</i> -Glucosyltransferase
FH	Folienhaus
FHT	Flavanon 3-Hydroxylase
FL	Freiland
FLS	Flavonolsynthase
FNR	Flavanon 4-Reduktase
F3'H	Flavonoid 3'-Hydroxylase
F3'5'H	Flavonoid 3',5'-Hydroxylase
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s)
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase
GD	Golden Delicious
GTP	Guanintriphosphat
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (<i>high pressure liquid chromatography</i>)
ID	Innendurchmesser
K	nicht inokulierte Kontrolle
LAR	Leucoanthocyanidin 4-Reduktase
LB _{Amp} -Festmedium	Luria-Bertani-Ampicillin-Festmedium
MOPS	2-Morpholinopropansulfonsäure
ns	keine signifikante Homologie (<i>no significance</i>)
NTP	Nukleosidtriphosphat
nVol	Pixelintensität einer membrangebundenen cDNA bezogen auf die <i>spiking control</i> (<i>normalized volume</i>)
N1, N2, N3	Stickstoffstufe 1, 2, 3 (moderate, normale, luxuriöse N-Düngung)
OD	optische Dichte
PAL	Phenylalaninammoniumlyase
p _{Bon}	Bonferroni-korrigierter p-Wert
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)

PDB-Medium	Kartoffel-Dextrose-Flüssigmedium (<i>potato dextrose broth</i>)
PPO	Polyphenoloxidase
PR	Pathogenese assoziiert (<i>pathogenesis related</i>)
qRT-PCR	<i>real-time</i> quantitative reverse Transkription PCR
QTL	<i>quantitative trait locus</i>
Re	Rewena
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rotations per minute</i>)
Rubisco	Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/-oxygenase
SAR	systemisch erworbene Resistenz (<i>systemic aquired resistance</i>)
SCC	Natriumcitratpuffer (<i>saline sodium citrate</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SOC	<i>salt-optimized + Carbon</i>
SIMR	<i>stress-induced metabolic response</i>
SSTE	<i>saline sodium dodecyl sulfate</i> Tris-EDTA (Natrium-SDS-Tris-EDTA)
T _a	Annealingtemperatur
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TS	Trockensubstanz
U	<i>unit</i>
Vi	<i>Venturia inaequalis</i>

1 Einleitung

1.1 *Venturia inaequalis*-*Malus domestica*-Interaktion

Apfelschorf, verursacht durch den pilzlichen Erreger *Venturia inaequalis*, ist weltweit eine der bedeutendsten und am intensivsten untersuchten Krankheiten im Apfelbau. Er tritt am Apfel, aber auch an anderen *Malus*-Arten auf und verursacht durch vorzeitigen Blatt- und Fruchtfall sowie durch Minderung der Fruchtqualität erhebliche Ertragsausfälle.

1.1.1 Der Erreger *V. inaequalis*

Biologie

Beim Erreger des Apfelschorfs sind zwei Fruchtformen zu unterscheiden: Die Hauptfruchtform *V. inaequalis*, deren Ascosporen in Falllaub überwintern und im Frühjahr Primärinfektionen verursachen, und die Nebenfruchtform *Spilocea pomi*, deren Konidiosporen auf Blättern und Früchten im Frühling und Sommer entstehen und Sekundärinfektionen verursachen (Abbildung 1). *V. inaequalis* zählt zu den Ascomyceten (griechisch: *ascus* = Schlauch, *mycos* = Pilz), also zu den Schlauchpilzen. Die Gattungsbezeichnung erfolgte 1844 zu Ehren des italienischen Botanikers und Pilzforschers Antonio Venturi. Der wissenschaftliche Arname *inaequalis* geht auf die charakteristische unterschiedliche Größenausbildung der zweizeiligen Ascosporen zurück. Bereits im Jahr 1819 wurde erstmals das Auftreten von Apfelschorf beobachtet.

Etwa ab Ende Februar/Anfang März sind die Fruchtkörper des Pilzes in den abgefallenen Blättern des Vorjahres ausgebildet und noch vor Knospenaufbruch können reife Ascosporen vorhanden sein. Durch Feuchtigkeit und Wärme quellen und platzen die Sporenbehälter, so dass die Ascosporen herausgeschleudert werden und mit dem Wind auf Apfelblätter gelangen. Ausschlaggebend für die Infektion eines Blattes ist in erster Linie das Zusammenspiel von Blattnässedauer und Temperatur, ein Zusammenhang, den MILLS und LAPLANTE schon 1951 tabellarisch darstellten und der neben der Sporenkonzentration in der Luft noch heute die Grundlage des Schorfwarndienstes darstellt. Optimale Bedingungen für die Keimung der Ascosporen auf dem Blatt sind 17-24 °C bei gleichzeitigem Regen. Nach circa 15 Stunden wird an der Spitze des Keimschlauchs ein Appressorium gebildet, das von einer schleimigen Hülle umgeben ist und so für eine bessere Haftfähigkeit sorgt. Die Zellwand wird partiell abgebaut und an der Kontaktfläche zur Kutikula entsteht eine kreisförmige Penetrationspore sowie ein darüber liegender *infection sac*. Unterhalb der Penetrationspore findet ein enzymatisches Auflösen der Kutikula durch pilzliche Hydrolasen statt (KOELLER et al. 1991). Aus der Membran des *infection sac* wird eine Infektionshyphe (Primärhyphe) gebildet,

welche die Kutikula durchdringt. Der Pilz wächst nun strahlenförmig als so genanntes Stroma vom Eindringungsort zwischen Kutikula und Epidermis. Während die Sporenkeimung, Appressorienbildung und Penetration bei schorfanfälligen und -resistenten Sorten gleichermaßen verläuft, tritt die Stromabildung nur bei anfälligen Sorten auf. In Abhängigkeit von den Umweltbedingungen und der Anfälligkeit des Wirts durchbrechen nach etwa zwei bis drei Wochen Konidiophoren die Kutikula und bilden sporulierende Läsionen an der Blattoberfläche. Gleichzeitig werden in den Pflanzenzellen Plastiden abgebaut und es kommt zu einer Vakuolisierung in den Palisadenzellen. Aus den Konidiophoren wiederum werden mehrere einzellige birnenförmige Konidien gebildet, welche für die Sekundärinfektionen verantwortlich sind (WILLIAMS und KUC 1969).

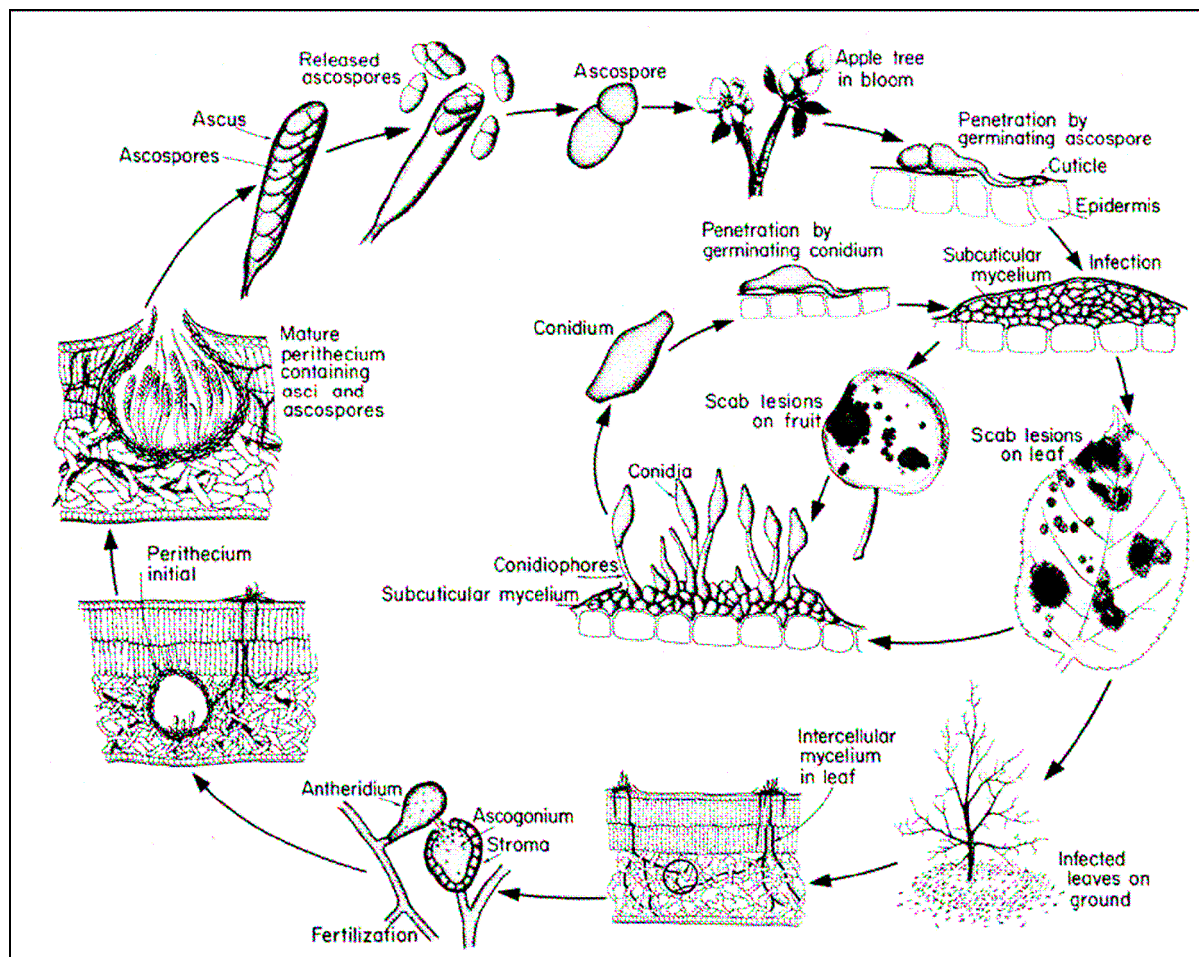


Abbildung 1 Lebenszyklus von *V. inaequalis*, dem Erreger des Apfelschorfs nach AGRIOS (1970).

Schadbild

Die ersten makroskopisch sichtbaren Schorfsymptome treten je nach Witterung ungefähr ab Anfang Mai und damit erst etwa drei Wochen nach den Primärinfektionen auf. Zunächst sind Aufhellungen auf der Blattoberseite sichtbar, bald darauf schwarzgrüne, eng begrenzte

Flecken, die sich rasch vergrößern, ineinander übergehen und so bald große Teile der Blattoberfläche bedecken können (Abbildung 2). Nach und nach vertrocknet das Blatt von den Befallsflecken aus und fällt schließlich ab.

Beim Fruchtschorf ist zwischen Früh-, Spät- und Lagerschorf zu unterscheiden. Der Frühschorf in Form kleiner dunkler Flecken tritt an jungen Früchten etwa Anfang Juni auf. Die Flecken vergrößern und verteilen sich mit dem Fruchtwachstum, wobei das befallene Gewebe verkorkt (Abbildung 2). Mit dem gegen Ende des Fruchtwachstums auftretenden Spätschorf entstehen viele schwarze Flecken auf den Äpfeln. Mit dem durch Spätinfektionen verursachten Lagerschorf schließlich zeigt sich der Pilz erst nach der Ernte auf gesund eingelagerten Früchten. Neben Blättern und Früchten werden auch Blatt- und Fruchtstiele sowie einjährige Triebe vom Apfelschorf befallen (KOLBE 1987).



Abbildung 2 Apfelschorfsymptome an Blatt sowie junger und alter Frucht der Sorte Golden Delicious.

1.1.2 Resistenzen von Apfel gegenüber *V. inaequalis*

Resistenzen gegenüber Krankheiten können auf verschiedenen Ebenen beschrieben werden. Dazu gehören die Nichtwirtresistenz, pathogen- und rassenspezifische Resistenz, Resistenzen, die vom Pflanzenalter abhängig sind, oder organspezifische Resistenz (HAMMERSCHMIDT 1999). Beim Apfel beispielsweise zeigen mitunter auch schorfanfällige Sorten Resistenzen gegen einzelne *V. inaequalis*-Stämme (PARISI et al. 1993, PARISI und LESPINASSE 1996). Darüber hinaus sind altersbedingte Abwehrreaktionen bei Apfelblättern zu beobachten (LI und XU 2002).

Die *V. inaequalis*-*Malus*-Interaktion ist eines der ersten Beispiele, für das eine Gen-für-Gen Interaktion nachgewiesen werden konnte (WILLIAMS und SHAY 1957). Die so genannte Gen-für-Gen Hypothese (FLOR 1956) postuliert das Vorhandensein komplementärer Resistenzgene in der Wirtspflanze und Avirulenzgene im Pathogen. Aufgrund der wesentlich einfacheren züchterischen Bearbeitung benutzten Apfelzüchter in der Vergangenheit in erster Linie solche

einzelnen Resistenzgene mit guter Feldresistenz gegen Apfelschorf bzw. eine Gruppe nahe beieinander liegender Gene (KELLERHALS et al. 2002). Diese Resistenzgene stammen in der Regel aus Apfel-Wildarten wie *M. floribunda*, *M. micromalus*, *M. pumila*, *M. atrosanguinea* oder *M. baccata jackii*. Bis heute wurden 14 Apfelresistenzgene (BROGGINI et al. 2006) in verschiedenen Apfelsorten identifiziert und teilweise bereits im Apfelgenom kartiert, wohingegen deren Funktion nach wie vor unbekannt ist: *Vf* (MALIEPAARD et al. 1998), *Va* und *Vb* (HEMMAT et al. 2003), *Vbj* (GYGAX et al. 2004), *Vr2* (PATOCCHI et al. 2004), *Vg* (CALENGE et al. 2004), *Vr* und *Vd* (TARTARINI et al. 2004), *Vh2* und *Vh4* (BUS et al. 2005), *Vm* (PATOCCHI et al. 2005). Der Großteil der schorffresistenten Apfelsorten trägt das *Vf*-Resistenzgen von *Malus floribunda* 821. Allerdings wurde diese *Vf*-Resistenz unter besonders starken Infektionsbedingungen in einigen Anbaugebieten vor allem in Nordeuropa bereits durchbrochen (PARISI et al. 1993, FISCHER 1998).

Neben dieser monogenen (vertikalen) Resistenz gibt es im Apfel auch polygen (horizontal) verankerte Resistenzen, die auf das Zusammenwirken einer Vielzahl von Genen beruhen. Im Gegensatz zur monogenen Resistenz ist die polygene Resistenz umweltabhängig und beispielsweise vom Ernährungsstatus einer Pflanze oder den klimatischen Bedingungen beeinflussbar. Die Resistenzausprägung ist damit variabel, aber es besteht ein geringeres Risiko der Resistenzdurchbrechung durch eine neue Pilzrasse. Vor allem neue Apfelzüchtungsprogramme sind darauf ausgelegt, mehrere funktional verschiedene so genannte *major resistance genes* zu kombinieren. Für die Detektion dieser Gene und für *quantitative trait loci* (QTL) sind bereits molekulare Marker und genetische Karten verfügbar (LIEBHARD et al. 2003, DUREL et al. 2003, CALENGE et al. 2004).

1.1.3 Abwehrmechanismen

Eine Abwehr von Apfelpflanzen gegenüber Pathogenen tritt nicht nur bei resistenten Sorten auf, sondern auch anfällige Sorten zeigen je nach Anfälligkeit und Befallsdruck gewisse Abwehrreaktionen. Pflanzen besitzen sowohl präformierte als auch induzierte Mechanismen, um sich gegen einen Pathogenbefall zu wehren. Ein Pathogen muss zunächst beispielsweise morphologische Barrieren überwinden, wie Wachse und Kutin, ehe es in der Pflanze Elicitoren freisetzen kann und so weitere Abwehrreaktionen der Pflanze induziert. Zu diesen Reaktionen zählen beispielsweise Zellwandverdickungen, die Produktion von Phytoalexinen oder die Synthese von *pathogenesis related proteins* (PR-Proteine). Darüber hinaus werden auch hypersensitive Reaktionen beobachtet, also eine schnelle Reaktion der Wirtspflanze, die zu lokalem Zelltod führt und oft mit so genannten *pinpoint* Nekrosen einhergeht (GOODMAN und NOVACKY 1994). Im Apfel beispielsweise ist das *Vm*-Resistenzgen für eine hypersensitive Reaktion verantwortlich und führt schon zwei Stunden nach einer Inokulation mit den *V. inaequalis*-Rassen 1-4 zu makroskopisch sichtbaren Nekrosen (HERNANDEZ CASTILLO 1990).

1.1.3.1 Phytoalexine

Die bereits 1940 von MÜLLER und BORGER erstmals erwähnten Phytoalexine (griechisch: *alekein* = abwehren) sind antimikrobielle Substanzen niedrigen Molekulargewichts und werden von Pflanzen nach einem Befall mit Mikroorganismen gebildet. Folgende strukturell sehr unterschiedliche Stoffgruppen zählen zu den Phytoalexinen: Flavonoide, Isoflavonoide, Stilbene, Cumarine, Isocumarine, Terpenoide, Furanoacetylene, Polyacetylene und Polyene (BELL 1981). Diese Substanzen stammen alle aus einem oder mehreren Primärstoffwechselwegen wie der Acetat-Malonat-, der Acetat-Mevalonat- und der Shikimat-Biosynthese. Viele experimentelle Ansätze befassen sich seit über 60 Jahren damit, ob Phytoalexine eine Rolle bei der Abwehr spielen oder ob sie lediglich in Folge eines Pathogenbefalls synthetisiert werden. Für eine Beteiligung an der Abwehr spricht beispielsweise, dass sie in der Lage sind, die Pathogenentwicklung zu hemmen, dass sie an der Infektionsstelle akkumulieren und dass eine Beziehung zwischen der Pathogenvirulenz und der Phytoalexin-Toleranz besteht (HAMMERSCHMIDT 1999). Verschiedene Phytoalexine treten oft nur in einigen wenigen Gattungen oder nah verwandten Arten auf und können so bei chemotaxonomischen Studien hilfreich sein (BELL 1981).

Flavonoide

In allen Gefäßpflanzen und auch in einigen Moosen gibt es Flavonoide, die mit derzeit etwa 6.500 bekannten Substanzen (WATZL und RECHKEMMER 2001) eine der größten und zugleich am intensivsten untersuchten Klassen von Naturstoffen darstellen (FORKMANN und HELLER 1999). Diese Flavonoide sind die wichtigsten Phytoalexine im Apfel. Es handelt sich dabei um ubiquitäre pflanzliche Sekundärstoffe, welche vielfältige Funktionen in Pflanzen besitzen. Sie sind beispielsweise essentiell bei der Pflanzenreproduktion, indem sie durch die Farbgebung Insekten und Vögel als Bestäuber und Samenverbreiter anlocken. In vielen Pflanzenarten sind sie darüber hinaus verantwortlich für die herbstliche Laubfärbung. Flavonoide wirken zudem toxisch gegenüber Mikroben, dienen der Pflanze als Fraßschutz und schützen bei verschiedenen Arten von Stress. So schützen sie die Pflanze beispielsweise, indem sie schädliche UV-Strahlung absorbieren. Flavonoide spielen auch eine Rolle beim Transport des Phytohormons Auxin, welches wiederum in die Stressantwort einer Pflanze involviert ist (FORKMANN und HELLER 1999, WINKEL-SHIRLEY 2002). Chemisch gesehen sind die Flavonoide den Phenolen zuzuordnen, da sie aus einem aromatischen Ringsystem bestehen (A-, B-, C-Ring), an dem sich mindestens eine Hydroxylgruppe oder deren Derivate befinden. Allen Flavonoiden gemeinsam ist ein C₁₅-Flavangerüst (Abbildung 3), welches aus zwei aromatischen C₆-Körpern und einem sauerstoffhaltigen Heterozyklus (Pyranring) besteht. Die Flavonoide lassen sich in einzelne Klassen unterteilen, die sich im Oxidationszustand des mittleren Pyranrings unterscheiden. Innerhalb der einzelnen Klassen

führen Hydroxylierungen, Methylierungen, Acylierungen und Glykolysierungen zu der beschriebenen Vielzahl an Verbindungen.

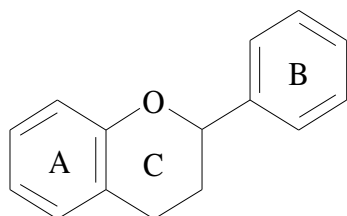


Abbildung 3 2-Phenyl-Chroman (= Flavan).

Eine immer größere Bedeutung erlangen die Flavonoide auch in der menschlichen Ernährung, da ihnen beispielsweise antioxidative, anticancerogene, antibakterielle und antivirale Effekte zugeschrieben werden (GRAF et al. 2005). Schätzungen zufolge stellen Tee, Zwiebel und Äpfel die Hauptquellen für Flavonoide in der Ernährung dar (BÖHM et al. 1998).

Da in der vorliegenden Arbeit sowohl die phenolischen Endprodukte als auch die Expression der entsprechenden Transkripte untersucht werden, ist ein Verständnis der Flavonoidbiosynthese (Abbildung 4) unerlässlich. Der Phenolstoffwechsel beginnt mit der aromatischen Aminosäure Phenylalanin, einem Endprodukt des Shikimatweges. In der Startreaktion wird Phenylalanin mittels des erstmals von KOUKOL und CONN (1961) charakterisierten Schlüsselenzyms Phenylalaninammoniumlyase (PAL) umgesetzt und zur *trans*-Zimtsäure desaminiert. Durch Hydroxylierung der Zimtsäure durch die Zimtsäure 4-Hydroxylase (C4H) entsteht *p*-Cumarsäure, durch weitere Hydroxylierung und Methylierung werden Kaffee-, Ferula- und Sinapinsäure gebildet. Unter ATP-Verbrauch und mittels der entsprechenden CoA-Ligasen können die Substanzen zu den jeweiligen CoA-Thioestern umgesetzt werden. Von diesen wiederum leiten sich beispielsweise Stilbene, Flavonoide, Tannine oder Lignin ab (FORKMANN und HELLER 1999).

Ein *p*-Hydroxyzimtsäure-CoA-Ester, meist *p*-Cumaroyl-CoA, wird schrittweise mit drei Molekülen Malonyl-CoA mittels der Chalkonsynthase (CHS) zum entsprechenden Chalkon kondensiert, was als Schlüsselreaktion innerhalb der Flavonoidbiosynthese angesehen wird (HELLER und FORKMANN 1994). Die Chalkone werden mittels der Chalkonisomerase (CHI) unmittelbar zu den Flavanonen umgesetzt, welche wiederum direkte Vorläufer der Flavonole und Flavanole sind. Die Flavonoid 3'-Hydroxylase (F3'H) fügt bei Flavanonen (Naringenin) eine zweite Hydroxylgruppe an Position 3' ein, wobei das 3'4'-hydroxylierte Derivat Eriodictyol entsteht. Hydroxylierung der Flavanone an Position 3 – katalysiert von der Flavanon 3-Hydroxylase (FHT) und 2-Oxoglutarat, Eisen-II-Ionen, Ascorbat und molekularem Sauerstoff als Cofaktoren – führt zu den Dihydroflavonolen. Aus diesen

entstehen durch Einfügen einer Doppelbindung zwischen dem C2- und dem C3-Atom des C-Rings Flavonole, wobei die Umsetzung mittels der Flavonolsynthase (FLS) und 2-Oxoglutarat sowie Eisen-II-Ionen als Cofaktoren erfolgt. Die Dihydroflavonol 4-Reduktase (DFR) mit dem Cofaktor NADPH reduziert die Ketogruppe am C4-Atom des Heterozyklus der Dihydroflavonole und es entstehen Flavan 3,4-diole, auch Leucoanthocyanidine genannt. Von hier aus erfolgt die Umsetzung zu den Anthocyanidinen durch die Anthocyanidinsynthase (ANS; FORKMANN und HELLER 1999). Im weiteren Verlauf werden die Anthocyanidine durch die Anthocyanidinreduktase (ANR) zu Epicatechin reduziert (XIE et al. 2004). Außerdem werden die Flavan 3,4-diole durch die Leucoanthocyanidin 4-Reduktase (LAR) zu Catechin umgesetzt. Catechin und Epicatechin wiederum stellen unmittelbare Vorstufen der Proanthocyanidine dar.

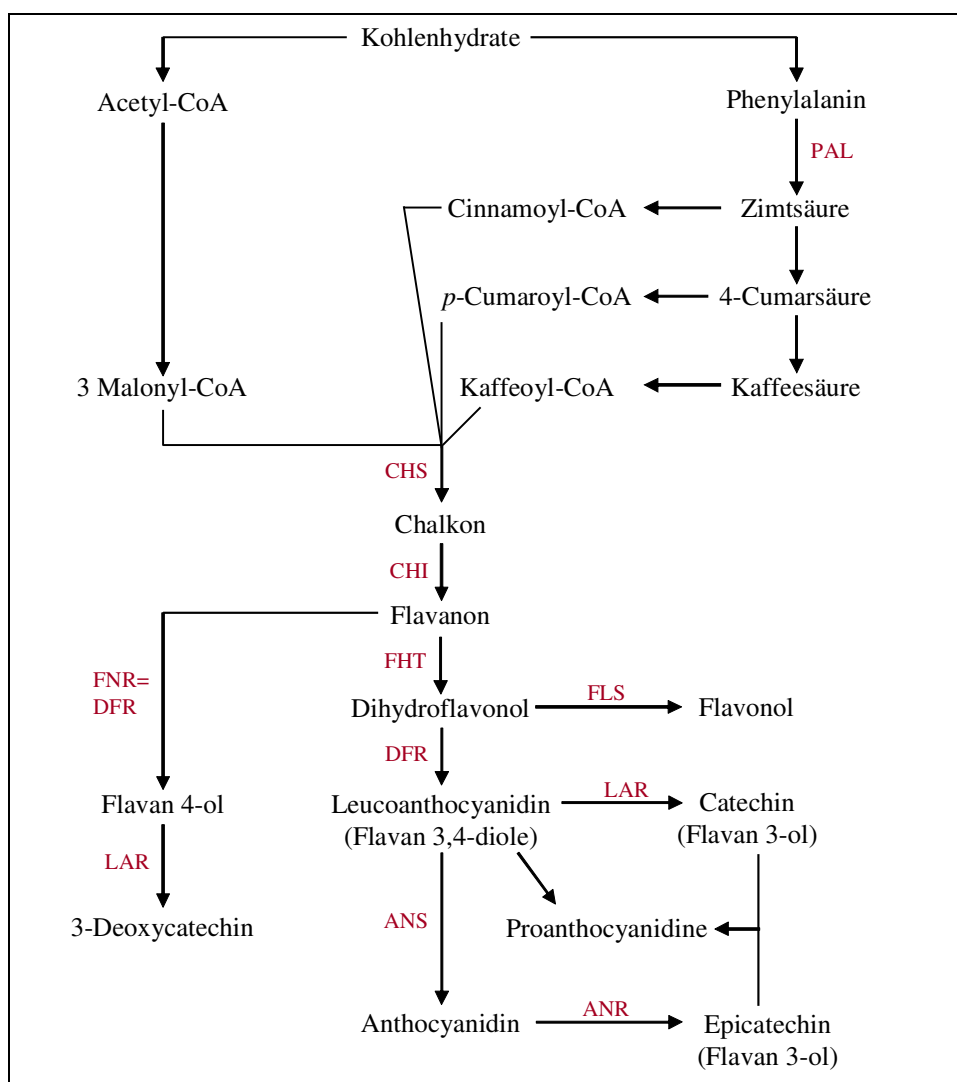


Abbildung 4 Biosynthese der phenolischen Verbindungen (verändert nach FORKMANN und HELLER 1999, TREUTTER 2001 und XIE et al. 2004).

In Apfelfrucht und -blatt nehmen die Dihydrochalkone eine besondere Stellung ein, insbesondere Phloridzin, das im Blatt in sehr hoher Konzentration vorliegt (MAYR et al. 1995). Die Synthese der Phloretinderivate war lange Zeit ungeklärt. Heute wird angenommen, dass die CHS die Bildung von Phloretin aus *p*-Dihydrocumaroyl und drei Molekülen Malonyl-CoA katalysiert. Eine Dihydrochalkon 2'-O-Glucosyltransferase katalysiert schließlich die Bildung von Phloridzin aus Phloretin und Uridindiphospho-Glucose (GOSCH et al. 2006). Nachdem lange Zeit das Auftreten von Phloridzin ausschließlich in der Gattung *Malus* bekannt war, wiesen HILT et al. (2003) die Substanz auch in der Erdbeere nach, so dass mittlerweile ein weiter verbreitetes Vorkommen von Phloridzin angenommen wird.

Präformierte Flavanole im Apfelblatt sind möglicherweise für eine effiziente Abwehr gegenüber *V. inaequalis* mitverantwortlich (TREUTTER und FEUCHT 1990, PICINELLI et al. 1995). Dies wird unter anderem dadurch bekräftigt, dass es um die Infektionsstelle zu einer Akkumulation von Flavanolen kommt (TREUTTER und FEUCHT 1990), dass die Flavanolkonzentration positiv mit der Feldresistenz korreliert (MAYR et al. 1997) und dass eine vorübergehende PAL-Inhibierung in einer resistenten Sorte zu einer starken Infektion führte (MAYR et al. 1997). Insgesamt scheint die Geschwindigkeit der Abwehrreaktion die Effizienz der Reaktion zu bestimmen. Bei der Abwehr von *V. inaequalis* sind insbesondere die Substanzen Epicatechin und Procyanidin E-B5 von Bedeutung.

1.1.3.2 PR-Proteine

PR-Proteine sind antimikrobielle Substanzen und werden in vielen Pflanzenarten nach einer Infektion mit Oomyceten, Pilzen, Bakterien, Viren oder nach einem Insektenbefall induziert (VAN LOON et al. 2006). Einige PR-Proteine werden auch während Seneszenz, Verwundung oder Kältestress induziert und viele liegen konstitutiv exprimiert in Blütengeweben, Pollen und Früchten vor, wo sie auch als Allergene wirken. Die meisten Vertreter aus den derzeit 17 Familien der PR-Proteine werden durch die Signalstoffe Salicylsäure, Jasmonsäure oder Ethylen induziert, während andere Phytohormone, beispielsweise Abszissinsäure, die Expression modulieren. PR-Proteine akkumulieren nicht nur lokal um das infizierte Gewebe, sondern werden auch systemisch induziert und tragen so zur *systemic acquired resistance* (SAR) gegen spätere Infektionen bei (VAN LOON und VAN STRIEN 1999). Studien der vergangenen Jahre zeigten, dass sowohl in kompatiblen als auch in inkompatiblen Wirt-Pathogen-Interaktionen Hunderte von Genen induziert und reprimiert werden, wobei der Unterschied zwischen Anfälligkeit und Resistenz oftmals im Zeitpunkt und im Ausmaß dieser Veränderungen begründet liegt (VAN LOON et al. 2006). Verschiedene PR-Familien sind bei der Abwehr pathogener Pilze von besonderem Interesse: Einige als Chitinasen (PR-3, PR-4, PR-8, PR-11) und β -1,3-Glukanasen identifizierte PR-Proteine hydrolysieren die in Pilzen vorkommenden Zellwandhauptbestandteile β -1,3-Glukan und Chitin. Durch den Zellwandabbau entstehen Oligosaccharide, welche als Elicitoren Abwehrmechanismen in der Pflanze

induzieren (BOLLER 1993). Des Weiteren sind Thaumatin-ähnliche PR-5 Proteine in der Lage, Pilzmembranen zu permeabilisieren (VAN LOON und VAN STRIEN 1999).

Es liegen bereits einige Studien zur Akkumulation von PR-Proteinen bzw. der entsprechenden Transkripte in Apfel vor. Besonders gut untersucht ist dabei das zu den PR-10 Proteinen zählende Mal d 1, das Hauptallergen im Apfel (VANEK-KREBITZ et al. 1995, PUEHRINGER et al. 2000, POUPARD et al. 2003, GAO et al. 2005, SANCHO et al. 2006). GAU et al. (2004) beobachteten die konstitutive Expression von Chitinasen, β -1,3-Glukanasen, Osmotin, PR-1 Protein und Thaumatin im Apoplasten der schorfresistenten Apfelsorte Remo. DEGENHARDT et al. (2005) stellten fest, dass Transkripte für PR-2, PR-3 und PR-10 Proteine nach einer *V. inaequalis*-Inokulation in Remo im Vergleich zur schorfanfälligen Sorte Elstar stark induziert waren. MAXSON-STEIN et al. (2002) behandelten Apfelsämlinge mit Acibenzolar-S-methyl (Handelspräparat: Bion), einem synthetischen Induktionsmittel für SAR, und stellten daraufhin eine zehnfache Induktion an PR-1 und PR-8 RNA fest sowie eine 100-fache Induktion an PR-2 RNA. In einigen weiteren Studien wurde eine Akkumulation von PR-Proteinen bzw. der entsprechenden Transkripte infolge eines Pathogenbefalls beobachtet, beispielsweise bei Apfel nach einer *Erwinia amylovora*-Infektion (VENISSE et al. 2002), bei Birne nach einer Infektion mit *Venturia nashicola* (FAIZE et al. 2004) oder bei Wein nach einem *Botrytis cinerea*-Befall (RENAULT et al. 2000).

1.2 Bedeutung von Stickstoff für den Metabolismus

In der vorliegenden Arbeit stand stets auch die Frage im Mittelpunkt, wie sich eine unterschiedliche Stickstoff (N)-Versorgung der Bäume auf das Baumwachstum einerseits und auf die Pathogenabwehr andererseits auswirkte. Insbesondere sollte durch verschiedene N-Düngegaben die Schorfanfälligkeit der Sorte Golden Delicious modifiziert werden.

Stickstoff ist einer der wichtigsten limitierenden Faktoren des Pflanzenwachstums. Verschiedene Hypothesen und Modelle der letzten Jahrzehnte befassen sich mit der Wechselwirkung zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel. MARGNA (1977) beschrieb in einem ersten Modell die Konkurrenz zwischen Phenol- und Proteinstoffwechsel um das Substrat Phenylalanin. Nach diesem Modell wird bei hoher N-Versorgung ein Großteil der Aminosäure in den Primärstoffwechsel eingebaut, was gleichzeitig zu einer reduzierten Akkumulation an Phenylpropanoiden führt. Dieser Ansatz wurde auch von JONES und HARTLEY (1999) in ihrem *protein competition model* wieder aufgenommen. Ein weiteres Modell zur Wechselwirkung zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel lieferten BRYANT et al. (1983) mit ihrer *carbon-nutrient balance hypothesis*, nach der Veränderungen im Sekundärstoffwechsel das Ergebnis von Ungleichgewichten zwischen Kohlenstoff- und Stickstoffbedarf für das Pflanzenwachstum sind.

RÜHMANN et al. (2002) stellten fest, dass N-induziertes starkes Sprosswachstum die Anfälligkeit von Apfelbäumen gegenüber *V. inaequalis* erhöht. Als mögliche Ursache führen sie den mit steigender N-Düngegabe reduzierten Gehalt phenolischer Inhaltsstoffe an. *In vitro* führten reduzierte Mengen an Makronährstoffen zu einem erhöhten Gehalt an phenolischen Inhaltsstoffen (LUX-ENDRICH et al. 2000). Auch LESER und TREUTTER (2005) erkannten bei hoher N-Versorgung einen strikten Zusammenhang zwischen erhöhtem Sprosswachstum und reduzierter Akkumulation phenolischer Inhaltsstoffe in Apfelblättern. Während die verringerten Phenolgehalte in der schorfanfälligen Sorte Golden Delicious zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber *V. inaequalis* führte, hatten sie in der resistenten Sorte Rewena keine Auswirkungen auf das Resistenzverhalten. BONGUE-BARTELSMAN und PHILLIPS (1995) konnten an Tomatenblättern nachweisen, dass die N-Versorgung auch auf die Enzyme sowie die entsprechenden Transkripte der Flavonoidbiosynthese Einfluss nimmt. FRITZ et al. (2006) stellten fest, dass eine N-Unterversorgung bei Tabak zu einer Stimulierung des Phenylpropanoidmetabolismus führt, wobei dies durch eine Induktion von frühen Enzymen innerhalb der Biosynthese geschieht.

1.3 Problemstellung und Zielsetzung

Diese Doktorarbeit wurde im Rahmen der Phase III des Sonderforschungsbereichs SFB 607 „Wachstum und Parasitenabwehr – Wettbewerb um Ressourcen in Nutzpflanzen aus Land- und Forstwirtschaft“ durchgeführt. Ziel des SFB 607 ist es, das Konfliktfeld des pflanzlichen Stoffwechsels zwischen dem Zwang zum Wachstum und dem Zwang zur Abwehr biotischen Stresses zu klären (MATYSSEK et al. 2005). Der SFB 607 basiert dabei auf der von HERMS und MATTSON (1992) vorgestellten *growth differentiation balance hypothesis* und damit auf der Annahme, dass eine gesteigerte Resistenz grundsätzlich mit reduziertem Wachstum einhergeht.

Mithilfe dieser Arbeit sollte ein besseres Verständnis für die Apfel-*V. inaequalis*-Interaktion entwickelt werden. Dazu wurde die Expression Pathogen-induzierter Gene im Apfelblatt während der Infektionsphase durch *V. inaequalis* analysiert. Dabei sollte die Frage geklärt werden, auf welchen Mechanismen die Resistenz der Sorte Rewena und die partielle Abwehr der Sorte Golden Delicious beruhen. Vor demselben Hintergrund wurde auch der Effekt unterschiedlicher Ressourcenverfügbarkeit untersucht und damit die vom SFB 607 postulierte Hypothese überprüft, ob reduziertes Wachstum zu gesteigerter Resistenz führt. Des Weiteren sollte geklärt werden, ob die Flavonoidbiosynthese auf Genebene reguliert wird. Die Beantwortung all dieser Fragen sollte dazu beitragen, Abwehr- und Resistenzmechanismen des Apfels gegenüber *V. inaequalis* besser zu verstehen und so beispielsweise neue Wege für die Züchtung schorffresistenter Sorten zu eröffnen oder zu einer Verbesserung von Pflanzenschutzmaßnahmen beizutragen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Kits und Oligonukleotide

Die Laborchemikalien (analytischer Reinheitsgrad) stammten hauptsächlich von den Firmen Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg), Merck KgaA (Darmstadt), Roche Diagnostics (Mannheim), Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe) und Sigma (Deisendorf). Die Herkunft der Kits wird im Text erwähnt. Die Blottingmembranen stammten von der Firma PALL GmbH (Dreieich). Sämtliche Oligonukleotide wurden von der Firma Thermo Fisher Scientific (Schwerte) synthetisiert.

2.1.2 Medien und Puffer

Für die Herstellung der Medien und Puffer wurde destilliertes, deionisiertes Wasser verwendet. Für Arbeiten mit RNA wurde dem Wasser vor dem Autoklavieren 0,1 % Diethylpyrocarbonat (DEPC) zugesetzt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die Sterilisation von Medien und Puffern erfolgte 20 Minuten bei 121 °C. Tabelle 1 listet die verwendeten Nährmedien, Lösungen und Puffer auf.

Tabelle 1 Verwendete Nährmedien, Lösungen und Puffer.

Name	Bestandteile	pH-Wert
Wasseragar	15 g/l Agar	
LB _{Amp} - Flüssigmedium	10 g/l Pepton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, 100 mg/l Ampicillin	7,0
PDB-Medium	20 g/l Glukose, 4 g/l Kartoffelextrakt	
Malzfestmedium	24 g/l Malzextrakt, 14 g/l Agar	
SOC-Medium	20 g/l Pepton, 5 g/l Hefeextrakt, 0,6 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1 g/l MgCl ₂ , 3,5 g/l D-Glukose	
10x Ladepuffer	10 mg Bromphenolblau, 5 ml 100 % Glycerin, 2 ml 50x TAE, 3 ml H ₂ O _{dd}	
100 bp ladder	Längenstandard (Invitrogen; Fragmente im Bereich von 100-2.072 bp)	
HyperLadder I	Längenstandard (Bioline; Fragmente im Bereich von 200-10.000 bp)	
Farbmix	50 mg/ml Bromphenolblau, 50 mg/ml Xylencyanol, 50 ml Formamid, 10mM EDTA	
FAD-Puffer	50 mg Dextranblau pro ml Formamid	
RNA-Ladepuffer	5 ml 20x MOPS-Puffer, 17,5 ml Formaldehyd, 50 ml Formamid, 10 ml Farbmix, 11mM EDTA, 25 mg EtBr	

Name	Bestandteile	pH-Wert
10x PCR-Puffer	400mM Tricin-KOH pH 9,2, 150mM KOAc, 35mM Mg(OAc) ₂ , 75 µg/ml Rinderserumalbumin (BSA)	
50x TBE	2M Tris, 2M Borsäure, 50mM EDTA	7,0
50x TAE	2M Tris, 2M Essigsäure, 50mM EDTA	7,0
TE	10mM Tris-HCl pH 7,5, 1mM EDTA	7,5
SSTE	1M NaCl, 5 g/l SDS, 10mM Tris-HCl pH 8,0, 1mM EDTA pH 8,0	
Extraktionspuffer	20 g/l CTAB, 20 g/l PVP 40, 100mM Tris-HCl pH 8,0, 25mM EDTA, 2M NaCl	
20x MOPS-Puffer	400mM MOPS, 100mM Natriumacetat, 20mM EDTA	7,0
Strip-Puffer*	200mM NaOH, 2 g/l SDS	
Church Puffer work	250mM Natriumphosphat pH 7,2, 70 µg/ml SDS, 1 mM EDTA, 10 µg/ml tRNA, 1 µg/ml oligo d(A) ₄₀₋₆₀	
20x SSC	3M NaCl, 300mM tri-Natriumcitrat Dihydrat	
Waschpuffer 1*	2x SCC, 1 g/l SDS	
Waschpuffer 2*	40mM NaPO ₄ , 1 g/l SDS	

* Puffer wurde nicht autoklaviert.

2.1.3 Pflanzenmaterial

Für die Experimente wurden die beiden Apfelsorten Golden Delicious und Rewena verwendet. Der Genotyp Golden Delicious, ein um 1890 in den USA gefundener Zufallssämling, besitzt weltweit größten Anbauumfang und Marktanteil. Etwa 30 % der gesamten EU-Apfelproduktionsmenge entfallen auf diese Sorte, wobei der Sortenanteil in Deutschland lediglich bei 6-8 % mit leicht abnehmender Tendenz liegt (<http://landwirtschaft-mlr.baden-wuerttemberg.de>). Golden Delicious ist stark schorfanfällig (MÜHL 2001), besitzt allerdings eine partielle Resistenz gegenüber der Pilzrasse 7, die durch das *Vg*-Gen vermittelt wird (BÉNAOUF und PARISI 1997). Die schorfresistente Sorte Rewena (FISCHER und FISCHER 1996) entstand als Klon der so genannten Re-Sorten am Institut für Obstzüchtung Dresden-Pillnitz aus der Kreuzung (Cox Orange x Oldenburg) x BX 44,14, ist seit 1991 im Handel und unterliegt seit 1994 dem Sortenschutz. Sie trägt das *Vf*-Resistenzgen aus *Malus x floribunda* Sieb. clone 821.

Die für die Experimente verwendeten jeweils dreijährigen Bäume waren auf der Unterlage M9 veredelt und standen auf der Versuchsfläche des Fachgebiets Obstbau der Technischen Universität München-Weihenstephan. Für das Experiment mit künstlicher *V. inaequalis*-Inokulation wurden von beiden Apfelsorten jeweils 63 Bäume in einem Folienhaus mit UV-durchlässiger Folie kultiviert. Die Pflanzen wuchsen in 18 l-Containern mit Torfsubstrat, wobei die Wasserversorgung über Tröpfchenbewässerung gewährleistet wurde. Die Bäume jeder Sorte wurden in drei Gruppen geteilt und jede der Gruppen wurde über zwei Vegetationsperioden hinweg mit unterschiedlicher N-Düngung pro Baum und Jahr versorgt: 3,6 g (N1), 8,2 g (N2) und 13 g (N3). Für die gleichzeitig stattfindende natürliche

V. inaequalis-Inokulation wurden von jeder Sorte und N-Stufe sieben Bäume im Freiland verwendet.

2.1.4 Bakterienstämme und Plasmide

Zur Klonierung von DNA-Molekülen wurde das Plasmid pBlueskript II SK (+) (Stratagene) verwendet. Die ligierte cDNA wurde in *Escherichia coli* NovaBlue competent cells (Novagen) transformiert. Das in den Hybridisierungen als *spiking control* verwendete Gen pMM14 aus *Gonyaulax polyedra* wurde in das Plasmid pTZ18R[®] (Pharmacia) eingefügt.

2.2 Methoden

2.2.1 *V. inaequalis*-Inokulation und Probenahme

Folienhaus

Für die künstliche *V. inaequalis*-Inokulation wurde ein natürlich vorkommendes Stammgemisch verwendet. Zu diesem Zweck wurden im Freiland Blätter mit stark sporulierenden Läsionen gesammelt. Von diesen Blättern wurden Schorfkonidien abgewaschen und so eine Konidiensuspension mit 5×10^5 Konidien/ml hergestellt. Elf Bäume jeder Sorte und N-Stufe wurden vollständig mit der Konidiensuspension besprüht und im Anschluss daran drei Tage über Kopf beregnet, um die für eine Infektion nötige Blattfeuchte zu gewährleisten. Die Kontrollpflanzen standen durch eine Plastikfolie getrennt im selben Folienhaus und wurden mit Wasser besprüht. Die Probenahme erfolgte unmittelbar vor der Inokulation, sowie 1, 2, 4, 8, 14 und 25 Tage nach der Inokulation (dpi). Jede Probe war eine Mischprobe aus zehn bis elf Blättern. Die Blätter wurden zusätzlich nach ihrem Alter sortiert: Blatt 1 war das jüngste, voll entfaltete Blatt am Tag der Inokulation, Blatt 2 das nächst ältere Blatt etc. Für die statistischen Berechnungen wurde pauschal von einer Blattneubildung in zwei Tagen ausgegangen. Blätter, die am Tag der Probenahme maximal acht Tage alt waren, werden als „jung“ bezeichnet, Blätter, die mindestens neun Tage alt waren, als „alt“. Die Golden Delicious-Proben des Termins 25 dpi wurden außerdem nach ihrem geschätzten infizierten Blattflächenanteil sortiert (10 und 20 % infizierte Blattfläche: schwache Infektion; 40, 60 und 80 % infizierte Blattfläche: starke Infektion). Falls im Ergebnisteil keine weiteren Angaben gemacht werden, wurden in den Expressionsstudien diejenigen Proben mit dem größten infizierten Blattflächenanteil verwendet.

Freiland

Die Probenahme im Freiland wurde auf dieselbe Weise durchgeführt und fand an sechs Terminen zwischen 1.06. und 8.06.2004 statt (Tag 1, 2, 3, 4, 7 und 8), also zu einem Zeitpunkt, an dem an älteren Blättern der schorfanfälligen Sorte Golden Delicious bereits erste Schorfsymptome zu erkennen waren. Kurz darauf zeigten die an den Bäumen verbliebenen Blätter einen totalen Schorfbefall, so dass davon ausgegangen werden kann, dass zum Zeitpunkt der Probenahme bereits eine 100 %-ige Infektion vorlag. Wie im Folienhaus wurde pauschal von einer Blattneubildung in zwei Tagen ausgegangen. Alle Blätter, die am Tag der Probenahme maximal sieben Tage alt waren, wurden als „jung“ bezeichnet, alle älteren Blätter als „alt“.

Alle Proben wurden sofort in Flüssigstickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C für die Genexpressionsanalysen bzw. bei -20 °C für die Phenolanalysen gelagert.

2.2.2 *V. inaequalis*-Bonitur

21 Tage nach Inokulation fand eine Blattbonitur der künstlich mit *V. inaequalis* inokulierten Apfelbäume statt. Dazu wurde für Blätter jedes Blattstadiums die Befallsstärke in Prozent geschätzt. Der Befallsindex wurde nach folgender Formel berechnet, wobei die geschätzte Klassenprozentzahl 0, 10, 20, 40, 60 oder 80 % betrug:

$$\text{Befallsindex} = \frac{(\text{Anzahl Blätter pro Klasse} * \text{Klassenprozentzahl}) * 100}{\text{maximaler Befall pro Etage}}$$

2.2.3 RNA-Extraktion

Die Extraktion von Gesamt-RNA aus *V. inaequalis* erfolgte mittels der TRIzol[®] Reagent Methode (Invitrogen), während die Isolierung von Gesamt-RNA aus Apfelblättern aufgrund der hohen Phenolgehalte nach CHANG et al. (1993) durchgeführt werden musste.

2.2.3.1 Extraktion von Gesamt-RNA aus *V. inaequalis*

Für die RNA-Extraktion aus dem Pathogen wurden auf Malzfestmedium wachsende *V. inaequalis*-Kulturen in PDB-Flüssigmedium überführt und zwei Wochen im Dunkeln und bei Raumtemperatur kultiviert. Zunächst wurden die bei -80 °C gelagerten Blattproben bzw. das *V. inaequalis*-Myzel unter flüssigem Stickstoff homogenisiert. Die dafür benötigten Mörser, Pistille und anderen Arbeitsutensilien wurden zur Deaktivierung von RNasen im Vorfeld 4 Stunden bei 180 °C gebacken. Etwa 100 mg des gemörserten *V. inaequalis*-

Materials wurden in 1 ml TRIzol[®] (Invitrogen) homogenisiert. Durch eine zehnmünütige Zentrifugation bei 13.000 g und 4 °C wurden die Zellbestandteile abgetrennt. Einer fünfminütigen Inkubation bei Raumtemperatur und Zugabe von 200 µl Chloroform folgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 13.000 g und 4 °C. Die dabei gebildete obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl Isopropanol versetzt. Nach zehnmünütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte eine weitere zehnmünütige Zentrifugation bei 13.000 g und 4 °C. Der Überstand wurde entfernt und die ausgefallene RNA in 50 µl DEPC-Wasser resuspendiert. Anschließend wurden 5 µl 3M NaAc pH 5,2 und 125 µl 100 % EtOH hinzugefügt und das Gemisch 60 Minuten bei -20 °C inkubiert. Nach 20-minütiger Zentrifugation bei 13.000 g und 4 °C wurde der Überstand entfernt und das Pellet in 50 µl DEPC-Wasser resuspendiert. Eine abschließende LiCl-Fällung trennte DNA-Fragmente ab. Dazu fand nach Zugabe von 1/3 Volumen LiCl eine Inkubation bei 4 °C über Nacht und eine 20-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 12.000 g statt. Die Gesamt-RNA wurde in 50 µl DEPC-Wasser aufgenommen und bei -80 °C gelagert.

2.2.3.2 Extraktion von Gesamt-RNA aus Apfelblättern

Für die RNA-Extraktion aus Apfelblättern wurden 260 µl β-Mercaptoethanol und 7,2 µl Spermidin zu jeweils 13 ml auf 65 °C erwärmten Extraktionspuffer gegeben. Etwa 2 g des gemörserten Blattmaterials wurden im Extraktionspuffer homogenisiert. Durch Zugabe von 13 ml Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) und zehnmünütige Zentrifugation bei 12.000 g und Raumtemperatur trat eine Phasentrennung ein. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Aufreinigung mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) wiederholt. Im Anschluss daran fand eine LiCl-Fällung (vgl. 2.2.3.1) statt. Das Pellet wurde in 500 µl SSTE-Puffer aufgenommen. Zur nochmaligen RNA-Extraktion wurde eine Phasentrennung mit 500 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) durchgeführt und die obere Phase wurde in eine verkürzte EtOH-Fällung eingesetzt. Dazu wurde die Lösung mit zwei Volumenanteilen EtOH versetzt und 2 h bei -20 °C inkubiert. Nach 20-minütiger Zentrifugation bei 12.000 g und 4 °C wurde die Gesamt-RNA in 50 µl DEPC-Wasser aufgenommen und bei -80 °C gelagert.

2.2.3.3 Konzentrationsbestimmung der Gesamt-RNA

Zur spektroskopischen Ermittlung der RNA-Konzentration wurde die optische Dichte bei 260 nm (OD_{260}) einer 1:100 Verdünnung der Lösung ermittelt. Nach FREIFELDER (1982) entspricht ein OD_{260} von 1 ungefähr 40 µg/µl RNA. Die Reinheit der RNA wurde anhand des Spektrums sowie über das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} ermittelt, wobei ein Wert um 2 angestrebt wurde.

2.2.3.4 Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von RNA

Die Qualität der RNA wurde zusätzlich mittels denaturierender Agarosegele überprüft. Dazu wurden 500 ng RNA mit 8 µl RNA-Ladepuffer versetzt, 10 Minuten bei 65 °C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Die RNA-Trennung erfolgte in 1,2 %-igen Agarosegelen in 1x MOPS-Puffer mit 18 % Formaldehyd zur Denaturierung. Die Detektion der RNA erfolgte unter UV-Licht.

2.2.4 Plasmid-DNA-Extraktion aus Bakterien

10 µl der bei -80 °C gelagerten Dauerkultur wurden zu 3 ml LB_{Amp}-Flüssigmedium gegeben und als Vorkultur über Nacht bei 37 °C und 300 rpm kultiviert. Von dieser Vorkultur wurden 50 µl zu 25 ml LB_{Amp}-Flüssigmedium gegeben und als Hauptkultur wiederum über Nacht bei 37 °C und 300 rpm kultiviert. Anschließend trennte eine achtminütige Zentrifugation bei 3.000 g und 4 °C die *E. coli* Zellen vom Medium ab. Das so entstandene Pellet wurde in den QIAGEN Plasmid Maxi Kit (Qiagen) eingesetzt. Das Pellet wurde in 10 ml P1-Puffer resuspendiert, mit 10 ml P2-Puffer versetzt, 4-6-mal invertiert und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Lösung mit 10 ml gekühltem P3-Puffer versetzt, 4-6-mal invertiert und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einer 30-minütigen Zentrifugation bei 12.000 g und 4 °C wurde der DNA enthaltende Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und erneut 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine mit 15 ml QBT equilibrierte Säule aufgetragen, mit 2-mal 10 ml QC-Puffer gewaschen und mit 15 ml QF-Puffer eluiert. Das Eluat wurde mit 10,5 ml 100 % Isopropanol versetzt und 15 Minuten bei 12.000 g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 5 ml 70 % EtOH versetzt und erneut zentrifugiert. Das so entstandene Pellet wurde in 400 ml H₂O_{dd} aufgenommen. Die DNA-Konzentration wurde ermittelt wie für die RNA unter 2.2.3.3 beschrieben, wobei der gemessene Wert *5 der DNA-Konzentration pro µl entspricht. Anschließend erfolgte eine Gelelektrophorese der DNA-Fragmente.

2.2.5 Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von DNA

Negativ geladene Nukleinsäuren können nach Erzeugung eines elektrischen Feldes in horizontalen Agarosegelen in 1x TAE-Puffer größenabhängig aufgetrennt werden. Für kleine DNA-Fragmente von etwa 100-500 bp wurden 2 %-ige Agarosegele, für größere Fragmente 1 %-ige Gele verwendet. Als Größenstandards wurden die 100 bp ladder (Invitrogen) und die HyperLadder I (Bioline) verwendet. 0,5 µg EtBr pro ml Gellösung färbten die DNA an und ermöglichten eine Dokumentation im UV-Transilluminator.

2.2.6 Differentielle cDNA-Banken

Die Firma vertis Biotechnologie AG erstellte vier differentielle cDNA-Banken (Tabelle 2) nach der bei ROS et al. (2004) vorgestellten Methode. Die Genbank „WILD 2004“ stammte dabei von Versuchen, die im Rahmen einer Diplomarbeit durchgeführt wurden. Jeweils 2 µg Gesamt-RNA aus Apfelblättern wurden als „Tester“ und „Driver“ eingesetzt. Zum Driver wurden zusätzlich 30 ng *V. inaequalis* Gesamt-RNA zugegeben, um das Auftreten *V. inaequalis*-spezifischer Klone in den Banken zu reduzieren. Die cDNA-Synthese wurde mittels M-MLV-RNase H- Reverse Transkriptase (MBI Fermentas) durchgeführt. Dabei wurden verschiedene oligo(dT)-Linker-Primer zur Erstellung der Tester- und der Driver-cDNA verwendet. Der zur cDNA-Synthese des Testers eingesetzte Linker-Primer beinhaltete zusätzlich eine *NotI*-Schnittstelle. Die Doppelstrangsynthese der Tester- und Driver-cDNA erfolgte mittels Klenow DNA-Polymerase unter Verwendung verschiedener *random*-Adapterprimer. Die cDNA wurde in einer *long and accurate* PCR (LA PCR) nach BARNES (1994) amplifiziert. In einem Subtraktionsschritt wurde einzelsträngige ss-cDNA aus der Tester- und Driver-cDNA präpariert. Die ss-cDNA des Testers wurde anschließend mit einem 10-fachen Überschuss der ss-cDNA des Drivers hybridisiert. Die reassozierte, doppelsträngige Tester/Driver ds-cDNA wurde von der verbleibenden ss-cDNA des Testers mittels Hydroxylapatitsäulchen abgetrennt. Anschließend erfolgte die Amplifikation der subtraktiven ss-cDNA in einer weiteren LA-PCR unter Verwendung von Tester-spezifischen Primern. In einer zweiten subtraktiven Hybridisierung, in der S1-cDNA als Tester eingesetzt wurde, wurde die S2-cDNA gewonnen.

Die Genbanken wurden über eine Restriktion mittels *EcoRI* und *BamHI* in das Plasmid pBlueskript II SK (+) (Stratagene) ligiert.

Tabelle 2 Differentielle cDNA-Banken.

	Genbank „WILD 2004“	Genbank „Golden Delicious“	Genbank „Rewena früh“	Genbank „Rewena ontogenetisch“
Tester	Re + GD, inokulierte Blätter, 21 dpi	GD, inokulierte Blätter, 25 dpi	Re, inokulierte Blätter, 1+2 dpi	Re, nicht inokulierte Blätter, 25 dpi
Driver	GD, nicht inokulierte Blätter*, 21 dpi	GD, nicht inokulierte Blätter*, 0 dpi	Re, nicht inokulierte Blätter*, 0 dpi	Re, nicht inokulierte Blätter, 0 dpi

* plus 30 ng *V. inaequalis* Gesamt-RNA.

2.2.7 Transformation und Kultivierung von Bakterien

Die zu transformierenden Bakterien wurden zu kompetenten *E. coli*-Bakterien gegeben und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Ein Hitzeschock bei 42 °C für 30 Sekunden löste die Transformation aus. Nach einer fünfminütigen Inkubation auf Eis wurden 250 µl handwarmen SOC-Mediums zugegeben und schließlich wurden die Kulturen 60 Minuten bei 225 rpm und 37 °C geschüttelt. Aliquots von 30 µl wurden auf LB_{Amp}-Festmedium ausplattiert und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Anschließend wurden die Bakterienkolonien vereinzelt, in LB_{Amp}-Flüssigmedium gegeben und wiederum über Nacht bei 37 °C und 350 rpm kultiviert. Für Dauerkulturen wurden die Flüssigkulturen am folgenden Tag mit Glycerin versetzt (Endkonzentration 25 %) und bei -80 °C gelagert.

2.2.8 Polymerasekettenreaktion (PCR)

2.2.8.1 Standard-PCR und Aufreinigung von PCR-Produkten

Ein Standardreaktionsansatz enthielt 3 µl Puffer, 27 µl H₂O_{dd}, 0,17µM des jeweiligen 5' und 3' Primers, 0,08mM dNTPs, 0,125 U *home made Taq-Polymerase* (PLUTHERO 1993) sowie 1-2 µl einer Bakterienflüssig-, Bakteriendauerkultur oder eines PCR-Produkts. Die Amplifikation erfolgte in einem Perkin-Elmer GeneAmp PCR System 9600 Thermocycler nach dem Schema: Denaturierung 95 °C 2 Minuten, 35 Zyklen: Denaturierung 95 °C 15 Sekunden, Annealing 55 °C 30 Sekunden, Extension 72 °C 2 Minuten.

Zur Überprüfung wurden die PCR-Produkte mit 10x Ladepuffer versetzt und auf ein 1 %-iges Agarosegel in 1x TAE aufgetragen (siehe 2.2.5).

PCR-Produkte von jeweils acht Ansätzen einer Standard-PCR wurden mittels MultiScreen[®]-PCR Plates (Millipore) aufgereinigt, so dass alle Reste an Primern, dNTPs und Taq-Polymerase entfernt wurden. Nach der Aufreinigung wurde jedes PCR-Produkt in 50 µl DEPC-Wasser aufgenommen, so dass die cDNA eine Endkonzentration von circa 0,4 µg/µl aufwies.

2.2.8.2 Real-time quantitative reverse Transkription PCR (qRT-PCR)

Das Prinzip der qRT-PCR beruht auf der Markierung der DNA mit einem Fluoreszenzfarbstoff. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR[®] Green interkaliert unspezifisch in Doppelstrang-DNA. Mit fortschreitender PCR-Reaktion führt dies zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignals. Dabei wird für jedes amplifizierte Gen ein Ct-Wert (*threshold cycle*) ermittelt, der diejenige Zykluszahl angibt, bei der das gemessene Fluoreszenzsignal die basale Fluoreszenz („Hintergrund“) überschreitet.

qRT-PCR-Analysen wurden zur Erfassung der Expression von Flavonoidgenen sowie zur Detektion von *V. inaequalis* cDNA in Apfelblättern verwendet. Klone und Sequenzen der Flavonoidgene wurden von FISCHER et al. (2006) zur Verfügung gestellt. Für die genspezifische qRT-PCR wurden 250 ng gereinigter Gesamt-RNA in den one-tube QuantiTect SYBR[®] Green RT-PCR Kit (Qiagen) eingesetzt. Die qRT-PCR erfolgte in einem automatisierten ABI Prism 7700 sequence detector (PE Applied Biosystems), wobei Reaktionsansätze von 25 µl in jeweils drei Wiederholungen folgendes Schema durchliefen: Reverse Transkription 50 °C 30 Minuten, Aktivierung der Polymerase 95 °C 15 Minuten, 35 Zyklen: Denaturierung 95 °C 15 Sekunden, Annealing T_a 30 Sekunden und Extension 72 °C 30 Sekunden. Tabelle 22 listet die Annealingtemperatur T_a für jedes Primerpaar auf. Das Fluoreszenzsignal wurde nach der Extension bei 72 °C aufgezeichnet. Die Primer wurden mit der Software Primer Premier 5.0 entworfen.

Relative Quantifizierung mittels qRT-PCR

Für die relative Quantifizierung von qRT-PCR-Analysen bedarf es einer Normalisierung der Daten mittels geeigneter Referenzgene. In dieser Arbeit wurden sechs verschiedene typische *housekeeping*-Gene getestet: Elongation factor 1 α subunit, β -Actin, Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (GAPDH), RNA Polymerase II, Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/-oxygenase (Rubisco) und 18S ribosomale RNA (Tabelle 22). Zunächst wurden nach folgender Formel relative Quantitäten (RQ) sowohl für die Referenz- als auch für die Zielgene berechnet, wobei von optimalen Amplifikationsbedingungen (Verdopplung der Produktmenge bei jedem PCR-Zyklus) ausgegangen wurde:

$$RQ = 2^{\Delta Ct} = 2^{(Ct_{min} - Ct_{Probe})}$$

(Ct min = niedrigster Ct-Wert = Ct-Wert der Probe mit der stärksten Expression)

Mithilfe der Software geNorm[™] (VANDESOMPELE et al. 2002) wurden anhand dieser relativen Quantitäten die stabilsten Referenzgene ausgewählt und Normalisierungsfaktoren für jede Probe berechnet, die auf dem geometrischen Mittel der relativen Quantitäten der verwendeten Referenzgene basieren. Im nächsten Schritt wurden die relativen Quantitäten der Zielgene mit dem jeweiligen Faktor normalisiert.

Im Falle der Verwendung lediglich des Elongation factors 1 α als Referenzgen (5.1.3 und 7.1.1.4) wurde die relative Genexpression nach der Delta-delta Methode (PE Applied Biosystems) berechnet.

Absolute Quantifizierung mittels qRT-PCR

Für die Quantifizierung der *V. inaequalis* cDNA in Apfelblättern wurde die Standardkurven-Methode angewendet. Eine absolute Quantifizierung wurde mittels folgender Formel berechnet, wobei m die Steigung darstellt:

$$\text{Genexpression} = \frac{10^{(\text{Ct } y\text{-Achsenabschnitt})}}{m}$$

Frisch präparierte RNA-Verdünnungen des *in vitro* gewachsenen Pathogens wurden dafür als Standard-Templates eingesetzt.

Durch die anschließende Analyse von Schmelzkurven sowie eine zusätzlich durchgeführte Gelelektrophorese der PCR-Produkte wurde sicher gestellt, dass das Fluoreszenzsignal jeweils ein Ergebnis der Produkt-Amplifikation und nicht von Primerdimeren ist.

2.2.8.3 Sequenzier-PCR

Für die Sequenzierungsreaktionen wurde der ABI Prism[®] BIG DYE Terminator Cycle Sequencing Ready Reaktion Kit version 1.1 (PE Applied Biosystems) verwendet. 5 ng der aufgereinigten PCR-Produkte wurden mit 2 µl Premix und 250mM T7-Primer (Tabelle 1) gemischt. Die Amplifikation erfolgte in einem Perkin-Elmer GeneAMP PCR System 9600 Thermocycler, wobei 30 Zyklen nach folgendem Schema durchlaufen wurden: Denaturierung 96 °C 10 Sekunden, Annealing 60 °C 5 Sekunden, Extension 60 °C 4 Minuten.

2.2.9 DNA-Sequenzierung

Die Produkte der Sequenzier-PCR (siehe 2.2.8.3) wurden mit Isopropanol gefällt und in 2 µl FAD-Puffer aufgenommen. Die Proben wurden 2 Minuten bei 95 °C denaturiert und auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel (6M Harnstoff, 1x TBE, 5 % Long Ranger Gel Solution der Firma Cambrex) aufgetragen. Pro 25 ml Sequenziergellösung wurden 24,5 µl Temed (Amresco) und 175 µl 10 %-iges Ammoniumpersulfat zur Aktivierung der Polymerisation eingesetzt. Die DNA-Sequenzierung erfolgte schließlich in einem ABI Prism[®] 377 DNA Sequencer (Perkin-Elmer). Die Sequenzdaten wurden mit der Sequencing Analysis Software version 3.2 ABI PRISM[®] (Perkin-Elmer) ausgewertet. Sequenzhomologien wurden auf Nukleotid- und Proteinlevel unter Verwendung der Programme blastn und blastx (<http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>, ALTSCHUL et al. 1990) getestet, die vom National Center for Biotechnology Information (NCBI) zur Verfügung gestellt werden. Erwartungswerte (E-Werte; Abschätzung der erwarteten Anzahl Falsch-Positiver) größer als E-10 wurden dabei

als statistisch nicht signifikant angesehen. Zusätzlich wurden Alignmentstudien unter Verwendung der Funktion LALIGN der SDSC Biology WorkBench 3.2 software durchgeführt. Klone, die dabei Homologien $\geq 80\%$ auf Nukleotidebene aufwiesen, wurden als identische Klone gehandhabt. Die Sequenzdaten sind verfügbar in der GenBank unter den Akzessionsnummern EB710083 - EB710161 („Makroarray 2004“) und EG025807 - EG025983 („Makroarray 2005“).

2.2.10 *In vitro* RNA-Synthese

Um die Hybridisierungssignale auf den Makroarrays zu normalisieren, ist ein Kontrollgen notwendig, das mit einer definierten Menge an RNA hybridisiert. Als so genannte *spiking control* wurde das von Frau Dr. M. Mittag (Universität Jena) zur Verfügung gestellte pMM14 verwendet, das aus der nicht translatierten 3'-Region eines Luciferinbindeproteins des Dinoflagellaten *Gonyaulax polyedra* stammt. Die pMM14 RNA wurde mittels *in vitro* RNA-Synthese gewonnen.

Die zu transkribierende pMM14-DNA wurde von MITTAG et al. (1994) in die Polylinkerregion des pTZ18R Vektors (Pharmacia) kloniert. Für die Synthese wurde das Plasmid zunächst mit einem Restriktionsenzym linearisiert. Dazu wurden 2 μg Plasmid-DNA mit 4 μl 10x Puffer H (Boehringer Ingelheim Pharma), 24 U *Xba*I und 31,3 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ gemischt und 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Zur visuellen Kontrolle wurden 50 ng des linearisierten Plasmids auf ein Agarosegel (siehe 2.2.8.1) aufgetragen. Unter Verwendung des QIAquick Nucleotide Removal Kits (Qiagen) wurden Restriktionspuffer und -enzym entfernt. Dazu wurde dem Reaktionsansatz ein fünffaches Volumen an PB-Puffer zugegeben und das Gemisch auf ein QIAquick Säulchen überführt. Nach einminütiger Zentrifugation bei 10.000 g wurde der Reaktionsansatz mit 750 μl PE-Puffer versetzt und erneut zentrifugiert. Die DNA wurde schließlich in 50 μl DEPC-Wasser aufgenommen. Aus 100 ng des gereinigten, linearisierten Plasmids konnten nach Befolgen der Herstellerangaben der T7-Polymerase (MBI Fermentas) in einer *in vitro* RNA-Synthese über den T7-Promotor maximal 1 μg RNA transkribiert werden. Dazu wurde das Plasmid mit 10 μl 5x Transcription Buffer, 10 μl 10mM rNTPs, 30 U T7 RNA Polymerase und 40 U Ribonuclease Inhibitor mit DEPC-Wasser in einem Endvolumen von 50 μl für 1-2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die im Reaktionsgefäß verbliebene DNA wurde enzymatisch bei 37 °C für 15 Minuten mittels 50 U DNase I (Peqlab) entfernt. Die RNA wurde anschließend mithilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen) aufgereinigt, wobei zunächst mit DEPC-Wasser ein Endvolumen von 100 μl eingestellt wurde. Nach Zugabe von 350 μl RLT-Puffer wurde der Reaktionsansatz mit 250 μl 100 %-igem EtOH versetzt und auf ein RNeasy Minisäulchen überführt. In mehreren 15-sekündigen Zentrifugationsschritten bei 8.000 g wurde der Reaktionsansatz in 500 μl RPE-Puffer gewaschen. Die RNA wurde in 30-50 μl DEPC-Wasser aufgenommen.

2.2.11 Hybridisierung

2.2.11.1 Erstellung von Makroarrays

„Makroarray 2004“

80 ausgewählte Unigene der bereits zu Beginn der Arbeit bestehenden Genbank „WILD 2004“ wurden in Duplikaten mittels eines 96 Solid Pin Multi-Blot Replicators (V&P Scientific) auf positiv geladene Nylonfilter (Pall Biodyne B, Nunc) gespottet. Zusätzlich wurden 16 *spiking controls* auf jeden Filter gespottet. Zur Denaturierung der PCR-Produkte wurden die Filter 15 Minuten bei 65 °C in Strip-Puffer gewaschen und anschließend weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur in 30mM Tris (pH 7,5) neutralisiert.

„Makroarray 2005“

178 ausgewählte Unigene der Genbanken „Golden Delicious“, „Rewena früh“ und „Rewena ontogenetisch“ sowie sieben zusätzliche Flavonoidklone (FISCHER et al. 2006) wurden neben 16 *spiking controls* auf jede Nylonmembran aufgetragen. Die Denaturierung und Neutralisierung erfolgte wie oben beschrieben.

2.2.11.2 Hybridisierungssonden

In einem Volumen von 13 µl wurden 7,5 µg Gesamt-RNA (siehe 2.2.3) mit 40 pg pMM14-RNA (siehe 2.2.10) und 2 µg (dT)12-18 Primer (Roche) gemischt und 2 Minuten bei 72 °C denaturiert. Die Reverse Transkription erfolgte in einem Endvolumen von 25 µl unter Zugabe von REVERTAID M-MuLV reverse transcriptase (MBI Fermentas), 0,33mM dATP, dGTP und dTTP, 3,3µM dCTP und 20 µCi α -[³²P]dCTP (3.000 Ci/mmol, Hartmann Analytics) bei 42 °C in einem Thermocycler. Nach 1 Stunde wurde die RNA mithilfe von 150mM NaOH und 10mM EDTA bei 65 °C für 30 Minuten hydrolysiert. Um nicht eingebaute Nukleotide abzutrennen, wurde der Reaktionsmix über SEPHADEX G-50 Säulchen (Amersham Biosciences) filtriert. Die Gensonden wurden in 400 µl 1x TE aufgenommen und der Einbau von α -[³²P]dCTP wurde mittels Szintillationszählung (Bioscan/QC-4000 XER, Bioscan Inc.) bestimmt. Circa 3 Mio dpm der radioaktiv markierten Proben wurden ad 1 ml mit Church Puffer work (CHURCH and GILBERT 1984) versetzt und 5 Minuten bei 95 °C denaturiert.

2.2.11.3 Hybridisierungsbedingungen

Im Hybridisierungssofen wurden die Membranen 2 Stunden bei 65 °C in 3,5 ml Church Puffer work vorhybridisiert. Anschließend wurde der Puffer entfernt und die in 1 ml aufgenommene, denaturierte Hybridisierungssonde (siehe 2.2.11.2) zugefügt. Die Hybridisierung erfolgte über

Nacht bei 65 °C. Nach Entfernen der Hybridisierungslösung wurden die Filter jeweils zweimal 20 Minuten in Waschpuffer 1 und in Waschpuffer 2 bei 65 °C im Hybridisierungs-Ofen gewaschen. Anschließend wurden die Filter bei Raumtemperatur auf einem Phospho-Screen (Kodak) exponiert und nach 24 Stunden am PhosphoImager Storm II (Molecular Dynamics) bei einer Auflösung von 50 µm eingescannt.

2.2.11.4 Computergestützte Auswertung von Autoradiogrammen

Die Bilddaten wurden mit der Evaluierungssoftware Array Vision 8.0 (Imaging Research) ausgewertet. Nach Definition von Einzelspots und Detektion der zugehörigen Signalstärken erfolgte ein automatischer Normalisierungsabgleich, indem die Signale der Einzelspots durch die gemittelten Signale der *spiking control* pMM14 (siehe 2.2.11.1) dividiert wurden. Die Signalintensität eines Spots gilt als Maß für die Konzentration des entsprechenden Transkripts. Für die Genexpressionsanalysen wurden normalisierte Signalintensitäten (nVol) aus mindestens zwei unabhängigen Hybridisierungsexperimenten berücksichtigt. Für jeden Datenpunkt lagen somit mindestens vier Einzelwerte vor, deren Mittelwert den Expressionsendwert bildete. Im Falle einer Berechnung von Geninduktionen infolge der *V. inaequalis*-Inokulation (5.1.2) wurden die nVol der inokulierten Pflanze durch die nVol der entsprechenden nicht inokulierten Pflanze dividiert.

2.2.12 HPLC-Analysen

Trennung und Quantifizierung der Polyphenole wurde mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) durchgeführt. Dazu wurden 100 mg gemörserten und gefriergetrockneten Blattmaterials in Methanol und 6-Methoxy-Flavon als internem Standard aufgenommen. Die phenolischen Inhaltsstoffe wurden in einem eisgekühlten Ultraschallbad 30 Minuten extrahiert. Zellbestandteile wurden durch 10-minütige Zentrifugation entfernt, der Überstand in neue Reaktionsgefäße überführt und in einem Vakuumrotationsverdampfer eingengt. Der Trockenextrakt wurde in 100 µl Methanol zurückgelöst und direkt in die HPLC-Analysen eingesetzt.

Eine selektive Detektion der chromatographisch nicht von den Hydroxyzimtsäurederivaten trennbaren Flavane wurde durch eine Nachsäulenderivatisierung mit p-Dimethylaminozimtaldehyd (DMAZA) bei 640 nm erreicht (TREUTTER 1989).

HPLC-Anlage mit Nachsäulenderivatisierung (HPLC-CRD)

Probengeber:	Gilson-Abimed Modell 231
Pumpen:	Kontron Modell 422 Dionex GP40 Gradient Pump – DMAZA Flow 0,5 ml/min
Detektor:	Kontron Modell 432, 280 nm Kontron Modell 432, 640 nm
Datenverarbeitung:	Chromatographie-Datensystem Gynkosoft Version 3.12
Säule:	HyperClone 3 µ ODS (C18) 120 A; 150 x 4,6 mm (ID)
Lösungsmittel:	A: 5 %-ige Ameisensäure B: Methanol gradient grade
Flow:	0,5 ml/min

Die Nachsäulenderivatisierung erfolgte im Anschluss an die HPLC-Trennung. In einem Reaktor (gestrickte PTFE-Kapillare, Länge 9,3 m, ID 0,5 mm) wurden die getrennten phenolischen Substanzen mit einer 1 %-igen Lösung DMAZA in MeOH/H₂SO₄ (3 N) versetzt. Nach einer Reaktionszeit von zwei Minuten konnte die Komplexbildung aus Flavanolen mit dem DMAZA-Reagens bei 640 nm quantitativ bestimmt werden.

Gradientenverlauf

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

Phloridzinbestimmung

Da die Phloridzinkonzentration den linearen Detektionsbereich übersteigt, wurde für eine genauere Bestimmung eine zweite HPLC-Analyse bei einer Wellenlänge von 280 nm durchgeführt, wofür die Proben 1:200 mit Methanol verdünnt wurden.

Probengeber:	Kontron Modell HPLC Autosampler 465 bzw. Gilson-Abimed Modell 231
Pumpe:	Kontron Modell 422
Säulenofen:	Column – Thermostat Jetstream 2 bei 30 °C
Detektor:	Kontron Diodenarraydetektor 440 bzw. Kontron Modell 432
Säule:	125 x 4 mm (ID), gefüllt mit LiChrospher 100 RP; 18,5 µm Partikelgröße
Lösungsmittel:	A: 5 %-ige Ameisensäure B: Methanol gradient grade
Flow:	1 ml/min

Gradientenverlauf bei der Phloridzinbestimmung

0 min:	40 % B
6 min:	90 % B
7 min:	90 % B
9 min:	40 % B
12 min:	Ende

Quantitative Auswertung der HPLC-Analysen

Über die Peakfläche von bestimmten phenolischen Substanzen lässt sich mithilfe von Responsefaktoren deren Konzentration ermitteln.

Über folgende Formel erhält man die Konzentration der gewünschten Substanz in mg/ml Trockensubstanz (TS):

$$Konz_{(i,x)} = \frac{Rf_{(i,e)} * A_{(i,x)}}{Rf_{(iS,e)} * A_{(iSx)}} * Konz_{(iS)} * Mf$$

Die Responsefaktoren berechnen sich nach folgender Formel:

$$Rf = \frac{Konz_{(i,e)}}{A_{(i,e)}}$$

Konz	Konzentration
Rf	Responsefaktor
A	Peakfläche
Mf	Multiplikationsfaktor (bezieht die Konzentration auf mg/g TS)
i	Einzelpeak
x	Einzelprobe
e	Eichprobe
iS	interner Standard
Konz _(iS*)	Konzentration des Standards bei der Extraktion

Responsefaktoren:

Catechin	0,70E-06
Epicatechin	0,48E-06
Chlorogensäure	5,50E-06
<i>p</i> -Cumarsäurederivate	1,35E-06
Phloretinderivate	2,35E-06
Phloridzin	1,47E-06
Procyanidin B2	1,34E-06
Rutin	12,60E-06
3-Methoxyflavon	2,88E-06

Von ausgewählten Proben wurden mittels eines Diodenarraydetektors die UV-Spektren des entsprechenden Peaks aufgezeichnet. Anhand der Spektrenverläufe und der Retentionszeiten konnten auf diese Weise die Substanzen bzw. Substanzklassen ermittelt werden.

2.2.13 Statistische Auswertung

Zur Auswertung der Ergebnisse wurde das Statistikpaket SAS, Version 9.1 (SAS Institute Inc. 2003) verwendet. Die Datenauswertung wurde in Anlehnung an gängige Analysemethoden für Mikroarrays durchgeführt (QUACKENBUSH 2001, CUI und CHURCHILL 2003). Für die statistische Analyse der Makroarraydaten wurden die Expressionswerte zunächst zur Basis 2 logarithmiert, um den Voraussetzungen für parametrische Testverfahren zu genügen. Zudem wurde auf diese Weise eine Symmetrie der Daten erreicht, so dass beispielsweise eine zweifache Induktion und eine zweifache Repression um denselben Wert (± 1) vom Nullwert der Skala abweichen. Anschließend wurden die Daten nach WOLFINGER et al. (2001) in zwei miteinander verknüpften ANOVA-Modellen analysiert (PROC MIXED). Im ersten Modell wurden die logarithmierten Rohdaten normalisiert, das heißt sie wurden relativ zum Probenmittel zentralisiert. Dadurch wurden die arraybedingten systematischen Effekte für das gesamte Experiment berücksichtigt. In das zweite *Mixed-Model* gingen die normalisierten Residuen aus dem ersten Modell ein. In diesem zweiten Modell wurden für jedes Gen sowohl fixe als auch zufällige Effekte berücksichtigt. Dabei stellten Sorte, Alter, N-Düngung und *V. inaequalis*- bzw. Kontrollbehandlung fixe Faktoren dar, der Array ging als zufälliger Faktor mit ein. Die Varianzkomponenten wurden mithilfe des REML-Verfahrens (*restricted maximum likelihood*) geschätzt. Mittels mehrerer ESTIMATE-Statements wurden Testhypothesen, die für das jeweilige Experiment von Interesse waren, konstruiert.

Um signifikante Unterschiede zwischen den Datensätzen zweier verschiedener Vergleichsbedingungen zu identifizieren, wurden *Mixed-Model*-basierte t-Tests durchgeführt. Schließlich wurde eine Bonferroni-Korrektur der erhaltenen p-Werte vorgenommen (p_{Bon}). Dies geschah, um die Alphafehler-Kumulierung bei multiplen Paarvergleichen, die bei der

gleichzeitigen Analyse zahlreicher Gene massiv auftritt, zu neutralisieren. Mit dieser sehr konservativen Methode wird der erwartete Anteil an Falsch-Positiven unter denjenigen Genen berechnet, die im t-Test als differentiell exprimiert identifiziert worden waren.

Durch eine derartige Datenauswertung konnten bei geringer Varianz auch niedrige Expressionsunterschiede (delogarithmierte Expressionunterschiede $< 2,0$) als signifikant differentiell exprimiert detektiert werden. Bei einer bloßen Betrachtung der Induktions- bzw. Repressionsfaktoren mit einem Schwellenwert von 2,0 wären solche differentiellen Expressionen übersehen worden.

3 V. inaequalis-Detektion

3.1 Ergebnisse

Als Basis für die Genexpressionsstudien war eine erfolgreiche *V. inaequalis*-Inokulation von entscheidender Bedeutung. Um Aussagen über das Ausmaß der Infektion treffen zu können, wurden eine visuelle Bonitur sowie molekularbiologische Untersuchungen durchgeführt.

3.1.1 V. inaequalis-Bonitur

Die künstliche Inokulation mit *V. inaequalis*-Konidien an Folienhausbäumen führte zu nur relativ schwachen Schorfsymptomen mit einem maximalen Krankheitsindex von 45 % (Abbildung 5). Makroskopisch sichtbare Symptome traten circa zwei bis drei Wochen nach der Inokulation auf. Am Tag der Bonitur drei Wochen nach Inokulation war das Blatt 1, also das jüngste voll entfaltete Blatt am Tag der Inokulation, wie erwartet das am stärksten infizierte Blatt. In älteren und jüngeren Blättern nahm der Krankheitsindex jeweils stark ab. Blätter unterschiedlicher N-Düngung verhielten sich weitgehend gleich, lediglich die niedrige N-Variante N1 führte zu leicht verminderten Schorfsymptomen. Die schorfresistente Sorte Rewena blieb unter allen N-Varianten befallsfrei. Auch die jeweils nicht inokulierten Pflanzen wiesen keine Schadsymptome auf.

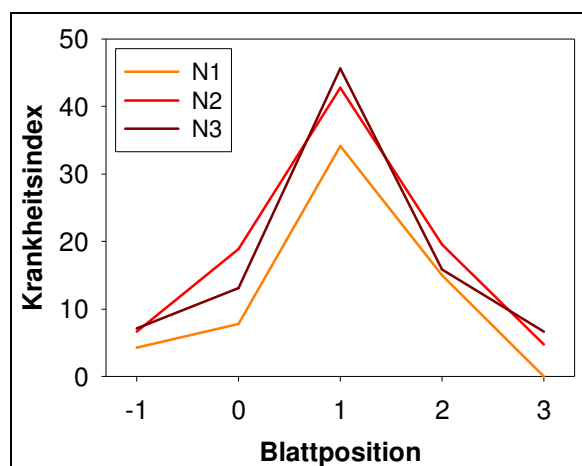


Abbildung 5 Krankheitsindex (21 dpi) für verschiedene Blattpositionen von Golden Delicious-Folienhausbäumen der N-Stufen N1, N2 und N3.

3.1.2 V. inaequalis-Quantifizierung mittels qRT-PCR

Folienhaus

Um die Infektion zu quantifizieren, wurde eine *real-time* Detektion von *V. inaequalis*-Myzel durchgeführt. Dazu wurden Primer für ein *V. inaequalis*-Gen aus der cDNA-Bank „WILD 2004“ entwickelt (Tabelle 22), das größte Homologie zu einem Gen aus *Magnaporthe grisea* aufweist, dem als Erreger der Reisverbräunung ökonomisch bedeutendsten Pathogen bei Reis. Die Quantifizierung der *V. inaequalis* cDNA pro 250 ng Gesamt-RNA aus Apfelblättern basiert auf einer Standardkurve, die anhand bekannter cDNA-Konzentrationen des Pathogens ermittelt wurde. Die Standardkurve zeigte eine hoch signifikante negative Korrelation zwischen den Ct-Werten und der cDNA-Konzentration des Pathogens ($R^2 = 0,96$; $p < 0,01$; $y = -4,17x + 23,09$).

Zunächst wurde die Quantifizierung für das Blatt 1 von Folienhausbäumen der N-Stufen N1, N2 und N3 durchgeführt (Abbildung 6). Die qRT-PCR-Daten spiegelten dabei die Anzahl an makroskopischen Schorfsymptomen wider. Große Mengen an *V. inaequalis* cDNA wurden in den inokulierten anfälligen Blättern erst 25 dpi bzw. in N3 bereits 14 dpi nachgewiesen. In Blättern von nicht inokulierten Golden Delicious-Bäumen sowie von Rewena (jeweils ohne Abbildung) wurden zu keinem Zeitpunkt nennenswerte Mengen an *V. inaequalis* cDNA detektiert. Blatt 2 verhielt sich bezüglich der *V. inaequalis*-Konzentrationen ähnlich wie Blatt 1 (ohne Abbildung).

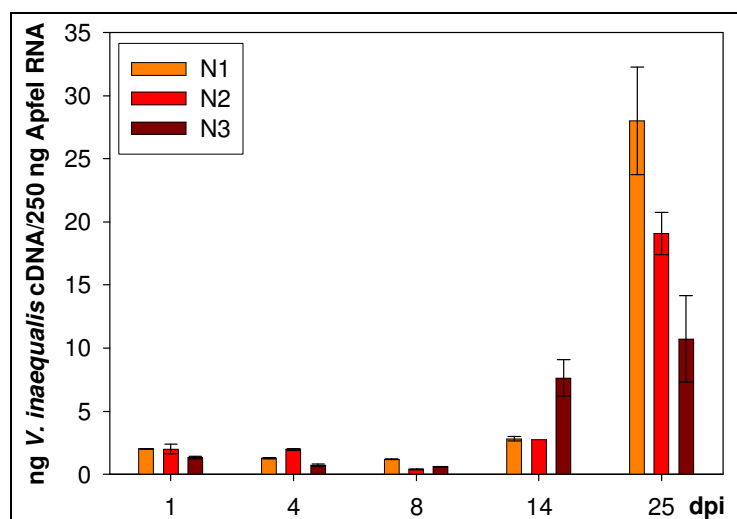


Abbildung 6 *V. inaequalis*-Quantifizierung im inokulierten Blatt 1 von Golden Delicious-Folienhausbäumen der N-Stufen N1, N2 und N3. N1 25 dpi: 80 % infizierte Blattfläche, N2 und N3 25 dpi: jeweils 60 % infizierte Blattfläche.

Für den letzten Termin 25 dpi fand zusätzlich eine *V. inaequalis*-Quantifizierung in Abhängigkeit vom geschätzten infizierten Blattflächenanteil statt (Abbildung 7). Insgesamt wurden dabei mit steigendem infizierten Blattflächenanteil zunehmende Konzentrationen an *V. inaequalis* cDNA ermittelt. N1-Blätter wiesen dabei teilweise deutlich höhere *V. inaequalis*-Gehalte auf als die stärker gedüngten N3-Blätter.

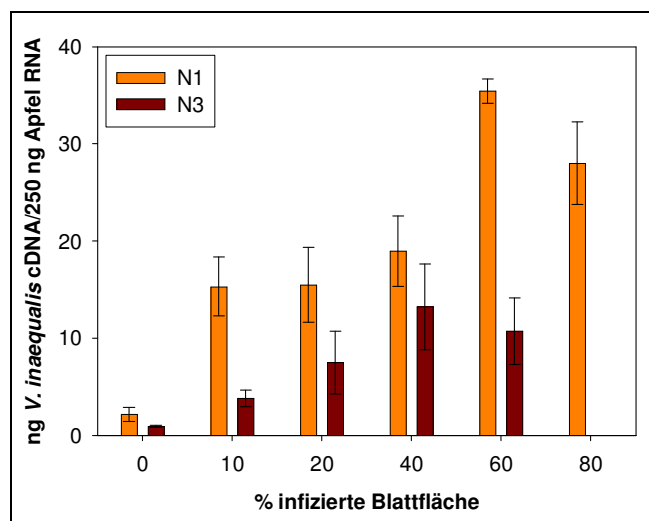


Abbildung 7 *V. inaequalis*-Quantifizierung in unterschiedlich stark infizierten Golden Delicious-Blättern (0-80 % infizierte Blattfläche) von N1- und N3-Folienhausbäumen zum Termin 25 dpi.

Freiland

Die schorfanfälligen Golden Delicious-Bäume wiesen im Freiland bedingt durch die *V. inaequalis* begünstigende Witterung einen 100 %-igen Schorfbefall auf, das heißt nach einer gewissen Inkubationszeit waren sämtliche Blätter infiziert. Zum Zeitpunkt der Probenahme waren an den noch relativ jungen Probenblättern noch keine Schorfsymptome zu erkennen. Lediglich bei Blatt 4, das am letzten Probenahmetermin etwa zwei Wochen alt war, waren erste Symptome zu erkennen. In qRT-PCR-Analysen wurde untersucht, ob schon vor dem Auftreten makroskopisch sichtbarer Symptome *V. inaequalis* cDNA im Blatt nachweisbar ist. Durch die Annahme einer Blattneubildung innerhalb von zwei Tagen und Verwendung der Blattstadien 1, 2 und 4 wurde dabei ein Untersuchungszeitraum von zwei Wochen abgedeckt.

Wie Abbildung 8 zu entnehmen ist, gelang dieser frühe Nachweis von *V. inaequalis*-Myzel. Zu frühen Zeitpunkten wurden in der N-Stufe N1 höhere Konzentrationen an *V. inaequalis* cDNA ermittelt als in N3, zu späten Zeitpunkten verhielten sich die N-Stufen genau entgegengesetzt. Insbesondere an den Tagen 8-10 wurden sehr hohe Schwankungen der

V. inaequalis-Konzentrationen beobachtet. In Blättern der schorfresistenten Sorte Rewena wurden keine nennenswerten Mengen an V. inaequalis cDNA detektiert (ohne Abbildung).

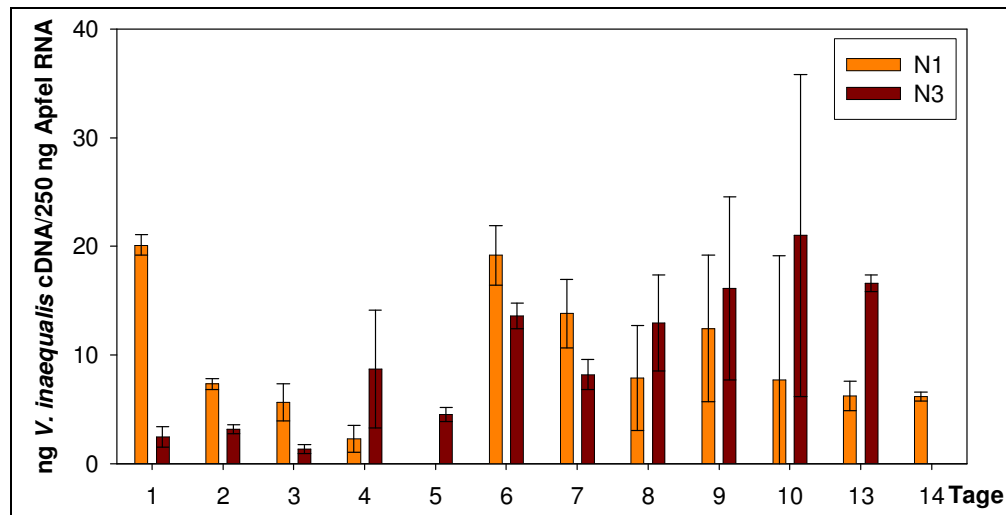


Abbildung 8 V. inaequalis-Quantifizierung in Golden Delicious-Blättern von N1- und N3-Freilandbäumen.

3.1.3 V. inaequalis-Quantifizierung mittels Makroarray

Die Expression des in den qRT-PCR-Analysen amplifizierten Gens wurde an normal N-gedüngten Folienhausbäumen auch mithilfe von Makroarrayanalysen untersucht. Auf einem Niveau von $p < 0,05$ war der Klon in alten inokulierten Golden Delicious-Blättern signifikant und um den Faktor 1,5 stärker konzentriert als in jungen inokulierten Golden Delicious-Blättern.

In der cDNA-Bank „Golden Delicious“ wurde ebenfalls ein vermutlich aus V. inaequalis stammender Klon mit größter Homologie zu einem M. grisea-Gen gefunden. Dieser Klon codiert ein glucose-repressible Protein und weist auf einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ mehrere Expressionsunterschiede auf (Tabelle 3). Der größte Unterschied wurde zwischen inokulierten älteren Golden Delicious-Blättern aus dem Folienhaus und den entsprechenden jungen Blättern ermittelt, wobei in älteren Blättern eine um den Faktor 2,3 erhöhte Konzentration des V. inaequalis-Gens gemessen wurde.

Für einen weiteren möglicherweise aus V. inaequalis stammenden Klon wurde an Proben der Freilandbäume eine signifikante Konzentrationsänderung beobachtet: Ein hypothetical protein codierendes Gen aus Gibberella zeae war in Golden Delicious um den Faktor 2,0 stärker konzentriert als in Rewena ($p < 0,0001$).

Tabelle 3 Signifikante Konzentrationsunterschiede ($p < 0,05$) im Folienhauserperiment (FH) und Freilandexperiment (FL) eines *V. inaequalis*-Klons mit größter Homologie zu einem glucose-repressible Gen aus *M. grisea*.

Experiment	Effekt	Konzentrations- verhältnis	p
FH	inokuliert > nicht inokuliert	1,3	0,0034
FH	GD inokuliert > Rewena inokuliert	1,3	0,0153
FH	GD inokuliert > GD nicht inokuliert	1,5	0,0009
FH	GD inokuliert, alt > GD nicht inokuliert, alt	2,1	0,0013
FH	GD inokuliert, alt > GD inokuliert, jung	2,3	<0,0001
FL	GD > Rewena	1,3	0,0128
FL	GD N3 > GD N1	1,4	0,0327
FL	GD alt > GD jung	1,6	0,0045

3.2 Diskussion

Die künstliche Inokulation mit *V. inaequalis*-Konidien führte im Folienhaus zu nur relativ schwachen Schorfsymptomen mit einem maximalen Krankheitsindex von 45 %. In einem ähnlichen Experiment erzielten LESER und TREUTTER (2005) an 60 % der Blätter sporulierende Schorfläsionen und an weiteren 20 % Schorfläsionen ohne Sporulation.

Das Gelingen der Quantifizierung von *V. inaequalis*-Myzel im Apfelblatt konnte als großer Erfolg gewertet werden. Bisher ist ein solcher Nachweis noch nicht bekannt. SALM und GEIDER (2004) berichten von einer erfolgreichen Detektion und Quantifizierung von *E. amylovora* im Apfelblatt mittels qRT-PCR.

Der im Folienhauserperiment beobachtete explosionsartige Anstieg an *V. inaequalis* cDNA zwischen 14 und 25 dpi belegt auf molekularer Ebene das langsame Wachstum des Pathogens im Apfelblatt. Die Tatsache, dass erst 25 dpi bzw. in N3 bereits 14 dpi größere Mengen an *V. inaequalis* cDNA nachgewiesen wurden, könnte ein Hinweis dafür sein, dass die amplifizierte Gensequenz in Zusammenhang mit der Sporulation oder einem anderen späten Ereignis innerhalb der pilzlichen Entwicklung steht. Die Sequenz des verwendeten *V. inaequalis*-Gens besitzt größte Homologie zu einem Abschnitt aus dem vollständig sequenzierten Genom des Pilzes *M. grisea* (DEAN et al. 2005). Die einzige Information zu der betreffenden Sequenz ist allerdings, dass sie ein hypothetical protein codiert, so dass daraus keine Schlüsse über deren Funktion innerhalb der Pathogenese gezogen werden können. Interessant wäre sicherlich auch, die Expression eines innerhalb der Pathogenese früh aktivierten Gens zu untersuchen, also beispielsweise eines mit der Appressorienbildung in Zusammenhang stehenden Gens.

In Makroarrayanalysen wurde die Expression eines Klons mit größter Homologie zu einem glucose-repressible Gen aus *M. grisea* untersucht. Derartige Gene sind innerhalb von Pflanze-

Pilz-Interaktionen häufig redundant, beispielsweise bei der *M. grisea*-Pathogenese in Reis (KIM et al. 2001). MCNALLY und FREE (1988) isolierten und charakterisierten ein Gen aus *Neurospora crassa*, das infolge einer Glukose-Reduktion des Nährmediums induziert wurde. Glucose-repressible Gene stehen demnach mit der Mobilisierung potenzieller Kohlenhydrat- bzw. Energiequellen für das Pilzwachstum in Verbindung.

Die makroskopisch sichtbaren Schorfsymptome korrelieren weitgehend mit den mithilfe von qRT-PCR-Analysen ermittelten Konzentrationen an *V. inaequalis* cDNA in den Apfelblättern. Die *V. inaequalis*-Konzentrationen der Golden Delicious-Proben aus dem Folienhaus 25 dpi (Abbildung 6) sind nicht direkt miteinander zu vergleichen, da eine Vorsortierung der Blätter nach ihrem infizierten Blattflächenanteil stattfand und in der Abbildung 6 Blätter mit 60 % und mit 80 % infiziertem Blattflächenanteil verglichen wurden. Es ist daher nicht unbedingt davon auszugehen, dass – wie die Abbildung zunächst vermuten lässt – eine steigende N-Versorgung zu abnehmenden *V. inaequalis*-Konzentrationen führt. Vielmehr lässt die Tatsache, dass in der N-Stufe N3 bereits 14 dpi relativ hohe *V. inaequalis*-Gehalte nachgewiesen wurden, möglicherweise den Schluss zu, dass sich der Pilz in der stark gedüngten Variante schneller etablieren konnte.

Bei den unterschiedlich stark infizierten Golden Delicious-Blättern des Termins 25 dpi wurden in der N-Stufe N1 höhere Konzentrationen an pilzlicher cDNA gemessen als in N3 (Abbildung 7). Dies lässt sich nicht mit den makroskopisch sichtbaren Symptomen in Einklang bringen.

Anders als im Folienhaus waren im Freiland bereits messbare Konzentrationen an *V. inaequalis* cDNA vorhanden, ehe Schorfsymptome auf dem Blatt sichtbar waren (Abbildung 8). Dies deutet darauf hin, dass der Befallsdruck schon im frühen Stadium wesentlich stärker war als bei der künstlichen Inokulation.

Die Mikroarray-Analysen dreier in der cDNA-Bank „Golden Delicious“ (6.1.1.1) auftretender und vermutlich aus *V. inaequalis* stammender Klone (hypothetical protein und glucose-repressible Gen, beide aus *M. grisea*, sowie ein hypothetical protein aus *G. zaeae*, dem teleomorphen Stadium von *Fusarium graminearum* und damit des pilzlichen Erregers der Ährenfusariose an Getreide) bestätigten die qRT-PCR-Ergebnisse und validierten somit auch die beiden Analysemethoden: Inokulierte wiesen höhere Konzentrationen auf als nicht inokulierte Golden Delicious-Proben, Golden Delicious- höhere Konzentrationen als Rewena-Blätter und ältere höhere Konzentrationen als junge Golden Delicious-Blätter.

4 Wachstumsdaten der Freilandbäume

4.1 Ergebnisse

Im Rahmen einer Diplomarbeit (CALMBACH 2005) wurde der N-Einfluss auf das vegetative und generative Wachstum der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Freilandbäume untersucht. Die für die Interpretation der eigenen Ergebnisse wichtigsten Parameter werden im Folgenden dargestellt.

4.1.1 Blatt-N-Gehalt

Der N-Gehalt im Blatt (Abbildung 9) beschreibt den Anteil des angebotenen Stickstoffs, der tatsächlich genutzt wird. In beiden Sorten wurde in der N-Stufe N1 ein deutlich geringerer Blatt-N-Gehalt gemessen als in den beiden höher mit N versorgten Varianten, Unterschiede zwischen N2- und N3-Blättern wurden dagegen nicht beobachtet.

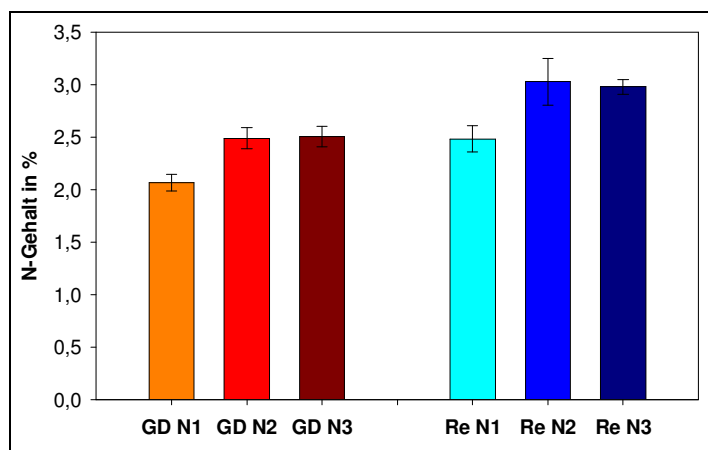


Abbildung 9 N-Gehalt der Blätter in Prozent der Trockensubstanz von Golden Delicious- und Rewena- N1-, N2- und N3-Freilandbäumen.

4.1.2 Triebwachstum

Abbildung 10 zeigt das Gesamtriebwachstum pro Baum, wobei jeweils die Länge aller Sprosse addiert wurde. Zu Beginn der Messungen war die Wachstumsaktivität bei allen N-Stufen in Golden Delicious größer als in Rewena. Die schorfresistente Sorte holte diesen Rückstand bis zum Ende der Vegetationsperiode wieder auf. In beiden Sorten zeigten N3-Bäume das stärkste Triebwachstum, wobei der Unterschied zu den N1- und N2-Bäumen in Golden Delicious stärker ausgeprägt war.

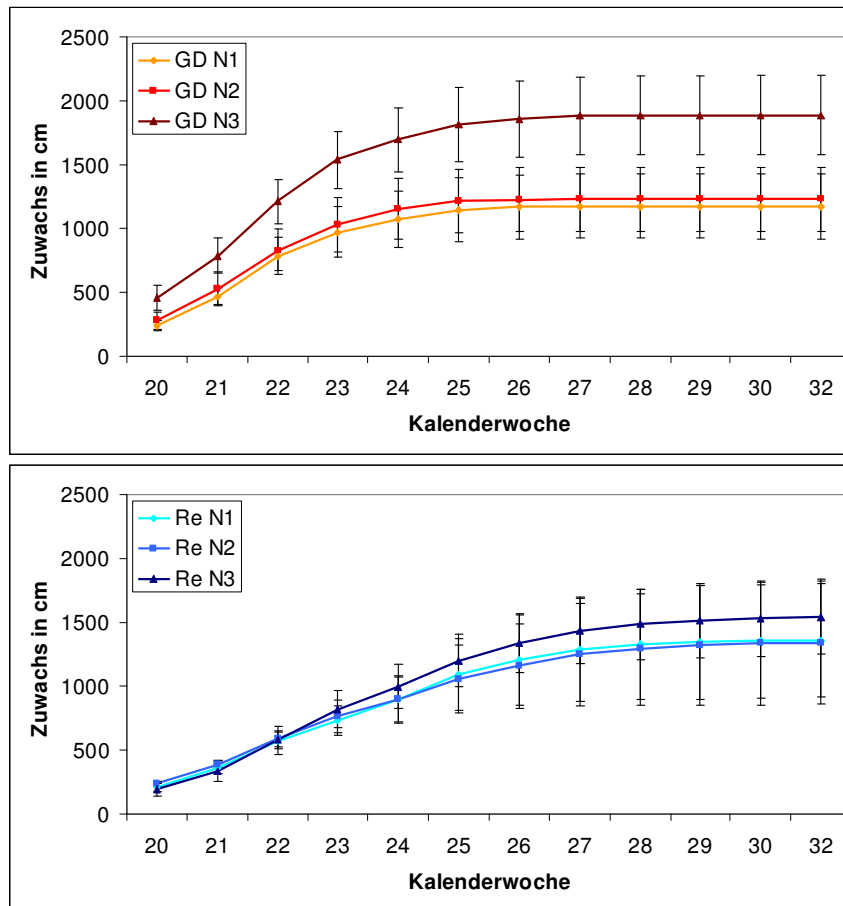


Abbildung 10 Gesamttriebwuchs pro Baum von Golden Delicious- und Rewena- N1-, N2- und N3-Freilandbäumen.

Das Gesamttriebwachstum spiegelt sich auch im täglichen Zuwachs pro Baum wider: Während in Golden Delicious zu Beginn des Messzeitraumes sehr hohe tägliche Zuwachsraten ermittelt wurden, die dann kontinuierlich abnahmen, blieben die Zuwachsraten bei Rewena zunächst lange auf einem konstanten Niveau (ohne Abbildung). Golden Delicious-Bäume schlossen ihr Triebwachstum dementsprechend früher mit der Bildung einer Endknospe ab, wobei allerdings kein Effekt der unterschiedlichen N-Düngung beobachtet wurde.

Zusätzlich wurde die Gesamttriebzahl pro Baum ermittelt (ohne Abbildung), wobei eine Unterscheidung in Kurztriebe (< 3 cm) und Langtriebe (≥ 3 cm) vorgenommen wurde. Rewena produzierte in allen N-Stufen wesentlich weniger Triebe als Golden Delicious, wobei keine signifikanten Unterschiede zwischen den N-Stufen beobachtet wurden. In beiden Sorten führte eine Erhöhung der N-Düngung zu einer Zunahme an Langtrieben und einer Reduktion an Kurztrieben.

4.1.3 Stammdurchmesser

Der Stammdurchmesser ist eine weitere wichtige Kenngröße für die vegetative Entwicklung eines Baumes (Abbildung 11). In beiden Sorten führte eine erhöhte N-Zufuhr zu einem gesteigerten Dickenwachstum, wobei Rewena größere Stammdurchmesser aufwies als Golden Delicious. Bei einer Betrachtung des Zuwachses zwischen den beiden Messterminen im Frühling und Herbst waren allerdings keine N-bedingten Unterschiede zu erkennen.

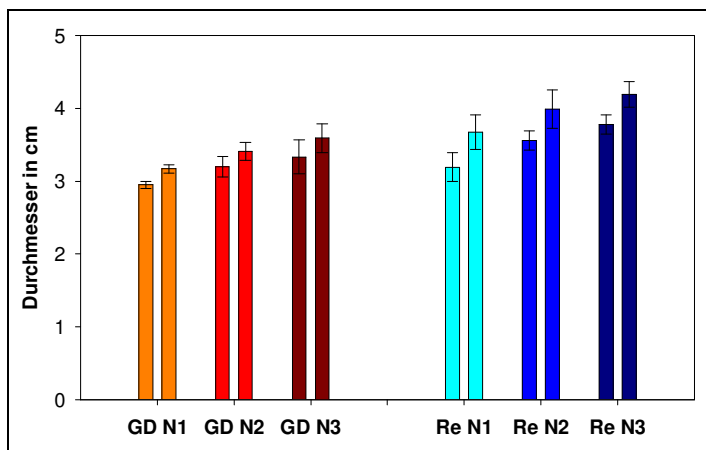


Abbildung 11 Stammdurchmesser im Frühling (jeweils erste Säule) und Herbst (jeweils zweite Säule) von Golden Delicious- und Rewena- N1-, N2- und N3-Freilandbäumen.

4.1.4 Ertrag

Der in Abbildung 12 dargestellte Gesamtertrag unterlag starken Schwankungen von Baum zu Baum. In beiden Sorten wurden in N1-Bäumen minimal höhere Erträge ermittelt als in den stärker N-gedüngten Varianten. Rewena wies in allen N-Stufen einen deutlich höheren Ertrag auf als Golden Delicious, was durch signifikant größere Früchte in der Sorte Rewena bedingt ist.

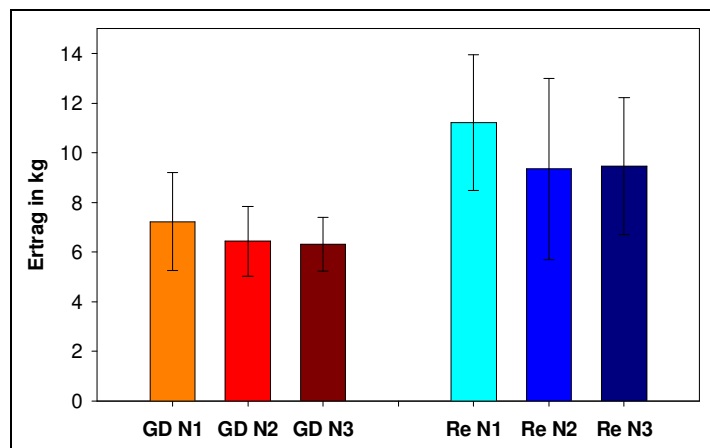


Abbildung 12 Gesamtertrag pro Baum von Golden Delicious- und Rewena- N1-, N2- und N3-Freilandbäumen.

4.2 Diskussion

Die erhobenen Wachstumsdaten tragen zur Charakterisierung der verwendeten Freilandbäume bei und bilden so die Basis für die folgenden Genexpressionsanalysen. Wachstumsdaten der Folienhausbäume wurden nicht erhoben, waren aber sortentypisch.

Bei den meisten Parametern wurde ein ähnliches Verhalten von N2- und N3-Bäumen beobachtet. N1-Bäume tendierten in beiden Sorten zu reduziertem Wachstum und erhöhtem Ertrag. Insgesamt jedoch wurden nur geringe N-bedingte Unterschiede gemessen, was vermutlich an einer zu geringen Abstufung der N-Düngung liegt.

Die durch den Blatt-N-Gehalt repräsentierte N-Versorgung der Bäume lag nach Orientierungswerten von QUAST (1986) bei allen N-Varianten in einem ausreichenden bis hohen Bereich.

Golden Delicious und Rewena verhielten sich weitgehend sortentypisch. Aussergewöhnlich war allerdings, dass die Früchte der schorfresistenten Sorte deutlich größer waren als die der anfälligen Sorte, während die beiden Sorten normalerweise ähnlich große Früchte bilden. Die verringerte Fruchtgröße in Golden Delicious ist möglicherweise auf eine Kombination des starken Schorfbefalls und der niedrigeren Blatt-N-Gehalte zurückzuführen. Der höhere N-Gehalt in Rewena wiederum beruht möglicherweise auf einer sortenbedingt besseren Nährstoffaufnahme.

In beiden Sorten wurde der höchste Ertrag bei den N1-Bäumen ermittelt. Dies ist zunächst erstaunlich, allerdings ist in Feldversuchen generell davon auszugehen, dass zusätzliche N-Düngungen bei einer N-Mindestversorgung der Bäume keine deutliche Ertragssteigerung bewirken.

Abschließend muss festgehalten werden, dass sich vermutlich aufgrund zu geringer Abstufungen in der N-Düngung nur relativ kleine N-bedingte Unterschiede im Wachstum von Golden Delicious und Rewena ergaben. Dies ist auch bei der Diskussion der Genexpressionen zu berücksichtigen.

5 Studien an normal N-versorgten Folienhausbäumen

5.1 Ergebnisse

In einem ersten Versuch wurden Analysen am Blatt 1 der N-Stufe N2 der Folienhausbäume durchgeführt. Mit den Untersuchungen an der am stärksten *V. inaequalis* befallenen Blattstufe der normal gedüngten Pflanzen wurden zunächst die Analysemethoden optimiert und es wurde ein erster Einblick in Genexpressions- und Phenoldaten gewonnen. Dazu wurden die Proben mit dem „Makroarray 2004“ (Tabelle 23) analysiert, der aus Klonen der Genbank „WILD 2004“ angefertigt wurde.

5.1.1 Genbank „WILD 2004“ und Erstellung des „Makroarrays 2004“

Sequenzierte und amplifizierte cDNA-Klone lagen schon zu Beginn der Studien aus vorangegangenen Experimenten vor (WILD 2004). Unter den 384 sequenzierten Klonen befanden sich 123 Unigene. Etwa ein Viertel aller cDNA-Klone zeigte größte Homologie zu einem Gen, das ein Metallothionein-ähnliches Protein AMT2 von *M. domestica* codiert. 57,0 % der Unigene besaßen keine signifikante Sequenzhomologie oder hatten unbekannte Funktion. 33,3 % der Unigene waren dem Primärstoffwechsel zuzuordnen und 9,7 % spielten eine Rolle bei Stress und/oder Abwehr. In der letzten Gruppe befanden sich unter anderem einige wichtige an der Abwehr beteiligten Klone, die größte Homologie zu folgenden Gensequenzen aufwiesen: pathogenesis-related protein 1 (*pr-1*, *M. domestica*), beta-1,3-glucanase (*GLU-2*, *M. domestica*), thaumatin-like protein (*tl* gene, *M. domestica*), osmotin-like protein (*Vitis vinifera*), lipid transfer protein precursor (*M. domestica*), metallothionein like protein AMT2 (*M. domestica*), putative HSP70 (P0031D11.28; *Oryza sativa*).

Tabelle 4 Funktionelle Einteilung der ausgewählten cDNA-Klone für den „Makroarray 2004“.

Vermutete Funktion	„Makroarray 2004“ [%]
Stress/Abwehr	21,3
Zellulärer Metabolismus	17,5
Transkription/Translation	2,5
Photosynthese/Chloroplast	2,5
Wachstum/Entwicklung	1,3
Phytohormonhaushalt	1,3
Pathogen-Herkunft	1,3
Unbekannte Proteine	20,0
Keine Sequenzähnlichkeiten	32,5

Für den „Makroarray 2004“ wurden 80 Klone aufgrund ihrer vermuteten biologischen Funktion sowie aufgrund der Ergebnisse vorangegangener Studien (WILD 2004) für die Genexpressionsanalysen ausgewählt. Für Informationen zur funktionellen Einteilung der ausgewählten Gene siehe Tabelle 4. Genauere Angaben zu Genen des „Makroarrays 2004“ sind außerdem der Tabelle 23 im Anhang zu entnehmen.

5.1.2 Genexpression

Aufgrund des Induktionsmusters wurde für die Induktionen eine einheitliche Einteilung vorgenommen: 2,0-4,9: schwache Induktion, 5,0-9,9: mittelstarke Induktion, $\geq 10,0$: starke Induktion.

In der schorfresistenten Sorte Rewena war 8 dpi der Großteil der 80 untersuchten Gene induziert, während zu diesem Zeitpunkt in Golden Delicious fast kein Klon eine Reaktion auf die Inokulation aufwies. Im Gegensatz dazu zeigte Golden Delicious 25 dpi sehr starke Induktionen, wohingegen zu diesem späten Termin in Rewena keine Induktion nachgewiesen werden konnte (Tabelle 5).

Tabelle 5 Induktionsfaktoren derjenigen Gene, die unter mindestens einer experimentellen Bedingung in Blättern von Golden Delicious oder Rewena mindestens mittelstark (≥ 5) induziert waren. Signifikant stärkere Expression in GD Vi 25 dpi bzw. Re Vi 8 dpi als in den entsprechenden nicht inokulierten Kontrollen: ^{##} $p_{Bon} < 0,1$, [#] $p < 0,05$.

Homologie	Sorte	1 dpi	2 dpi	4 dpi	8 dpi	14 dpi	25 dpi
mRNA for thaumatin-like protein (<i>tl</i> gene), <i>M. domestica</i>	GD	2,0	0,7	2,1	1,6	1,8	9,6 ^{##}
	Re	1,6	0,7	1,1	2,8	1,2	0,6
Metallothionein-like protein AMT2, <i>M. domestica</i>	GD	1,2	0,6	0,7	0,4	1,2	43,8 ^{##}
	Re	1,6	4,7	3,3	5,1 [#]	0,4	1,3
Expressed protein (At1g51450), <i>A. thaliana</i>	GD	1,2	1,0	0,9	0,4	2,3	11,5 ^{##}
	Re	1,4	3,6	5,1	3,9 [#]	0,5	0,9
Senescence-associated protein-related, <i>A. thaliana</i>	GD	0,8	0,9	1,4	0,5	1,1	8,4
	Re	1,3	1,0	2,4	4,0	1,1	0,2
D3, keine Homologie	GD	2,1	2,0	1,4	0,7	1,6	15,2 ^{##}
	Re	1,3	0,6	2,1	2,8	1,4	0,7
E4, keine Homologie	GD	1,1	0,5	1,2	1,7	1,4	14,0 ^{##}
	Re	1,7	0,5	2,0	1,4	1,0	0,7
F12, keine Homologie	GD	1,5	0,2	1,2	1,1	1,5	8,8 ^{##}
	Re	1,6	0,3	1,6	1,7	1,0	0,7
H8, keine Homologie	GD	0,8	0,3	0,7	1,3	0,9	9,5 ^{##}
	Re	1,9	0,5	1,7	2,5	1,3	0,8
CaM mRNA for calmodulin, <i>M. domestica</i>	GD	1,1	2,6	1,8	0,4	1,5	0,6
	Re	1,8	0,2	1,1	9,3 ^{##}	0,8	1,0

Homologie	Sorte	1 dpi	2 dpi	4 dpi	8 dpi	14 dpi	25 dpi
Lipid transfer protein precursor, <i>M. domestica</i>	GD	0,4	2,5	1,0	0,5	0,6	0,6
	Re	2,5	0,4	1,5	5,7 ^{###}	0,6	1,0
Osmotin-like protein, <i>F. ananassa</i>	GD	0,9	1,2	1,2	2,6	1,6	0,5
	Re	1,6	0,0	1,0	5,1 [#]	1,1	0,9
Zinc finger C3HC4-type RING finger prot. family, <i>A. thaliana</i>	GD	1,7	0,9	1,3	1,0	1,6	1,6
	Re	1,3	0,4	1,4	5,5 ^{###}	1,3	0,8
Putative isoprenylated protein, <i>A. thaliana</i>	GD	0,3	0,6	2,1	0,3	1,1	1,1
	Re	0,9	0,6	0,4	12,7 ^{###}	1,3	0,5
Hypothetical protein, <i>A. thaliana</i>	GD	0,4	0,6	0,4	1,7	1,9	1,2
	Re	2,1	0,5	2,5	23,8 ^{###}	0,5	0,5
Expressed protein (At2g46820) mRNA, <i>A. thaliana</i>	GD	0,6	1,9	1,8	0,5	1,5	2,3
	Re	2,1	1,2	1,3	8,4 ^{###}	0,7	0,7
Ubiquitin like protein, <i>A. thaliana</i>	GD	0,4	1,3	0,8	0,5	1,2	1,3
	Re	2,6	0,5	1,1	5,2 [#]	0,5	0,8
Putative HSP70, <i>O. sativa</i>	GD	2,1	6,2	2,4	0,6	2,4	0,7
	Re	1,7	0,2	5,4	4,7 [#]	1,6	1,0
SUBI-3 gene for ubiquitin, <i>G. max</i>	GD	1,1	8,8	1,2	1,0	1,9	0,6
	Re	2,0	0,2	1,8	2,9	0,8	1,1
Gene for cyclophilin, <i>P. vulgaris</i>	GD	1,0	7,6	1,6	0,4	1,7	0,4
	Re	2,4	0,1	1,7	3,4	0,8	0,8
Latex plastidic aldolase-like protein mRNA, <i>H. brasiliensis</i>	GD	0,6	3,0	1,7	0,9	5,3	2,0
	Re	1,4	0,6	1,8	3,9 [#]	1,0	1,0

Neben den Induktionsfaktoren müssen jeweils auch die Expressionsdaten der einzelnen Gene in den nicht inokulierten Blättern berücksichtigt werden. Der Großteil der Klone, darunter drei nach Bonferroni-Adjustierung signifikant, zeigte gegen Ende des Experiments die maximale konstitutive Expression. In beiden Sorten wurde die höchste konstitutive Expression für einen Klon mit größter Homologie zu einem lipid transfer protein precursor aus *M. domestica* gefunden (Golden Delicious 14 dpi: 4,5 nVol; Rewena 2 dpi: 3,7 nVol).

Unter mindestens einer experimentellen Bedingung zeigten 71,3 % aller untersuchten Klone eine schwache Induktion, 16,3 % eine mittelstarke und 7,5 % eine starke Induktion. Diejenigen Gene mit mittlerer bis starker Induktion, das heißt mit einem Induktionsfaktor ≥ 5 , waren überwiegend stress- und/oder abwehrbezogen bzw. hatten in einigen Fällen keine signifikante Homologie zu bereits veröffentlichten Sequenzen. Insgesamt waren 20 der 80 untersuchten Klone mittelstark bis stark induziert. Innerhalb dieser 20 Gene zeigten acht Klone mittlere bis starke Induktion 25 dpi in Golden Delicious, neun Gene wiesen mittlere bis starke Induktion 8 dpi in Rewena auf (Tabelle 5). Zusätzlich zeigten drei Klone mittlere Induktion 2 dpi in Golden Delicious, ein Klon 14 dpi in Golden Delicious und zwei Klone 4 dpi in Rewena (Tabelle 5). Die einzigen Klone, die eine mittlere oder starke Induktion in

beiden Sorten zeigten, codierten ein putative heat shock protein HSP70 aus *O. sativa*, ein expressed protein aus *A. thaliana* und ein metallothionein-like protein AMT2 aus *M. domestica*. Der letztgenannte Klon war in Golden Delicious 25 dpi 43,8-fach induziert, was in diesem Versuch die stärkste Induktion aller untersuchten Klone darstellte.

5.1.3 Quantifizierung von Flavonoidgenen mittels qRT-PCR

Für die Erfassung der Gene des Flavonoidstoffwechsels (*pal*, *chs*, *fht*, *dfr*, *fls*, *fgt*, *ans*) wurden zusätzlich qRT-PCR-Analysen durchgeführt. Die Expression des Elongation factors 1 α erwies sich dabei als relativ konstant exprimiert (durchschnittlicher Ct-Wert = 20,07 \pm 0,49) und wurde deshalb als Referenzgen herangezogen.

Eine mit der Schorfinfektion gleichlaufende Geninduktion erfolgte beim *pal*-Transkript in den Blättern von Golden Delicious zum späten Termin. Hier stieg die Induktion im Infektionsverlauf auf 8,7 am Tag 25 nach Inokulation an, während in Rewena an den Terminen 1-14 dpi eine leichte Induktion bis 3,1 auftrat (Tabelle 6). Alle anderen untersuchten Flavonoidgene erfuhren keine nennenswerte Induktion als Folge der *V. inaequalis*-Inokulation (Tabelle 6).

Tabelle 6 Induktionsfaktoren von Flavonoidgenen in Golden Delicious- und Rewena-Blättern der N-Stufe N2.

Gen	Sorte	1 dpi	2 dpi	4 dpi	8 dpi	14 dpi	25 dpi
<i>pal</i>	GD	2,3	1,5	0,8	0,9	3,1	8,7
	Re	2,9	2,2	3,1	2,6	2,0	1,4
<i>chs</i>	GD	0,9	0,8	0,7	1,2	1,0	0,0
	Re	0,4	1,1	0,7	0,6	0,5	0,9
<i>fht</i>	GD	0,9	0,8	0,7	0,6	0,8	0,2
	Re	1,0	1,1	1,5	0,4	0,5	1,3
<i>dfr</i>	GD	0,9	1,2	1,2	1,9	1,7	0,2
	Re	0,6	1,1	1,2	0,6	0,4	1,0
<i>fgt</i>	GD	1,7	1,2	1,2	0,9	3,6	0,1
	Re	0,4	1,1	2,6	0,5	0,4	0,9
<i>fls</i>	GD	1,2	0,3	0,5	0,8	0,5	0,1
	Re	0,8	0,9	1,0	0,8	0,6	1,0
<i>ans</i>	GD	1,2	1,4	1,0	1,7	1,2	0,2
	Re	0,4	0,8	1,6	0,4	0,6	0,8

5.1.4 Phenolische Inhaltsstoffe

Die Konzentrationsbestimmungen phenolischer Inhaltsstoffe wurden mittels HPLC-Analysen durchgeführt, wobei jeweils auf die exakt selbe Charge an gemörsertem Blattmaterial wie für die Genexpressionsanalysen zurückgegriffen wurde. Die untersuchten phenolischen Inhaltsstoffe waren Hydroxyzimtsäuren (Chlorogensäure und *p*-Cumarsäure), Flavonole, monomere Flavanole (Catechin und Epicatechin), oligomere Flavanole (Procyanidin B2, Procyanidin B5, Procyanidin E-B5 und unbekannte Procyanidine) und Dihydrochalkone (Phloridzin und andere Phloretinderivate).

Hydroxyzimtsäuren

Bezüglich der Hydroxyzimtsäuren wurden deutlich höhere Werte für Golden Delicious als für Rewena gemessen (Abbildung 13). Nicht inokulierte Golden Delicious- und inokulierte Rewena-Blätter zeigten ein frühes Maximum. 25 dpi wurde für inokulierte Golden Delicious-Blätter eine deutlich höhere Konzentration ermittelt als für die entsprechenden nicht inokulierten Blätter.

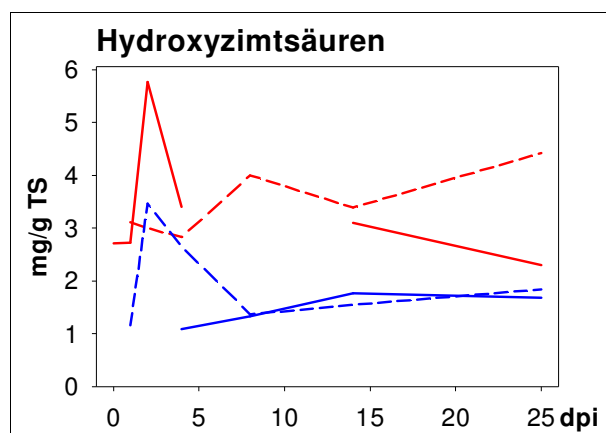


Abbildung 13 Konzentration an Hydroxyzimtsäuren [mg/g TS] in N2-Blättern der Sorten **Golden Delicious** und **Rewena** mit (---) und ohne (—) *V. inaequalis*-Inokulation.

Dihydrochalkone

Die Konzentrationen der „minor“ Dihydrochalkone schwankten stark (Abbildung 14). Ein auffälliger Peak lag in beiden Sorten bei 2 dpi. In inokulierten Golden Delicious-Blättern dagegen traten die höchsten Konzentrationen erst 8 dpi auf. Unterschiede zwischen den beiden Sorten oder infolge der *V. inaequalis*-Inokulation waren nicht zu erkennen.

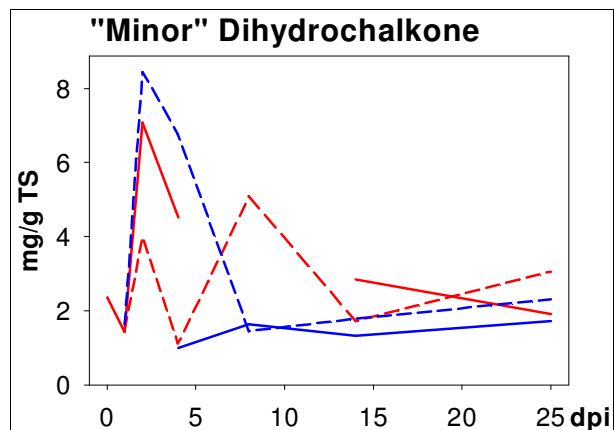


Abbildung 14 Konzentration an „minor“ Dihydrochalkonen [mg/g TS] in N2-Blättern der Sorten **Golden Delicious** und **Rewena** mit (---) und ohne (—) *V. inaequalis*-Inokulation.

Phloridzin

Bezüglich des Phloridzingehalts, der durch seine hohen Konzentrationen mehr oder weniger den Gesamtphenolgehalt darstellt, verhielten sich die beiden Sorten relativ ähnlich (Abbildung 15). Unterschiede infolge der Inokulation oder Trends im Zeitverlauf waren nicht zu erkennen.

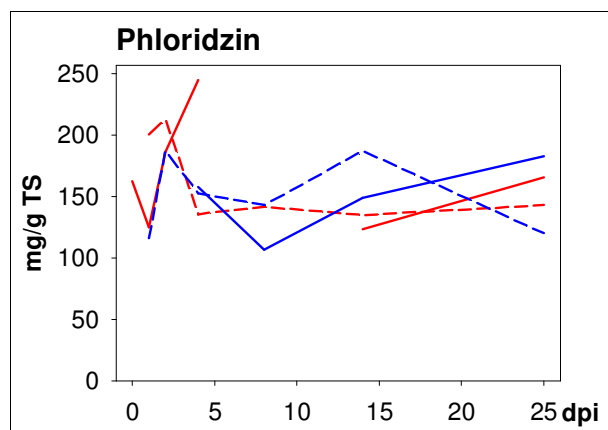


Abbildung 15 Konzentration an Phloridzin [mg/g TS] in N2-Blättern der Sorten **Golden Delicious** und **Rewena** mit (---) und ohne (—) *V. inaequalis*-Inokulation.

Flavonole

Auch bezüglich der Flavonolkonzentrationen verhielten sich die beiden Sorten recht ähnlich (Abbildung 16). Nach einem frühen Peak blieben die Werte im weiteren

Beobachtungszeitraum relativ konstant, wobei sich *V. inaequalis* inokulierte und nicht inokulierte Blätter in ihrem Gehalt nicht wesentlich voneinander unterschieden.

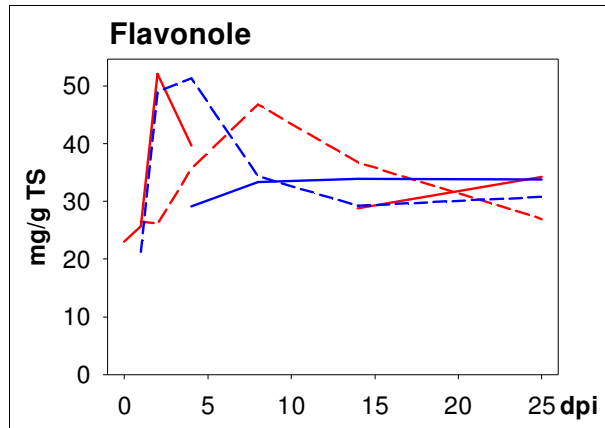


Abbildung 16 Konzentration an Flavonolen [mg/g TS] in N2-Blättern der Sorten **Golden Delicious** und **Rewena** mit (---) und ohne (—) *V. inaequalis*-Inokulation.

Flavanole

In Abbildung 17 sind die Konzentrationen an monomeren und oligomeren Flavanolen dargestellt. Der Verlauf der Gesamtflavanole entspricht ziemlich genau dem der oligomeren Flavanole und ist daher nicht gesondert aufgeführt. Die Flavanole starteten in beiden Sorten auf etwa gleichem Niveau. In Rewena wurden 8 dpi nur sehr niedrige Flavanolgehalte gemessen. Danach war in beiden Sorten ein Konzentrationsanstieg zum Ende des Untersuchungszeitraums zu verzeichnen. Inokulierte und nicht inokulierte Blätter verhielten sich dabei recht ähnlich. Die grundsätzlich niedriger konzentrierten monomeren Flavanole lagen anfangs nur in geringer Konzentration vor, ihr Gehalt nahm aber gegen Ende des Beobachtungszeitraums stark zu. Die beiden Sorten sowie inokulierte und nicht inokulierte Blätter verhielten sich dabei ähnlich.

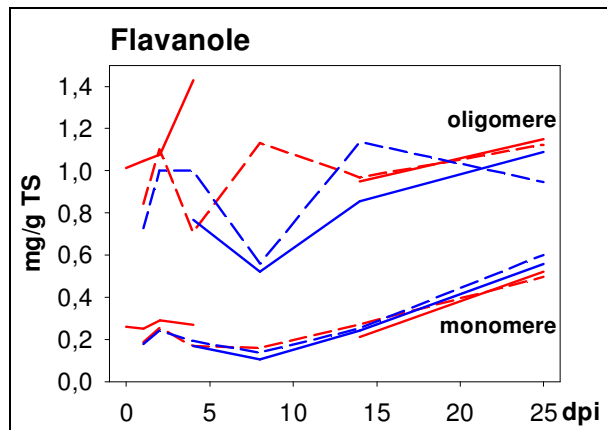


Abbildung 17 Konzentration an Flavanolen [mg/g TS] in N2-Blättern der Sorten **Golden Delicious** und **Rewena** mit (---) und ohne (—) *V. inaequalis*-Inokulation.

5.2 Diskussion

Mithilfe dieses ersten Versuches wurden zunächst die Analysemethoden optimiert. Darüber hinaus wurden aber auch schon sehr interessante Erkenntnisse gewonnen, die gerade im Hinblick auf die Durchführung der weiteren Experimente eine Rolle spielten.

In der schorfanfälligen Sorte Golden Delicious wurden erst 25 dpi die stärksten Abwehrreaktionen gemessen, in der resistenten Sorte Rewena dagegen schon nach acht Tagen (Tabelle 5). Diese frühere Reaktion trägt möglicherweise zur Resistenz dieser Sorte bei.

Obwohl der Gehalt an Phenylpropanoiden eine wichtige Rolle bei der Pathogenabwehr in Apfel spielt (TREUTTER und FEUCHT 1990, PICINELLI et al. 1995, MAYR et al. 1997), wurden keine Flavonoidgene in der auf Pathogen-induzierte Gene angereicherten subtraktiven Genbank identifiziert. Dies hängt vermutlich damit zusammen, dass nur eine begrenzte Anzahl zufällig ausgewählter Klone sequenziert wurde. Darüber hinaus wird die Flavonoidbiosynthese wahrscheinlich nicht über jedes einzelne Flavonoidgen reguliert, sondern auch durch die Substratverfügbarkeit gesteuert. Dieser Aspekt wurde bereits von MARGNA (1977) und DA CUNHA (1987) diskutiert.

Der Konzentrationsbereich der ermittelten Phenole (5.1.4) stimmt im Allgemeinen mit dem früherer Studien überein (MAYR et al. 1995, MAYR et al. 1997, RÜHMANN et al. 2002, LESER und TREUTTER 2005). Während sich andere Studien mit etablierten Schorfinfektionsstellen befassen, beobachteten LESER und TREUTTER (2005) erstmals direkte *V. inaequalis*-Effekte auf die Konzentration oder Zusammensetzung der untersuchten Phenole. Diese Einflüsse der Pilzinokulation wurden im vorliegenden Experiment nicht bestätigt (Abbildungen 13-17).

Metallothioneine

Besonders auffällig an der Genbank „WILD 2004“ war der hohe Prozentsatz (etwa 25 %) redundanter Klone, die ein Typ 3 Metallothionein-ähnliches Protein AMT2 aus *M. domestica* codieren (5.1.1). Berücksichtigt man, dass die Genbank normalisiert wurde, ist dieser hohe Prozentsatz umso erstaunlicher. DEGENHARDT et al. (2005) erstellten mittels *suppression subtractive hybridization* (SSH) eine cDNA-Bank aus gesunden jungen Blättern der schorfresistenten Apfelsorte Remo und der anfälligen Sorte Elstar. 91 der insgesamt 262 Klone, die stärker in Remo als in Elstar exprimiert waren, codierten dabei Metallothioneine. Auch in Studien mit anderen Fruchtarten waren Metallothionein-Klone sehr dominant: MOYLE et al. (2005) identifizierten etwa 50 % aller Klone einer Ananas-cDNA-Bank und MORIGUCHI et al. (1998) etwa 20 % aller Klone einer Satsuma-cDNA-Bank als Metallothionein-codierende Gene.

Metallothioneine treten in vielen Organismen wie Bakterien, Pilzen, Tieren und Pflanzen auf. Es handelt sich dabei um Cystein-reiche und Metall-bindende Proteine niedrigen Molekulargewichts, die durch bestimmte Metalle kontrolliert werden, aber auch durch eine Reihe anderer Stimuli beeinflusst werden wie beispielsweise Abszissinsäure, Hitze- oder Kälteschock, Verwundung, Virusinfektionen, Seneszenz oder Salzstress (GARCÍA-HERNÁNDEZ et al. 1998). Metallothioneine werden entsprechend der Anordnung ihrer Cysteinresiduen in vier verschiedene Gruppen eingeteilt (*mt1*, *mt2*, *mt3*, *mt4*; RAUSER 1999). GARCÍA-HERNÁNDEZ et al. (1998) berichten von einer Akkumulation von Metallothionein MT1a und MT2a in Trichomen. In *Medicago sativa* sind Trichomzellen unter anderem aktiv am Flavonoidmetabolismus beteiligt (CHARRIER et al. 1998). Nach GARCÍA-HERNÁNDEZ et al. (1998) wird auch eine Reihe stress- und abwehrbeteiligter Gene wie Polyphenoloxidasen, Peroxidasen, *pal* oder *chs* in Trichomen exprimiert und viele Enzyme der entsprechenden Synthesewege benötigen für ihre Aktivität Kupfer. Sie schlagen demnach vor, dass Metallothioneine in diesen Trichomzellen die Funktion besitzen, den Transfer freier Kupfer-Ionen zu diesen Enzymen zu vereinfachen, was die Akkumulation von Metallothioneinen nach einer Verwundung erklären würde.

Der in der Genbank gefundene Klon für das Metallothionein-ähnliche Protein AMT2 wurde als erstes von REID und ROSS (1997) beschrieben. Sie beobachteten, dass das Gen im Fruchtgewebe dreier Apfelsorten mit fortschreitender Entwicklung akkumuliert und im Kühllager induziert wird. Sie stellten auch fest, dass die Expression mit dem Blattalter anstieg.

Metallothioneine könnten auch mit der Aktivität von Polyphenoloxidasen (PPOs) in Verbindung stehen (GARCÍA-HERNÁNDEZ et al. 1998). PPOs sind kupferhaltige Enzyme, welche die Hydroxylierung von Monophenolen zu *o*-Diphenolen und die Oxidierung von *o*-Diphenolen zu *o*-Quinonen katalysieren, und für das Verbräunen bei Früchten nach einer

Verletzung verantwortlich sind. Im Apfelblatt wird Phloridzin zu Phloretin deglycosyliert und weiter durch PPO-Aktivität hydroxyliert. Gerade in älteren Veröffentlichungen wird diese Quinonbildung gelegentlich mit der Schorfabwehr in Zusammenhang gebracht (NOVEROSKE et al. 1964, RAA 1974, HUNTER 1975). Hohe Konzentrationen an Metallothioneinen könnten dazu beitragen, den Kupferbedarf der PPOs zu decken.

PR-Proteine

In der schorfanfälligen Sorte Golden Delicious wurde 25 dpi ein Klon mit größter Homologie zu einem Thaumatin-ähnlichen Gen signifikant induziert (Tabelle 5). GAU et al. (2004) beobachteten eine hohe Expression eines Thaumatin-ähnlichen Proteins im Apoplasten *V. inaequalis* infizierter Blätter der anfälligen Apfelsorte Elstar und eine konstitutive Expression in nicht inokulierten Blättern der resistenten Sorte Remo. Nach MENU-BOUAOUICHE et al. (2003) besitzen Thaumatin-ähnliche Proteine in der Apfelfrucht eine endo- β -1,3-Glukanase-Aktivität und sind demnach in der Lage, pilzliche Zellwände abzubauen (STINTZI et al. 1993).

Ein 8 dpi in Rewena signifikant induzierter Klon wies höchste Homologie zu einem Osmotin-ähnlichen Gen auf (Tabelle 5). Osmotin zählt wie Thaumatin zu den PR-5 Proteinen. SELITRENNIKOFF (2001) berichtet, dass Osmotin Störungen in der Regulierung des Aufbaus pilzlicher Zellwände hervorruft, wodurch möglicherweise auch der Schorfpilz in seiner Entwicklung gehemmt werden könnte.

Die hohe konstitutive Expression eines Klons mit Homologie zu einem lipid transfer protein precursor (Tabelle 5) ist nicht überraschend. Lipidtransferproteine sind beteiligt an der Kutin-Bildung, an der Embryogenese, an Abwehrreaktionen gegen Phytopathogene, an Symbiosen und an der Anpassung von Pflanzen an verschiedene Umweltbedingungen und liegen in höheren Pflanzen in hoher Konzentration vor (bis zu 4 % der löslichen Proteine; KADER 1996). GARCÍA-OLMEDO et al. (1995) berichten, dass die Konzentrationen oftmals viel höher sind als für die Pathogenabwehr erforderlich und schlagen deshalb vor, dass Lipidtransferproteine Pflanzen mit einem *defensive-protein shield* ausstatten. GAU et al. (2004) stellten eine Abnahme eines Lipidtransferproteins während der ersten Woche nach einer *V. inaequalis*-Inokulation im Apoplasten der schorfanfälligen Sorte Elstar fest und schlugen vor, dass dieses Protein eine funktionelle Rolle in der Pathogenerkennung und in der pflanzlichen Abwehr spielt. Im vorliegenden Experiment konnte eine solche Abnahme nicht bestätigt werden.

Es wurde kein Klon gefunden, der zu allen Zeitpunkten eine starke Induktion aufwies oder sich beispielsweise durch eine ausschließliche starke Expression in einer der beiden Sorten auszeichnete. Dies weist unter anderem darauf hin, dass die Ergebnisse lediglich

Momentaufnahmen innerhalb eines sehr komplexen Systems mit schnellen *turnover*-Raten darstellen.

Bei der Auswertung der Ergebnisse muss zudem bedacht werden, dass die cDNA-Bank aus Blättern drei Wochen nach Inokulation hergestellt wurde und daher auf späte Pathogen-induzierte Klone angereichert war. Aus diesem Grund erlauben die Ergebnisse keine Aussage über die Expression von Genen, die ausschließlich zu einem frühen Zeitpunkt differentiell exprimiert sind.

Relative Quantifizierung mittels qRT-PCR

Das *housekeeping*-Gen Elongation factor 1 α war in den Proben des vorliegenden Versuchs konstant exprimiert (5.1.3), so dass auf das Testen weiterer möglicher Referenzgene verzichtet werden konnte.

Bei der Analyse der differentiellen Expression von Flavonoidgenen im Apfelblatt mittels qRT-PCR muss berücksichtigt werden, dass viele der Enzyme der Flavonoidbiosynthese von Genfamilien codiert werden (WINKEL-SHIRLEY 2002). In den qRT-PCR-Analysen wurde jeweils nur ein einziger Klon jeder Genfamilie untersucht. Allgemein wurden nur geringe Unterschiede zwischen *V. inaequalis* inokulierten und nicht inokulierten Blättern detektiert, wobei die größte Induktion für das *pal*-Gen 25 dpi in Golden Delicious ermittelt wurde (Tabelle 6). Dementsprechend wurde auch die höchste Konzentration an Hydroxyzimtsäuren 25 dpi in inokulierten Golden Delicious-Blättern ermittelt (Abbildung 13). Da 25 dpi der letzte Probenahmetermin war, wurde nicht untersucht, ob die 9-fache *pal*-Induktion eine Induktion der nachfolgenden Gene der Flavonoidbiosynthese (STICH et al. 1992) oder an Chlorogensäure und Flavanolen (MICHALEK et al. 2005) nach sich zog. Die PAL stellt als Schlüsselenzym der gesamten Phenylpropanoidbiosynthese allerdings auch Vorläufer für die Ligninbiosynthese bereit, so dass möglicherweise auch die hierfür relevanten Gene und Enzyme von der erhöhten *pal*-Genexpression beeinflusst wurden. Die beobachtete *pal*-Induktion passt sehr gut zu Studien auf Enzymebene von STRISSEL et al. (2005), in welchen die PAL als limitierender Faktor der Flavonoidbiosynthese in Apfel angesehen wird. MAYR et al. (1997) demonstrierten die Beteiligung der PAL bei der *V. inaequalis*-Resistenz des Apfels: Durch die Inhibierung des Enzyms in jungen Sprossen der schorffresistenten Apfelsorte Sir Prize (*Vf*-Resistenz) führte eine nachfolgende Inokulation zu starken Schorfläsionen.

6 Studien an unterschiedlich N-versorgten Folienhausbäumen

Mit den Erkenntnissen des vorangegangenen Versuchs wurden weitere Analysen mit Proben der künstlich *V. inaequalis* inokulierten Bäume aus dem Folienhaus durchgeführt. Um einen möglichst starken Schorfeffekt untersuchen zu können, wurden die beiden am stärksten befallenen Blattstadien Blatt 1 und 2 verwendet (3.1.1). Für zusätzliche N-Effekte wurden die beiden extremen N-Stufen N1 und N3 ausgewählt. Der *V. inaequalis*-Nachweis mittels qRT-PCR wurde bereits in Kapitel 3.1.2 beschrieben.

Die Genexpressionen dieses Versuchs wurden mit dem „Makroarray 2005“ (Tabelle 23) analysiert, der Pathogen-induzierte Klone aus den Genbanken „Golden Delicious“, „Rewena früh“ und „Rewena ontogenetisch“ enthielt.

6.1 Ergebnisse

6.1.1 Sequenzanalysen der cDNA-Klone der differentiellen Genbanken

Um einen Einblick in die differentiellen Genbanken zu erhalten, wurden von jeder auf LB_{Amp}-Festmedium ausplattierten cDNA-Bank 384 Bakterienkulturen zufällig ausgewählt. Nach Überführung der einzelnen Klone in eine Bakterienflüssigkultur, Amplifikation mittels PCR und Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte schließlich die Sequenzierung.

6.1.1.1 Genbank „Golden Delicious“

Die Genbank „Golden Delicious“ enthielt Klone, die als späte Reaktion auf den *V. inaequalis*-Befall induziert wurden. Unter den 384 sequenzierten Klonen befanden sich 263 Unigene. Innerhalb der redundanten Klone 15-mal und damit besonders häufig war ein Klon mit größter Homologie zu einem *tl*-Gen von *M. domestica*, das ein Thaumatin-ähnliches Protein codiert. Unter den Unigenen hatten 41,8 % keine signifikante Homologie zu bereits veröffentlichten Sequenzen und 24,7 % hatten eine unbekannte Funktion. 11,0 % der Unigene besaßen Homologie zu stress- und/oder abwehrbezogenen Genen. In der letztgenannten Gruppe wurden unter anderem folgende interessante Gene gefunden: chalcone synthase (*chs*; *Malus* sp.), putative flavanone 3-beta-hydroxylase (*A. thaliana*), putative flavonoid 3'-hydroxylase (*Callistephus chinensis*), beta 1-3 glucanase PR2 (*M. domestica*), endo-chitinase class III (*Pyrus pyrifolia*), thaumatin-like protein (*tl* gene; *M. domestica*), pathogenesis-related protein PR-6 type (*Sambucus nigra*), lipid transfer protein precursor (*Pisum sativum*), lipid transfer protein precursor (*M. domestica*) und metallothionein-like protein (AMT2; *M. domestica*). Trotz der Zugabe von *V. inaequalis* RNA zum Driver hatten in der Genbank „Golden Delicious“ 6,3 % aller Klone größte Homologie zu Sequenzen aus Pilzen. Viermal

und damit am häufigsten trat dabei ein Klon auf, der 57 % Aminosäuresequenzhomologie zu einem glucose-repressible gene von *M. grisea* aufwies. Die restlichen 16,2 % der Klone waren in erster Linie dem Primärstoffwechsel zuzuordnen.

6.1.1.2 Genbank „Rewena früh“

Die Genbank „Rewena früh“ war auf Klone angereichert, die in der resistenten Sorte zu einem frühen Zeitpunkt nach der *V. inaequalis*-Inokulation induziert werden. Unter den 384 sequenzierten Klonen befanden sich 314 Unigene, wobei kein Gen öfter als zweimal auftrat. 49,0 % der Gene waren ohne Sequenzhomologie und 27,4 % hatten eine unbekannte Funktion. 4,8 % der Unigene waren stress- und/oder abwehrbezogene Klone. Unter diesen potenziell abwehrrelevanten Klonen befanden sich unter anderem Gene mit folgenden Homologien: dihydroflavonol reductase (*dfr*; *M. domestica*), putative leucoanthocyanidin reductase (*lar1*; *M. domestica*), metallothionein-like protein (AMT2; *M. domestica*), DNAJ heat shock protein (At5g49580; *A. thaliana*), putative heat-shock protein 90 (*Euphorbia esula*) und putative heat shock protein (*A. thaliana*). Die restlichen 18,8 % der Klone ließen sich vor allem dem Primärstoffwechsel zuordnen.

6.1.1.3 Genbank „Rewena ontogenetisch“

Die Genbank „Rewena ontogenetisch“ enthielt Klone, die in der nicht inokulierten resistenten Sorte im Verlauf der Alterung exprimiert werden. Unter den 384 sequenzierten Klonen befanden sich 238 Unigene. Ein Gen, das für ein metallothionein-like protein AMT2 von *M. domestica* codierte, kam dabei in der Genbank 80-mal vor. Derselbe Klon wurde in der Genbank „Golden Delicious“ fünfmal und in der Genbank „Rewena früh“ einmal gefunden und machte auch in der Genbank „WILD 2004“ etwa ein Viertel der Unigene aus. 37,0 % der Unigene wiesen keine signifikante Sequenzhomologie auf und 27,3 % hatten unbekannte Funktion. 6,3 % der Unigene besaßen Homologie zu stress- und/oder abwehrtypischen Klonen. In der letztgenannten Gruppe wurden unter anderem Klone gefunden, die größte Homologie zu folgenden Sequenzen aufwiesen: chalcone isomerase (*chi-1*; *M. domestica*), dihydroflavonol 4-reductase (*P. communis* cultivar Conference), putative beta-1,3-glucanase (*A. thaliana*), major allergen and lipid transfer protein Mal d 3 (*M. domestica*), metallothionein-like protein (AMT2; *M. domestica*), metallothionein-like protein (MT2; *P. pyrifolia* strain Whangkeumbae), PPFU16 mRNA for metallothionein-like protein (*P. pyrifolia*), temperature stress-induced lipocalin (Tatil; *Triticum aestivum*) und heat shock protein HSP82 (*hsp82*) gene (*Zea mays*). Die übrigen cDNA-Klone waren überwiegend dem Primärstoffwechsel zuzuordnen.

6.1.2 Erstellung des „Makroarrays 2005“

Testhybridisierungen ergaben, dass die Klone der drei Genbanken größtenteils differentiell exprimiert waren. Für den „Makroarray 2005“ wurden 176 Klone – darunter die sieben zusätzlichen Flavonoidklone (FISCHER et al. 2006) – aufgrund ihrer Expressionsmuster und ihrer vermuteten biologischen Funktion für die Genexpressionsanalysen ausgewählt, wobei darauf geachtet wurde, aus allen drei Genbanken etwa gleich viele Klone zu berücksichtigen. Von den ausgewählten Unigenen besaßen 33 % Homologie zu Genen, die an Stress- und/oder Abwehrreaktionen beteiligt sind, 65 % codierten Gene des Primärstoffwechsels und 2 % waren Klone, die von Pathogenen stammten. Für nähere Informationen zur funktionellen Einteilung der Gene siehe Tabelle 7. Genauere Angaben zu diesen Genen sind außerdem der Tabelle 23 im Anhang zu entnehmen.

Tabelle 7 Funktionelle Einteilung der ausgewählten cDNA-Klone für den „Makroarray 2005“.

Vermutete Funktion	„Makroarray 2005“ [%]
Stress/Abwehr	33,3
Zellulärer Metabolismus	39,6
Transkription/Translation	7,9
Photosynthese/Chloroplast	8,5
Wachstum/Entwicklung	7,9
Phytohormonhaushalt	1,1
Pathogen-Herkunft	1,7

6.1.3 Genexpression

In den meisten Fällen traten mittelstarke bis starke Induktionen bzw. Repressionen (vgl. 5.1.2) pro Gen nur unter einer experimentellen Bedingung auf. Immerhin waren 5,4 % aller Klone zweimal und öfter mittelstark bis stark induziert und 1,7 % aller Klone mindestens zweimal mittelstark bis stark reprimiert. Unter den mehrmals mindestens mittelstark induzierten Klonen befanden sich überwiegend Klone mit Homologien zu stress- und/oder abwehrbezogenen Genen wie *pal*, *chs*, einer putative flavonoid 3'-hydroxylase (*C. chinensis*), einem Thaumatin-ähnlichen Gen (*M. domestica*), einem Metallothionein-ähnlichen Gen (*M. domestica*) oder einem blight-associated protein p12 precursor (*Citrus jambhiri*). Besonders auffallend war dabei eine viermalige mittelstarke Induktion des *chs*-Gens in Golden Delicious Blatt 2.

In *volcano plots* nach CUI und CHURCHILL (2003) sind sowohl die n-fachen Expressionsverhältnisse (beispielsweise inokulierte zu nicht inokulierten Blättern) als auch die p-Werte eines t-Tests dargestellt, wobei jeder Datenpunkt einem Gen entspricht. Klone

mit einer statistisch signifikant differentiellen Genexpression liegen dabei über einer horizontalen Linie mit dem entsprechenden Signifikanzniveau. Gene mit einer mindestens zweifachen (delogarithmierten) Expressionsänderung liegen außerhalb zweier vertikaler Linien.

Abbildung 18 stellt die Behandlungs-, Sorten-, N- und Alterseffekte des vorliegenden Experiments dar. Nicht inokulierte und inokulierte Blätter sowie unterschiedlich N-gedüngte Blätter verhielten sich hinsichtlich ihrer Genexpression jeweils ziemlich ähnlich. Auch zwischen den beiden Sorten gab es nach Bonferroni-Korrektur der p-Werte lediglich ein signifikant differentiell exprimiertes Gen. Dagegen gab es deutliche Unterschiede zwischen jüngeren und älteren Blättern. Auf einem α -Niveau von 0,05 gab es immerhin 24 Behandlungs-, 19 Sorten-, 31 N- und 75 Altersunterschiede. In den nachfolgenden Kapiteln wird näher auf die verschiedenen Effekte eingegangen.

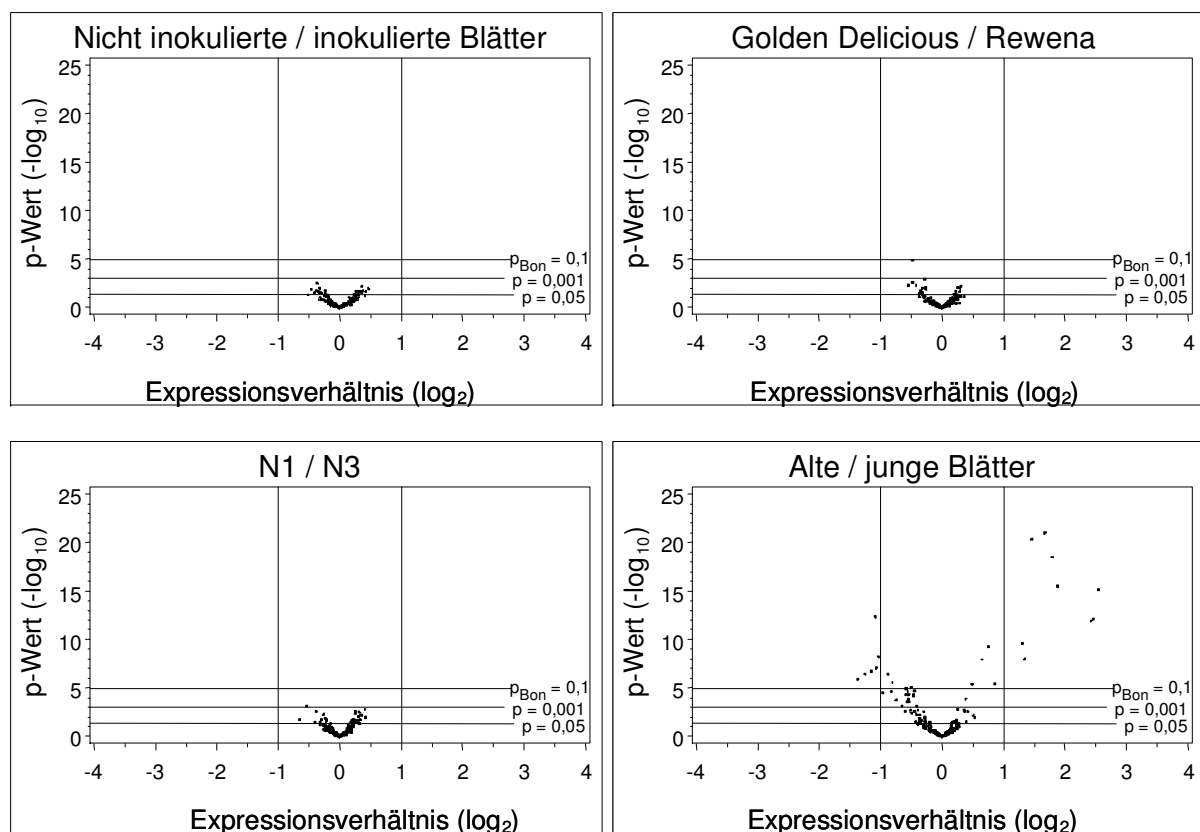


Abbildung 18 Volcano plots mit den negativen \log_{10} -transformierten p-Werten des t-Tests auf der y-Achse und den entsprechenden \log_2 -transformierten Induktionen auf der x-Achse. Werte oberhalb einer horizontalen Linie: signifikant auf dem jeweiligen Signifikanzniveau. Werte außerhalb der beiden vertikalen Linien: logarithmierte Induktion $\geq 1,0$ (entspricht einem delogarithmierten Induktionsfaktor von 2,0).

6.1.3.1 Behandlungsunterschiede

Zunächst wurde der Effekt der *V. inaequalis*-Inokulation auf die Genexpression untersucht. Nach der sehr konservativen Bonferroni-Adjustierung gab es keinen reinen Behandlungseffekt (Abbildung 18). Die Expressionsänderungen fielen zudem sehr niedrig aus. Am deutlichsten war der Unterschied bei einem Klon mit Homologie zu einem Pi starvation-induced Gen aus *Cicer arietinum*, wobei in den *V. inaequalis* inokulierten Blättern eine 1,3-fach stärkere Expression gemessen wurde. Die stärkste Expression in nicht inokulierten im Vergleich zu inokulierten Blättern wurde für einen Pektinesterase-homologen Klon (*Fragaria ananassa*) gemessen. Noch interessanter sind allerdings die Behandlungsunterschiede in den einzelnen Sorten (Tabelle 8), da auf diese Weise mögliche Kandidaten für Abwehr- und Resistenzgene in Golden Delicious und Rewena identifiziert werden können. Nach den beiden Sorten getrennt gab es auf einem versuchsbezogenem Niveau von $p_{\text{Bon}} < 0,1$ keinen signifikanten Behandlungsunterschied. Mit einer Einzel-Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,05 gab es in der Sorte Golden Delicious 20, in Rewena elf signifikante Effekte. In Tabelle 8 sind die Gene mit den größten inokulationsbedingten Effekten dargestellt. Während die Inokulation in Golden Delicious zu einer verstärkten Akkumulation eines Klons mit Homologie zu einem Hitzeschockgen aus *Z. mays* führte, wurde in Rewena ein Klon mit Homologie zu einem Spermidinsynthasegen aus *M. domestica* verstärkt exprimiert.

Tabelle 8 Signifikante Behandlungsunterschiede in den einzelnen Sorten ($p < 0,05$; GD nicht inokulierte Kontrolle (K): $n = 54$, GD Vi: $n = 84$, Re K: $n = 76$, Re Vi: $n = 68$). Expressionsverhältnis > 1 : stärkere Expression in inokulierten Blättern, < 1 : stärkere Expression in nicht inokulierten Blättern.

Homologie	Sorte	inokuliert/ nicht	
		inokuliert	p
Heat shock protein HSP82 (hsp82) gene, <i>Z. mays</i>	GD	1,6	0,0018
Pectinesterase, <i>F. ananassa</i>	GD	0,6	0,0011
Major allergen and lipid transfer protein Mal d 3 mRNA, <i>M. domestica</i>	GD	0,7	0,0048
mRNA for lipoxygenase (lox gene), <i>P. dulcis</i>	GD	0,7	0,0054
MdSPDS2a mRNA for spermidine synthase, <i>M. domestica</i>	Re	1,4	0,0023
Gene for cyclophilin, <i>P. vulgaris</i>	Re	0,6	0,0050
Quinone oxidoreductase-like protein, <i>A. thaliana</i>	Re	0,7	0,0052
NADP-specific isocitrate dehydrogenase, <i>L. albus</i>	Re	0,7	0,0137
Stearoyl-ACP desaturase, <i>J. curcas</i>	Re	0,8	0,0155

6.1.3.2 Sortenunterschiede

Auf einem Niveau von $p_{\text{Bon}} < 0,1$ wurde ein einziger signifikanter reiner Sortenunterschied ermittelt (Abbildung 18), und zwar für einen Klon mit größter Homologie zu einem im Photosystem I involvierten Gen aus *Nicotiana tabacum* mit 1,4-fach höherer Expression in Rewena im Vergleich zu Golden Delicious. Alle mit $p < 0,05$ signifikanten Gene sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9 Signifikante Sortenunterschiede ($p < 0,05$; GD: n = 138, Re: n = 144). Expressionsverhältnis > 1: stärkere Expression in Rewena-Blättern, < 1: stärkere Expression in Golden Delicious-Blättern.

Homologie	Re / GD	p
Photosystem I reaction center subunit X psaK mRNA, nuclear gene for chloroplast product, <i>N. tabacum</i>	1,4	<0,0001
Putative cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) mRNA, <i>M. domestica</i>	1,2	0,0011
Cytosolic ascorbate peroxidase (APX) mRNA, APX42 allele, <i>F. ananassa</i>	1,4	0,0024
Putative cysteine protease 1, <i>I. hollandica</i>	1,3	0,0046
Protein disulfide isomerase (PDI)-like protein 2, <i>C. melo</i>	1,5	0,0048
mRNA for rubisco-1,5-bisphosphate carboxylase, <i>Malus</i> (crab apple)	1,2	0,0085
mRNA for NAPH-dependent hydroxypyruvate reductase (EC 1.1.1.29), <i>C. sativus</i>	1,2	0,0097
Phosphoribulokinase mRNA, <i>M. crystallinum</i>	1,2	0,0124
Chaperonin precursor mRNA, chloroplast gene encod. chloroplast protein, <i>P. sativum</i>	1,3	0,0173
Clone P42-2 putative NADH-dependent hydroxypyruvate reductase mRNA, <i>G. max</i>	1,2	0,0255
psbP mRNA for 23kDa polypeptide of the oxygen-evolving complex of photosystem II, <i>C. sativus</i>	1,3	0,0344
mRNA for oxygen evolving enhancer protein 2, <i>B. gymnorhiza</i>	1,3	0,0350
Clone 19-6 cysteine proteinase mRNA, <i>M. domestica</i>	0,8	0,0070
Auxin-repressed protein like-protein mRNA, <i>M. domestica</i>	0,8	0,0081
MdSPDS2a mRNA for spermidine synthase, <i>M. domestica</i>	0,8	0,0102
Clone 12-1 small Ras-like GTP-binding protein, <i>M. domestica</i>	0,9	0,0206
Clone 21-6 methylcochlorine hydroxylase mRNA, <i>M. domestica</i>	0,8	0,0239
Annexin, <i>M. sativa</i>	0,9	0,0411
Transcription factor Myb1 mRNA, <i>M. xiaojinensis</i>	0,9	0,0467

Möglicherweise ist die Resistenz der Sorte Rewena durch eine konstitutiv hohe Expression abwehrrelevanter Gene geprägt. Um diesen Sachverhalt zu überprüfen, wurden die Genexpressionsunterschiede in nicht inokulierten Blättern der beiden Sorten analysiert. Auf einem Niveau von $p < 0,05$ gab es sieben Gene, die in Rewena stärker exprimiert waren als in Golden Delicious (Tabelle 10).

Tabelle 10 Signifikante Sortenunterschiede in nicht inokulierten Blättern ($p < 0,05$; GD K: $n = 54$, Re K: $n = 76$). Expressionsverhältnis > 1 : stärkere Expression in Rewena-Blättern, < 1 : stärkere Expression in Golden Delicious-Blättern.

Homologie	Re / GD	p
Photosystem I reaction center subunit X psaK mRNA, nuclear gene for chloroplast product, <i>N. tabacum</i>	1,4	0,0024
Putative cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) mRNA, <i>M. domestica</i>	1,3	0,0030
Cytosolic ascorbate peroxidase (APX) mRNA, APX42 allele, <i>F. ananassa</i>	1,4	0,0312
NADP-specific isocitrate dehydrogenase, <i>L. albus</i>	1,4	0,0373
Dehydration-responsive protein RD22 mRNA, <i>P. persica</i>	1,6	0,0401
psbP mRNA for 23kDa polypeptide of the oxygen-evolving complex of photosystem II, <i>C. sativus</i>	1,4	0,0422
mRNA for oxygen evolving enhancer protein 2, <i>B. gymnorhiza</i>	1,4	0,0443

6.1.3.3 N-Unterschiede

Im vorliegenden Experiment gab es keinen einzigen mit $p_{\text{Bon}} < 0,1$ signifikanten reinen N-Unterschied (Abbildung 18). Die größten und mit $p < 0,05$ signifikanten Effekte wurden für die in Tabelle 11 dargestellten Gene gemessen. In der N-Stufe N3 wurden insgesamt höhere Expressionen für Primärstoffwechselgene gefunden, in N1 für Abwehr- und Signaltransduktionsgene. Auch unter Einbeziehung der Sorten, der Behandlung und des Blattalters wurde kein signifikanter N-Effekt ermittelt. Es fiel aber auf, dass in Golden Delicious die Gene mit dem stärksten Unterschied eine höhere Expression in N1 aufwiesen, in Rewena jedoch in N3.

Tabelle 11 Signifikante N-Unterschiede ($p < 0,05$; N1: $n = 146$, N3: $n = 136$). Expressionsverhältnis > 1 : stärkere Expression in N1-Blättern, < 1 : stärkere Expression in N3-Blättern.

Homologie	N1 / N3	p
Zinc finger protein-like, <i>O. sativa</i> japonica cultivar-group	1,3	0,0014
McGRF15 mRNA for geraniol-responsible factor 15, <i>M. chamomilla</i>	1,2	0,0023
14-3-3-like protein mRNA, <i>E. esula</i>	1,2	0,0033
Putative beta-1,3-glucanase, <i>A. thaliana</i>	1,2	0,0041
Chalcone isomerase (CHI-1) mRNA, <i>M. domestica</i>	1,3	0,0060
14-3-3 protein homolog mRNA, <i>M. amurensis</i>	1,3	0,0068
Cell wall hydrolase, <i>H. orientalis</i>	1,2	0,0078
mRNA for nitrite reductase, <i>B. pendula</i>	0,7	0,0007
Chaperonin precursor mRNA, chloroplast gene encod. chloroplast protein, <i>P. sativum</i>	0,8	0,0027
Photosystem I reaction center subunit X psaK mRNA, nuclear gene for chloroplast product, <i>N. tabacum</i>	0,8	0,0056

6.1.3.4 Altersunterschiede

Im vorliegenden Experiment traten nach Bonferroni-Korrektur der p-Werte 23 reine Altersunterschiede auf (Abbildung 18), wobei zehnmal die höhere Expression bei jungen und 13-mal bei älteren Blättern gemessen wurde (Tabelle 12). Dabei fiel auf, dass viele Flavonoidgene in jungen Blättern signifikant stärker exprimiert waren als in älteren. Zwei Klone mit größter Homologie zu Metallothionein-Genen waren in älteren Blättern 5,9- bzw. 5,4-fach stärker exprimiert. Starke Effekte wurden auch bei zwei Klonen mit Homologie zu Proteasegenen beobachtet, die beide in älteren Blättern signifikant höher exprimiert waren als in jungen Blättern. Zwei Klone, die vermutlich mit dem Zellwandabbau in Zusammenhang stehen, wurden in älteren Blättern signifikant stärker exprimiert. Eine 5,5-fach stärkere Expression in älteren im Vergleich zu jungen Blättern wurde für einen Klon mit Homologie zu einem blight-associated-Gen ermittelt.

Zusätzlich zu den reinen Alterseffekten traten weitere 73 kombinierte Altersunterschiede auf, also nach Sorten, N-Stufen und Behandlung getrennt. Zwölf Effekte wurden dabei für inokulierte Blätter gefunden, zwölf für nicht inokulierte, zwölf in der Sorte Golden Delicious und 37 in Rewena.

Tabelle 12 Signifikante Altersunterschiede ($p_{\text{Bon}} < 0,1$; „jung“: $n = 202$, „alt“: $n = 80$). Expressionsverhältnis > 1 : stärkere Expression in alten Blättern, < 1 : stärkere Expression in jungen Blättern.

Homologie	alte / junge	
	Blätter	p
Putative cysteine protease 1, <i>I. hollandica</i>	3,2	<0,0001
Pectinesterase, <i>F. ananassa</i>	2,8	<0,0001
Putative 2-oxoglutarate-dependent oxygenase, <i>O. sativa</i> japonica cultivar-group	3,5	<0,0001
Putative aspartic protease, <i>I. batatas</i>	3,7	<0,0001
Metallothionein-like protein (MT2) mRNA, <i>P. pyrifolia</i> strain Whangkeumbae	5,9	<0,0001
Blight-associated protein p12 precursor, <i>C. jimbhiri</i>	5,5	<0,0001
Metallothionein-like protein (AMT2) mRNA, <i>M. domestica</i>	5,4	<0,0001
Cell wall invertase (INV) mRNA, <i>F. ananassa</i>	2,5	<0,0001
MdSPDS2a mRNA for spermidine synthase, <i>M. domestica</i>	1,7	<0,0001
Aminopeptidase like protein, <i>A. thaliana</i>	2,5	<0,0001
Plasma membrane localized protein protecting membranes from desiccation; stress induced; regulated by HOG and Ras-Pka pathways; Hsp12p, <i>S. cerevisiae</i>	1,6	<0,0001
Metal transport protein, <i>M. truncatula</i>	1,8	<0,0001
Ferric reductase-like transmembrane component family protein, <i>A. thaliana</i>	1,4	<0,0001
Ribosomal protein L12 mRNA, <i>P. armeniaca</i>	0,5	<0,0001
<i>ans</i> , <i>M. domestica</i>	0,5	<0,0001
Acyl-CoA-binding protein mRNA, <i>T. majus</i>	0,5	<0,0001
Dehydration-responsive protein RD22 mRNA, <i>P. persica</i>	0,4	<0,0001
<i>fls</i> , <i>M. domestica</i>	0,5	<0,0001

Homologie	alte / junge	
	Blätter	p
<i>pal, M. domestica</i>	0,4	<0,0001
<i>chs, M. domestica</i>	0,4	<0,0001
<i>fht, M. domestica</i>	0,6	<0,0001
Dihydroflavonol 4-reductase mRNA, <i>P. communis</i> cultivar Conference	0,7	<0,0001
BCL-2 binding anthanogene-1, <i>H. vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>	0,7	<0,0001

6.1.3.5 Expressionsanalysen der Flavonoidgene

Die Expression der Flavonoidgene *pal* und *chs* wurde zum einen in Makroarray- und zum anderen in qRT-PCR-Analysen ermittelt. In den qRT-PCR-Analysen stellte sich der Elongation factor 1 α – im Gegensatz zum kleineren Probenumfang des vorangegangenen Versuchs – nicht als optimale Referenz heraus, so dass zunächst ein *housekeeping*-Gen gefunden werden musste, das im gesamten Experiment konstant exprimiert war.

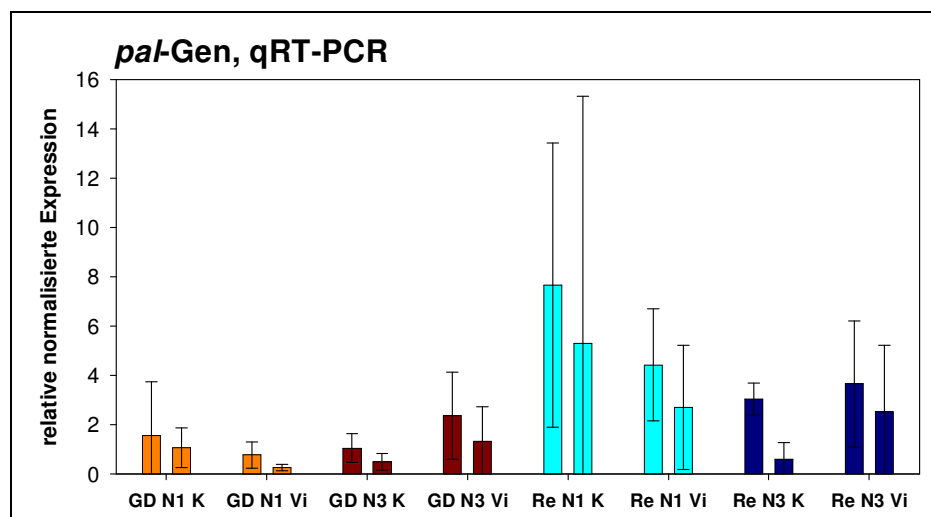
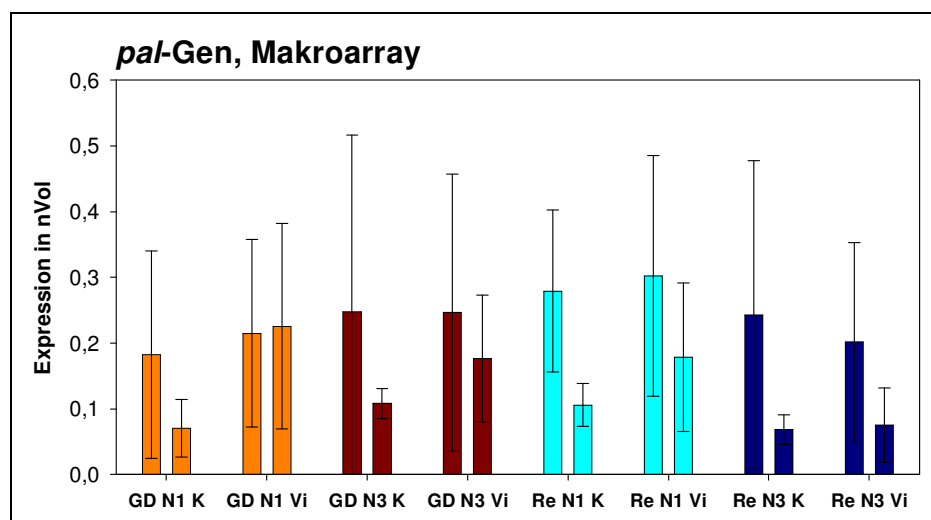
Überprüfung von *housekeeping*-Genen als interne Kontrollgene für qRT-PCR-Analysen

Getestet wurden folgende sechs *housekeeping*-Gene: β -Actin, Elongation factor 1 α , GAPDH, Rubisco, RNA Polymerase II und 18S ribosomale RNA. Keines der Gene erwies sich als absolut konstant exprimiert. Mithilfe der Software geNormTM (VANDESOMPELE et al. 2002) erfolgte ein Ranking der Referenzgene und die Bestimmung derjenigen Gene, die für eine Berechnung eines verlässlichen Normalisierungsfaktors nötig waren. In der Sorte Golden Delicious war die RNA Polymerase II das stabilste Gen, gefolgt von β -Actin, Elongation factor 1 α , GAPDH, Rubisco und 18S ribosomale RNA. Mithilfe der Software wurde ermittelt, dass in Golden Delicious lediglich die RNA Polymerase II sowie β -Actin in die Berechnung der jeweiligen Normalisierungsfaktoren mit einzubeziehen waren. Für die Sorte Rewena lautete die Reihenfolge der Gene bezüglich ihrer Stabilität: Elongation factor 1 α , Rubisco, β -Actin, 18S ribosomale RNA, RNA Polymerase II und GAPDH. Für die Berechnung der Normalisierungsfaktoren wurden die drei stabilsten Gene verwendet.

Quantifizierung der *pal*- und *chs*-Expression mittels Makroarray- und qRT-PCR-Analysen

Die mittels Makroarray- und qRT-PCR-Analysen gemessenen *pal*- und *chs*-Expressionen sind in Abbildung 19 dargestellt. Insgesamt wurden sehr hohe Schwankungen beobachtet. Dennoch wird mit beiden Methoden deutlich, dass die Expression beider Gene in älteren Blättern abnimmt. Zudem fällt eine sehr starke Koregulation des *pal*- und des *chs*-Gens auf (Korrelationskoeffizient Makroarray: 0,95; Korrelationskoeffizient qRT-PCR: 0,88). Der Korrelationskoeffizient zwischen den Ergebnissen der Makroarray- und der qRT-PCR-Analysen beträgt 0,35. Während mittels der Makroarray-Technologie keine Sorten-

unterschiede beobachtet wurden, war in den qRT-PCR-Analysen sowohl die *pal*- als auch die *chs*-Expression in Rewena deutlich höher als in Golden Delicious. Inokulierte und nicht inokulierte Blätter verhielten sich bezüglich der *pal*- und *chs*-Expressionen ähnlich, allerdings fiel in den Makroarrayanalysen eine inokulationsbedingte Geninduktion in alten Golden Delicious-Blättern auf. In den qRT-PCR-Analysen wurde eine *V. inaequalis*-bedingte Induktion in N3-Blättern beider Sorten beobachtet. Tendenziell wurden für Rewena in N1-Blättern höhere Expressionen ermittelt, während für Golden Delicious keine eindeutigen Aussagen bezüglich des N-Einflusses zu treffen sind.



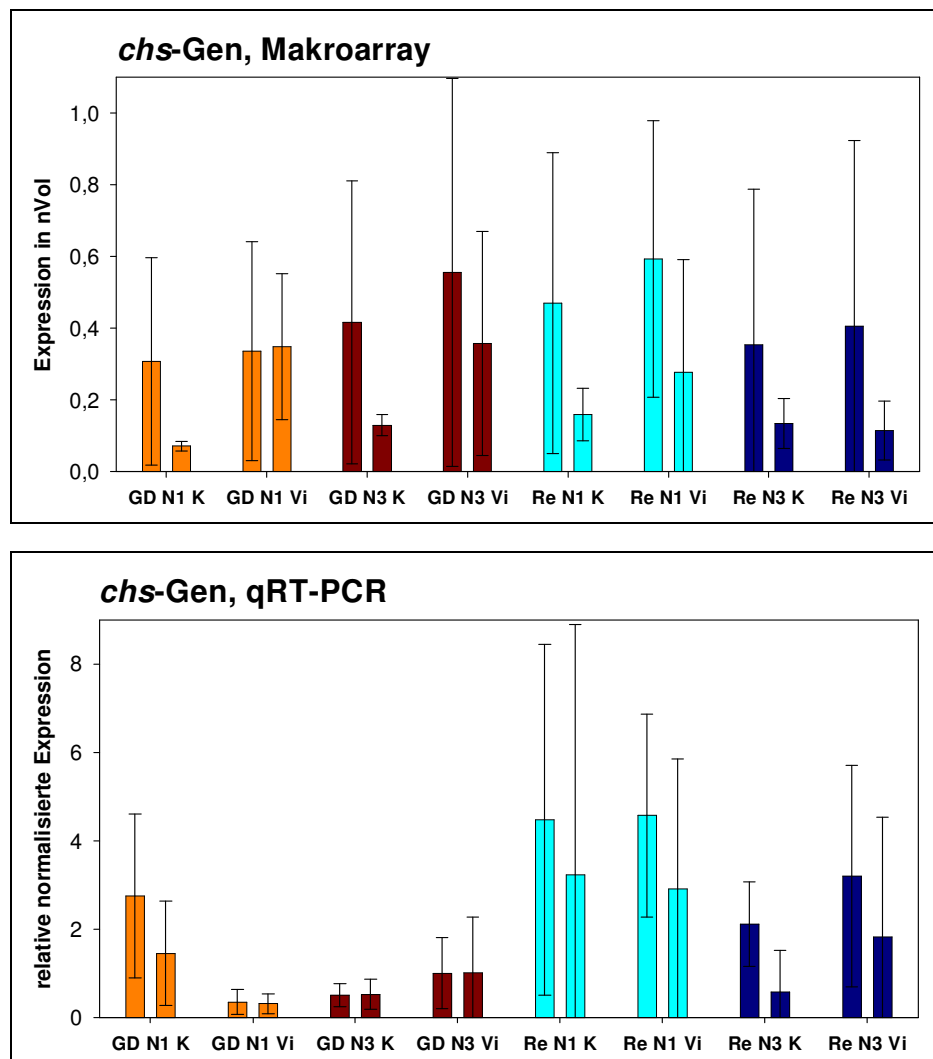


Abbildung 19 Mittels Makroarray- bzw. qRT-PCR-Analysen ermittelte *pal*- und *chs*-Expressionen in jungen (jeweils erste Säule) und älteren Blättern (jeweils zweite Säule) der Sorten Golden Delicious und Rewena mit (Vi) und ohne (K) *V. inaequalis*-Inokulation von N1- und N3-Folienhausbäumen.

6.1.3.6 Expressionsanalysen unterschiedlich stark infizierter Blätter

Des Weiteren wurden Genexpressionsanalysen der nach ihrem geschätzten infizierten Blattflächenanteil eingeteilten Golden Delicious-Proben des letzten Probenahmetermins durchgeführt, um Unterschiede zwischen schwach (0-20 % infizierte Blattfläche) und stark (40-80 % infizierte Blattfläche) befallenen Blättern zu ermitteln.

Infektionsunterschiede

Aufgrund der unterschiedlich starken Infektion zeigten 15 Gene eine mit $p_{\text{Bon}} < 0,1$ signifikant differentielle Expression (Tabelle 13) und weitere 79 Gene auf einem α -Niveau von 0,05. Insgesamt waren damit mehr als die Hälfte aller Gene mit $p < 0,05$ signifikant differentiell

exprimiert. Von den 15 hochsignifikanten Genen waren acht in stark infizierten Blättern höher exprimiert, sieben Gene in schwächer infizierten Blättern. Mit Faktoren von 6,7 und 5,6 waren Klone mit Homologien zu einem blight-associated-Gen sowie zu einem Metallothionein-ähnlichen Gen diejenigen Klone, die in stark infizierten Blättern zwar nicht mit der höchsten Signifikanz, aber mit den höchsten Expressionsänderungen stärker exprimiert waren als in schwächer infizierten Blättern. Darüberhinaus wurde ein weiterer vermutlich stress- und/oder abwehrbezogener Klon (lipid transfer protein precursor) in stark infizierten Blättern signifikant stärker exprimiert, und zwar mit einem Induktionsfaktor von 2,2.

Tabelle 13 Signifikante Infektionsunterschiede ($p_{Bon} < 0,1$; „schwach“: $n = 32$, „stark“: $n = 22$). Expressionsverhältnis > 1 : stärkere Expression in stark infizierten Blättern, < 1 : stärkere Expression in schwach infizierten Blättern.

Homologie	stark / schwach	
	infiziert	p
S6PDH mRNA for NADP-dependent D-sorbitol-6-phosphate dehydrogenase, <i>M. domestica</i>	2,7	<0,0001
Cell wall invertase (INV) mRNA, <i>F. ananassa</i>	2,5	<0,0001
Nonreversible glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, <i>A. graveolens</i>	2,2	<0,0001
Protein synthesis initiation factor 4G; EIF4G, <i>A. thaliana</i>	2,1	<0,0001
Auxin-repressed protein like-protein mRNA, <i>M. domestica</i>	1,9	0,0001
Blight-associated protein p12 precursor, <i>C. jambhiri</i>	6,7	0,0001
Lipid transfer protein precursor, <i>P. sativum</i>	2,2	0,0001
Metallothionein-like protein (AMT2) mRNA, <i>M. domestica</i>	5,6	0,0001
Carbonate dehydratase-like protein, <i>A. thaliana</i>	0,4	<0,0001
Protoporphyrinogen IX oxidase, <i>Z. mays</i>	0,6	<0,0001
Actin mRNA, <i>P. communis</i>	0,3	<0,0001
Acyl-CoA-binding protein mRNA, <i>T. majus</i>	0,4	<0,0001
mRNA binding protein precursor, nuclear gene encoding chloroplast protein, <i>L. esculentum</i>	0,4	<0,0001
Zinc finger protein-like, <i>O. sativa</i> (japonica cultivar-group)	0,7	0,0001
Putative leucoanthocyanidin reductase (LAR1) mRNA, <i>M. domestica</i>	0,6	0,0001

N-Unterschiede

Vier Gene zeigten mit $p_{Bon} < 0,1$ signifikante Expressionsunterschiede zwischen N1- und N3-Blättern, wobei jeweils in N1 die stärkere Expression ermittelt wurde (Tabelle 14). Weitere 60 Gene wiesen auf einem α -Niveau von 0,05 signifikante N-Unterschiede auf, wobei 27-mal die stärkere Expression in N1 und 33-mal in N3 gemessen wurde. Unter den 27 Klonen, die in N1 stärker exprimiert waren, befanden sich auch einige Flavonoidgene, und zwar *chi*, *dfr*, *fgt* und *fls*.

Tabelle 14 Signifikante N-Unterschiede ($p_{\text{Bon}} < 0,1$; N1: n = 28, N3: n = 26). Expressionsverhältnis > 1: stärkere Expression in N1-Blättern, < 1: stärkere Expression in N3-Blättern.

Homologie	N1 / N3	p
Protoporphyrinogen IX oxidase, <i>Z. mays</i>	1,6	<0,0001
Zinc finger protein-like, <i>O. sativa</i> (japonica cultivar-group)	1,4	0,0001
14-3-3 protein homolog mRNA, <i>M. amurensis</i>	1,6	0,0001
Carbonate dehydratase-like protein, <i>A. thaliana</i>	2,2	0,0001

Flavonoidgene

Abbildung 20 zeigt die mittels der Referenzgene normalisierten und auf den relativen Quantitäten beruhenden *pal*- und *chs*-Expressionen. Während sich Blätter der Düngestufen N1 und N3 bezüglich des *pal*-Transkripts recht ähnlich verhielten, wurden für den *chs*-Klon deutlich höhere Werte in N3 gemessen. Für beide Gene und N-Düngestufen, insbesondere aber in N3, wurden mit steigendem Schorfbefall abnehmende Genexpressionen gemessen.

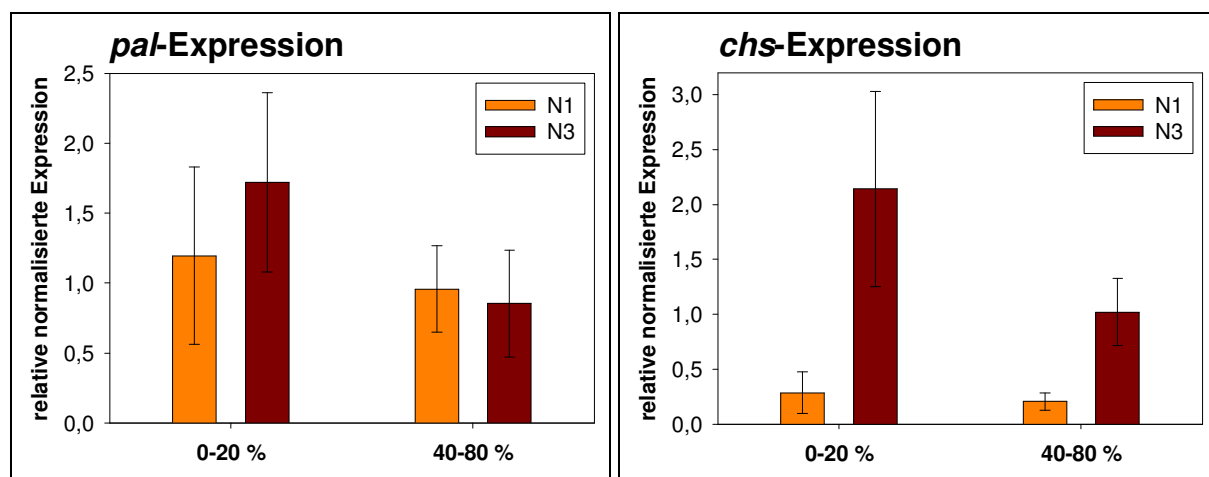


Abbildung 20 Mittels qRT-PCR ermittelte relative normalisierte Expressionen von *pal* und *chs* in schwach (0-20 %) und stark infizierten (40-80 %) N1- und N3-Folienhausbäumen von Golden Delicious.

6.1.4 Phenolische Inhaltsstoffe

Im Folgenden werden die mittels HPLC-Analysen quantifizierten Konzentrationen an phenolischen Inhaltsstoffen (siehe 5.1.4) für junge und ältere N1- und N3-Blätter von Folienhausbäumen der Sorten Golden Delicious und Rewena dargestellt. Für die Analysen wurde jeweils auf dieselbe Charge an gemörsertem Blattmaterial zurückgegriffen wie für die Genexpressionsstudien.

Hydroxyzimtsäuren

Golden Delicious wies bezüglich der Hydroxyzimtsäuren deutlich höhere Werte auf als Rewena (Abbildung 21). In der Regel wurden in jungen Blättern beider Sorten höhere Konzentrationen gemessen als in älteren Blättern. Die *V. inaequalis*-Inokulation führte in älteren Golden Delicious N1- und N3-Blättern zu einer Akkumulation an Hydroxyzimtsäuren. N1- und N3-Blätter verhielten sich recht ähnlich.

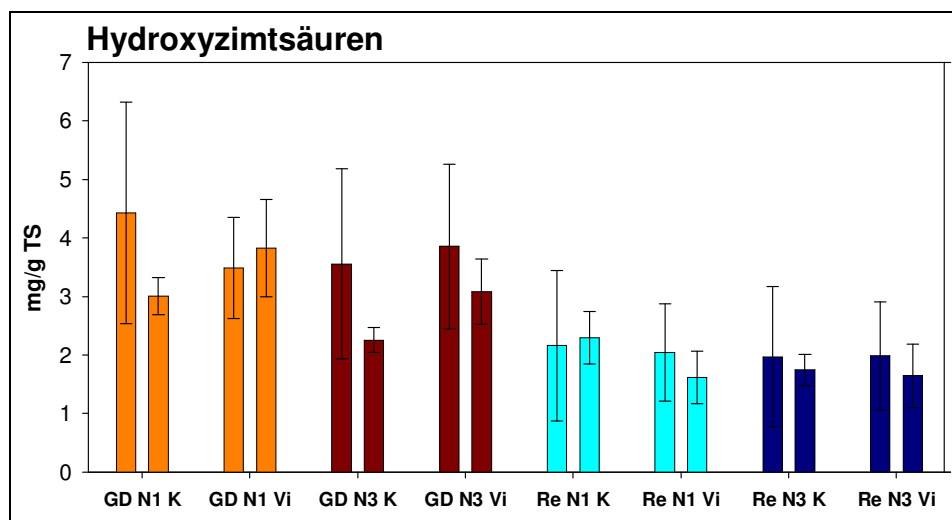


Abbildung 21 Konzentration an Hydroxyzimtsäuren [mg/g TS] in jungen (jeweils erste Säule) und älteren Blättern (jeweils zweite Säule) der Sorten Golden Delicious und Rewena mit (Vi) und ohne (K) *V. inaequalis*-Inokulation von Folienhausbäumen der N-Stufen N1 und N3.

Dihydrochalkone

Die „minor“ Dihydrochalkone (Abbildung 22) stellen die Dihydrochalkone ohne Phloridzin dar. In beiden Sorten wurde mit steigendem Blattalter eine Konzentrationszunahme ermittelt. In Rewena wurden in den stärker N-gedüngten Varianten höhere Konzentrationen an „minor“ Dihydrochalkonen gemessen. Allerdings wurden überall sehr große Standardabweichungen beobachtet.

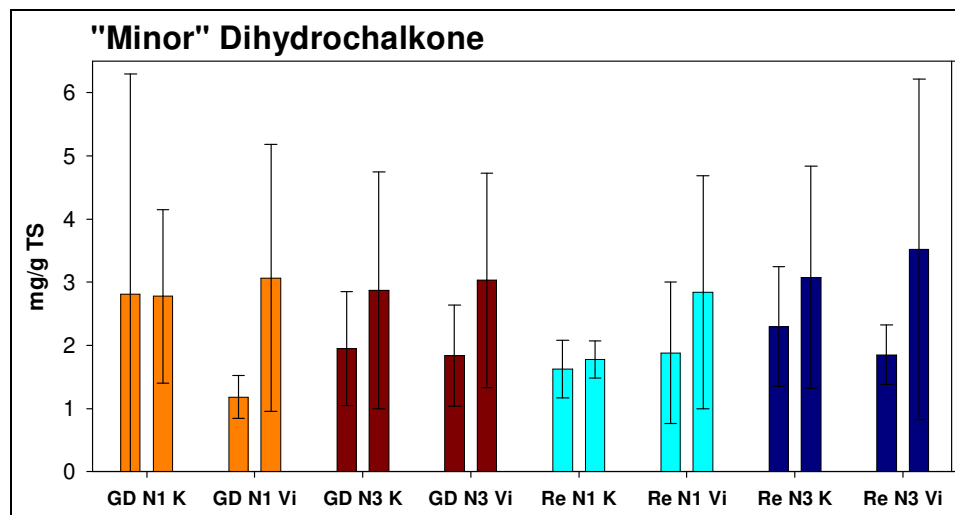


Abbildung 22 Konzentration an „minor“ Dihydrochalkonen [mg/g TS] in jungen (jeweils erste Säule) und älteren Blättern (jeweils zweite Säule) der Sorten Golden Delicious und Rewena mit (Vi) und ohne (K) *V. inaequalis*-Inokulation von Folienhausbäumen der N-Stufen N1 und N3.

Phloridzin

Als phenolische Hauptkomponente im Apfelblatt spiegelt der Phloridzingehalt (Abbildung 23) den Gesamtphenolgehalt wider. In beiden Sorten fand mit steigendem Blattalter eine Reduktion des Phloridzingehalts statt. Die Konzentrationen blieben unbeeinflusst von der *V. inaequalis*-Inokulation sowie der unterschiedlichen N-Düngung.

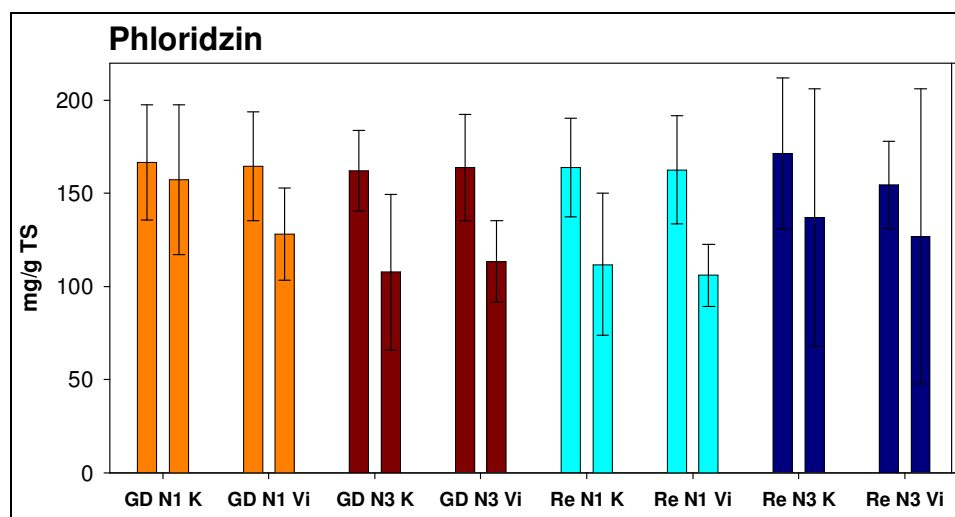


Abbildung 23 Konzentration an Phloridzin [mg/g TS] in jungen (jeweils erste Säule) und älteren Blättern (jeweils zweite Säule) der Sorten Golden Delicious und Rewena mit (Vi) und ohne (K) *V. inaequalis*-Inokulation von Folienhausbäumen der N-Stufen N1 und N3.

Flavonole

Die Flavonole (Abbildung 24) verhielten sich in beiden Sorten ähnlich, wobei jeweils in N1-leicht höhere Werte gemessen wurden als in N3-Blättern. Die *V. inaequalis*-Inokulation hatte keinen Effekt auf die Flavonolgehalte.

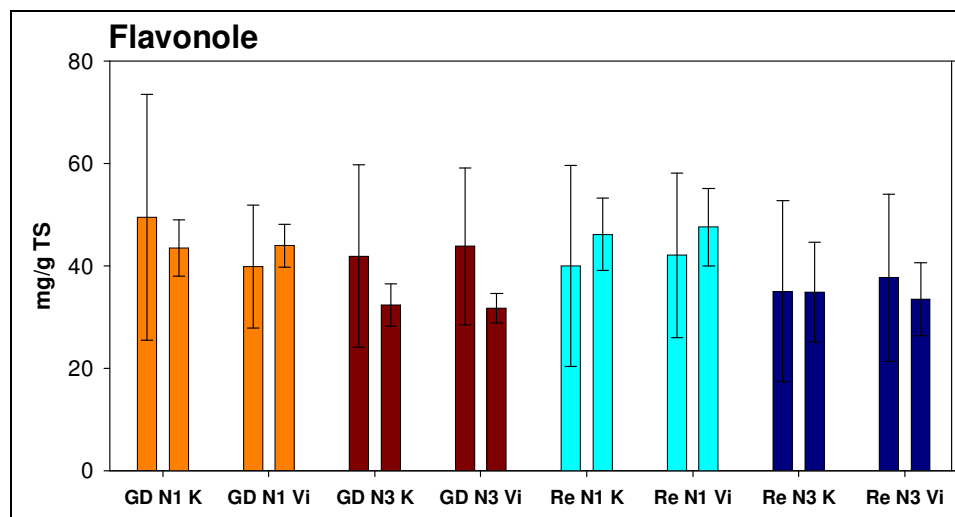


Abbildung 24 Konzentration an Flavonolen [mg/g TS] in jungen (jeweils erste Säule) und älteren Blättern (jeweils zweite Säule) der Sorten Golden Delicious und Rewena mit (Vi) und ohne (K) *V. inaequalis*-Inokulation von Folienhausbäumen der N-Stufen N1 und N3.

Flavanole

In Abbildung 25 sind die Konzentrationen an monomeren und oligomeren Flavanolen dargestellt. Steigendes N-Angebot führte zu einer verringerten Akkumulation an oligomeren Flavanolen und zu einer schwachen Reduktion an monomeren Flavanolen. Insbesondere in Rewena N1-Blättern nahm die Konzentration mit steigendem Blattalter zu. Die *V. inaequalis*-Inokulation führte in älteren Rewena N1-Blättern zu einer Reduktion sowohl der monomeren als auch der oligomeren Flavanole, wobei jedoch für die monomeren Flavanole in den nicht inokulierten Proben eine sehr starke Varianz beobachtet wurde. Bei den übrigen Varianten wurden für inokulierte und nicht inokulierte Blätter ähnliche Konzentrationen ermittelt.

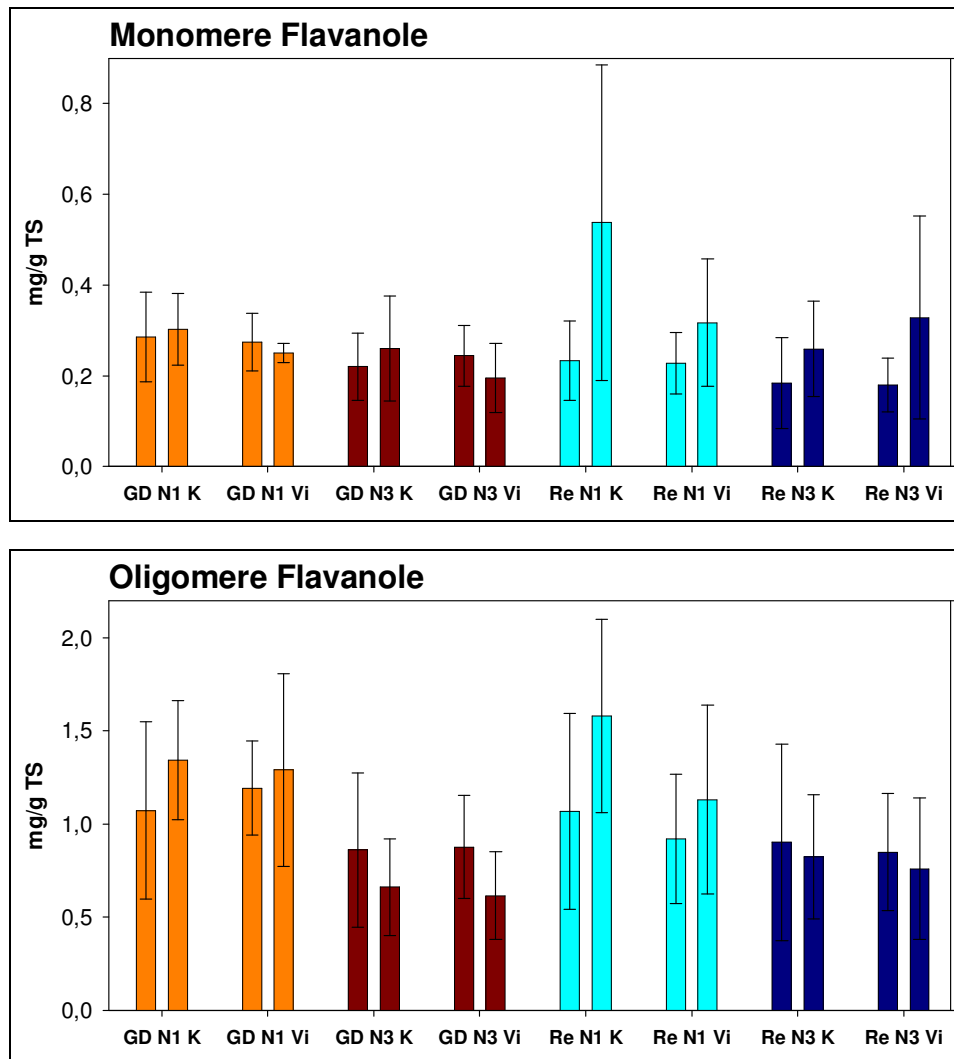


Abbildung 25 Konzentration an Flavanolen [mg/g TS] in jungen (jeweils erste Säule) und älteren Blättern (jeweils zweite Säule) der Sorten Golden Delicious und Rewena mit (Vi) und ohne (K) *V. inaequalis*-Inokulation von Folienhausbäumen der N-Stufen N1 und N3.

6.2 Diskussion

Zusammensetzung der Banken

Die subtraktiven cDNA-Banken bildeten eine hervorragende Grundlage für die Makroarrayanalysen. Die Erstellung der cDNA-Banken konnte daher als Erfolg gewertet werden. Das zahlreiche Auftreten von Klonen mit Homologie zu Flavonoidgenen (6.1.1) bestätigte deren Beteiligung an Stress- und Abwehrreaktionen.

Sehr auffällig war zudem – wie auch schon in der Genbank „WILD 2004“ – das gehäufte Auftreten eines Klons mit größter Homologie zu einem Metallothionein-ähnlichen Gen

AMT2 aus *M. domestica*, der in der Genbank „Rewena ontogenetisch“ 21 % aller sequenzierten Klone ausmachte (6.1.1.3).

In der Genbank „Golden Delicious“ hatten trotz Zugabe von *V. inaequalis* RNA zum Driver 6 % aller Klone größte Homologie zu Pilzgenen (6.1.1.1). Dies zeigt, dass die Subtraktion nicht vollständig war, bot in diesem Fall aber den Vorteil, auch einige Pilzgene mit auf den Filter zu spotten.

Behandlungsunterschiede

Insgesamt fielen die Unterschiede zwischen den Genexpressionen inokulierter und nicht inokulierter Blätter sehr gering aus (6.1.3.1).

Der stärkste Effekt zwischen inokulierten und nicht inokulierten Blättern in Golden Delicious wurde für einen Klon mit größter Homologie zu einem Hitzeschockgen aus *Z. mays* ermittelt. Hitzeschockgene werden relativ unspezifisch in vielen Pflanzenarten nach Einwirken verschiedenster Stressoren induziert.

Ein Klon mit Homologie zu einer MdSPDS2a mRNA for spermidine synthase (*M. domestica*) besaß in Rewena die höchste Signifikanz, wobei die höhere Expression in inokulierten Blättern ermittelt wurde. Interessanterweise war dies gleichzeitig derjenige Klon, der in Golden Delicious den geringsten Unterschied zwischen inokulierten und nicht inokulierten Blättern aufwies. Die Spermidinsynthase stellt eines der Schlüsselenzyme der Polyaminbiosynthese dar (BAGNI und TASSONI 2001). Laut KASUKABE et al. (2004) spielt das ubiquitär in Pflanzen, Tieren und Mikroorganismen vorkommende Spermidin neben Bereichen wie Wachstum und Reproduktion auch eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion nach Stress und führt dazu, dass Toleranzmechanismen ausgelöst werden. Struktur und Expression der betroffenen Spermidinsynthase wurden von ZHANG et al. (2003) untersucht. Die Autoren stellten fest, dass das Gen in jungen Blättern der Apfelsorte Orin stärker exprimiert war als in älteren Blättern. In der Frucht war das Transkriptlevel fast so hoch wie in jungen Blättern und blieb während der Reife auf diesem hohen Niveau.

Sortenunterschiede

Dasselbe Spermidinsynthase-Gen wurde zwar nicht signifikant, aber dennoch deutlich stärker in Golden Delicious als in Rewena exprimiert (6.1.3.2). Somit scheidet es als Kandidatengen für eine *V. inaequalis*-Resistenz der Apfelsorte Rewena aus.

Der einzige nach Bonferroni-Korrektur der p-Werte signifikante Sortenunterschied betraf einen Klon mit Homologie zu einem photosystem I reaction center subunit X psaK-Gen (*N. tabacum*) mit höherer Expression in Rewena. Auch mit einer Signifikanz von $p < 0,05$ waren einige Primärstoffwechselgene in Rewena stärker exprimiert als in Golden Delicious

(Tabelle 9). Dies bedeutet zum einen, dass die *V. inaequalis*-Infektion die Blätter der schorfanfälligen Sorte Golden Delicious deutlich in ihrer Photosyntheseleistung beeinträchtigte. Zum anderen wird deutlich, dass die Sorte Rewena stark in ihren Primärstoffwechsel investiert, obwohl sie resistent ist.

In Rewena wurde ein cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD)-Gen aus *M. domestica* verstärkt exprimiert. CAD katalysiert die NADPH-abhängige Reduktion von Cinnamylaldehyden (*p*-coumaryl, coniferyl und sinapyl) zu den entsprechenden Cinnamylalkoholen, aus welchen wiederum Lignine und Lignane gebildet werden (KUTSUKI et al. 1982). Lignin ist ein komplexes aromatisches Polymer, das der pflanzlichen Zellwand Stabilität verleiht. Lignifizierung pflanzlichen Gewebes spielt aber auch in Abwehrprozessen von Pflanzen gegenüber biotischen und abiotischen Stressoren eine wichtige Rolle. So tritt beispielsweise in den Zellen um eine Verwundung oder Infektionsstelle herum häufig eine Akkumulation von Lignin und Suberin auf (VANCE et al. 1980), was auf eine Aktivierung des Phenylpropanoidstoffwechsels zurückzuführen ist (HAHLBROCK und SCHEEL 1989). Bei einer derartigen Zellwandverstärkung spricht man häufig von *defense lignin* (HAWKINS und BOUDET 2003), welches das gesunde Gewebe vor Wasserverlust und Infektionen schützt. Bereits häufig wurden gesteigerte CAD-Enzymaktivitäten oder -Transkriptlevel infolge einer Elicitierung beispielsweise durch pilzliche Pathogene, Verwundung oder Ozon beobachtet (GRAND et al. 1987, GALLIANO et al. 1993, MITCHELL et al. 1994, COELHO et al. 2006).

N-Unterschiede

Die Tatsache, dass im Experiment mit $p_{\text{Bon}} < 0,1$ kein signifikanter N-Unterschied auftrat (6.1.3.3), liegt wohl an zu geringen Unterschieden in der N-Düngung, wie auch bereits die Wachstums (4.1)- und Boniturdaten (3.1.1) nahe legten. Dennoch wurden im vorliegenden Experiment sehr interessante Beobachtungen gemacht: Primärstoffwechselgene wurden in der luxuriös gedüngten N-Variante N3 stärker exprimiert als in N1, Klone mit Homologie zu Signaltransduktionsgenen wie zwei 14-3-3-Klone sowie zu Stress- und/oder Abwehrgenen (*chi*, PR-2 Gen) stärker in N1 als in N3. Dies bestätigt die Ergebnisse früherer Studien, in denen eine erhöhte N-Düngung zu anfälligeren Pflanzen führte (RÜHMANN et al. 2002, LESER und TREUTTER 2005). Zudem passt dieses Ergebnis zu den Wachstums- und *V. inaequalis*-Boniturdaten, nach denen die N1-Bäume ein leicht reduziertes Sprosswachstum aufwiesen und in der Sorte Golden Delicious etwas weniger schorfanfällig waren.

Altersunterschiede

Die Einteilung in junge und ältere Blätter hatte mit 23 reinen und 73 weiteren kombinierten Alterseffekten bezüglich der Genexpressionen den mit Abstand größten Effekt des Experiments (6.1.3.4).

Auffällig war, dass die Flavonoidgene *pal*, *chs*, *fht*, *dfr*, *fls* und *ans* in jüngeren Blättern signifikant stärker exprimiert waren als in älteren. Betrachtet man die Effekte nach den beiden Sorten getrennt, so wird deutlich, dass die Unterschiede durch die resistente Sorte Rewena bedingt sind: In Golden Delicious war kein einziger Flavonoidklon differentiell exprimiert. In Rewena dagegen waren *pal*, *fht*, *fls* und *ans* in jungen Blättern signifikant stärker exprimiert als in älteren. Dies bedeutet, dass in Rewena nach einem frühen Peak die Investitionen in den abwehrebeteiligten Flavonoidstoffwechsel reduziert werden, wohingegen sie in Golden Delicious aufrechterhalten werden, auch wenn dies nicht zu einer erfolgreichen Abwehr des Pilzes führt. Die schwächeren Expressionen der Flavonoidgene in älteren Rewena-Blättern spiegelten sich in einem niedrigeren Gesamtphenolgehalt wider (6.1.4).

Die signifikant höhere Expression zweier Klone mit Homologie zu Metallothionein-Genen in älteren Blättern stimmt mit früheren Ergebnissen von REID und ROSS (1997) überein, die ebenfalls zunehmende Expressionen mit steigendem Blattalter beobachteten.

Die ebenfalls in älteren Blättern signifikant höhere Expression zweier Gene, welche Proteasen, sowie zweier Gene, die zellwandabbauende Enzyme codieren, steht vermutlich mit der Seneszenz der Blätter in Zusammenhang.

Expressionsunterschiede unterschiedlich stark infizierter Blätter

In weiteren Analysen wurden verschieden stark *V. inaequalis* infizierte Golden Delicious-Proben untersucht (6.1.3.6). Dabei fiel auf, dass bei mehr als der Hälfte aller Gene ein mit $p < 0,05$ signifikanter Expressionsunterschied zwischen schwach und stark infizierten Blättern vorlag. Dies zeigt, wie stark die Auswirkungen eines Pathogenbefalls auf den Stoffwechsel einer Wirtspflanze sein können.

Nach einer starken Infektion in Apfelblättern wurden nicht nur Stress- und/oder Abwehrklone differentiell exprimiert, sondern beispielsweise auch Gene mit Beteiligung am Primärstoffwechsel. Allerdings lässt sich mit steigender Infektion keine einheitliche Reduktion von Primärstoffwechselgenen mit gleichzeitiger Induktion von Sekundärstoffwechselgenen beobachten, was auf die Komplexität einer pflanzlichen Abwehrreaktion hindeutet.

Über schwach und stark infizierte Blätter gemittelt zeigten vier Flavonoidgene auf einem Niveau von $\alpha = 0,05$ eine signifikant stärkere Expression in N1- als in N3-Blättern. Darüberhinaus wurden einige Klone mit Homologie zu Signaltransduktionsgenen sowie weiteren Stress- und/oder Abwehrgenen in N1 signifikant stärker exprimiert.

Relative Quantifizierung mittels qRT-PCR

Obwohl die qRT-PCR sich aufgrund ihrer hohen Sensitivität, Spezifität und Genauigkeit in den letzten Jahren zur Standardmethode für Expressionsanalysen einzelner Gene entwickelt hat, gibt es nach wie vor viele Probleme insbesondere bei der Durchführung der Messungen sowie bei der Datenvalidierung und -verarbeitung (VANDESOMPELE et al. 2007). Dem eindeutigen Vorteil der präzisen Erfassung der amplifizierten Nukleinsäuren steht das Problem variierender Ausgangstemplatemengen in verschiedenen Proben gegenüber. Zur Normalisierung der Daten gibt es mehrere Methoden. Neben der exakten Quantifizierung und Qualitätskontrolle der Template-RNA ist in diesem Zusammenhang die Verwendung von Referenzgenen besonders wichtig. Zu den am häufigsten verwendeten auch als *housekeeping*-Gene bezeichneten Referenzgenen zählen β -Actin, GAPDH, Hypoxanthin-guanin phosphoribosyl transferase und 18S ribosomale RNA (HUGGETT et al. 2005). Im Jahr 1999 wurde in über 90 % der in *high impact*-Journalen veröffentlichten Expressionsanalysen nur jeweils ein Referenzgen verwendet (SUZUKI et al. 2000). Diese klassischen *housekeeping*-Gene wurden über viele Jahre hinweg als Referenzen beispielsweise in Northern Blots verwendet, wo sie aufgrund ihrer meist hohen Expression in allen Zellen ideale positive Kontrollen waren. Im Zeitalter der qRT-PCR allerdings hätten diese typischen Referenzgene erneut überprüft werden müssen. Da eine solche Evaluierung allerdings nie stattfand, werden diese Gene weiter in qRT-PCR-Analysen verwendet, oftmals ohne Erwähnung eines Validierungsprozesses (HUGGETT et al. 2005). In neueren Studien wurde nachgewiesen, dass auch klassische *housekeeping*-Gene enorm schwanken können (THELLIN et al. 1999, STÜRZENBAUM und KILLE 2001, RADONIĆ et al. 2004). Neue Ansätze schlagen aufgrund all dieser Probleme vor, mehrere Referenzgene zu verwenden, um verlässlichere Daten zu produzieren (HELLEMANS et al. 2007).

Auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden mehrere *housekeeping*-Gene für einen Einsatz als Referenzgen getestet (6.1.3.5). Keines der Gene erwies sich als absolut konstant exprimiert. Durch die Verwendung mehrerer verhältnismäßig stabiler Referenzgene wurde jedoch eine maximal mögliche Genauigkeit der Daten erreicht.

Vergleich der qRT-PCR und Makroarrayergebnisse mit Phenolkonzentrationen

Die in den Arraystudien beobachtete Abnahme der *pal*- und *chs*-Genexpression in älteren Blättern wurde in den qRT-PCR-Analysen bestätigt. Mittels qRT-PCR-Analysen schien die Genexpression in Rewena deutlich höher als in Golden Delicious, was in den Makroarrays allerdings nicht auffiel.

Oft werden qRT-PCR-Analysen durchgeführt, um Mikro- oder Makroarrayergebnisse zu validieren. Meist spricht man dabei von einer Verifizierung der Ergebnisse, wenn die ermittelten n-fachen Expressionsverhältnisse mit beiden Methoden $\geq 2,0$ sind (RAJEEVAN et

al. 2001). Betrachtet man die mittels Makroarray detektierten Induktionen, stellt man fest, dass lediglich in alten Golden Delicious-Blättern eine *V. inaequalis*-bedingte Geninduktion auftrat. Niedrige Induktionen wirken sich nach CZECHOWSKI et al. (2004) und DALLAS et al. (2005) negativ auf das Validierungsergebnis durch die qRT-PCR-Analysen aus. Für eine noch bessere Übereinstimmung der Daten hätten demnach Gene mit starker Induktion und gleichzeitiger hoher Signifikanz und nicht wie im vorliegenden Fall lediglich anhand ihrer Funktion ausgewählt werden müssen. Zudem muss berücksichtigt werden, dass in den qRT-PCR-Analysen kurze Genfragmente amplifiziert wurden, während mittels der Arrays die Expressionen längerer Sequenzen untersucht wurden. Auch dies kann durch verschiedene Bindungsspezifitäten zu Expressionsunterschieden führen. Des Weiteren ist natürlich der Einfluss der verschiedenen Normalisierungsmethoden nicht zu vernachlässigen.

Nach YUEN et al. (2002) und DALLAS et al. (2005) sind die in qRT-PCR-Analysen ermittelten Induktionen aufgrund der höheren Sensitivität oftmals höher als jene aus Arraystudien. Dies konnte in den eigenen Studien zur *pal*- und *chs*-Genexpression nicht bestätigt werden.

Die in älteren Blättern beobachtete Abnahme der *pal*- und *chs*-Expression konnte auf Endproduktebene nachvollzogen werden: Sowohl die Konzentrationen an Hydroxycinnamsäuren, die als erste Gruppe innerhalb der Flavonoidbiosynthese gebildet werden und daher eng mit der PAL in Verbindung stehen, als auch an Phloridzin und damit gleichzeitig des Gesamtphenolgehalts nahmen ebenfalls in älteren Blättern deutlich ab.

Untersuchungen an den unterschiedlich stark *V. inaequalis* infizierten Golden Delicious-Proben des Termins 25 dpi (6.1.3.6) zeigten, dass die *pal*- und *chs*-Expressionen mit steigender Infektion tendenziell abnahmen. Dies widerspricht früheren Studien auf Inhaltsstoffebene, bei denen in *V. inaequalis* inokulierten Blättern höhere Phenolgehalte ermittelt wurden (TREUTTER und FEUCHT 1990, PICINELLI et al. 1995, MAYR et al. 1997) und ist damit ein weiterer Hinweis dafür, dass die Flavonoidbiosynthese nicht allein auf Transkriptebene reguliert wird. Die stark infizierten Blätter waren im vorliegenden Experiment möglicherweise bereits zu stark befallen, als dass die Pflanzen noch Abwehrstoffe bereitstellen hätten können. Dies macht deutlich, wie wichtig auch die Stärke des Elicitors für die Resistenz- oder Abwehrmechanismen ist.

7 Studien an Freilandbäumen

Im letzten Experiment wurden natürlich inokulierte Blattproben aus dem Freiland untersucht. Durch den enormen Schorfbefall (3.1.2) wurden deutliche *V. inaequalis*-Effekte erwartet. Wie im vorangegangenen Experiment wurden die Proben der N-Stufen N1 und N3 untersucht. Zusätzlich zum Blatt 1 und 2 wurden die Analysen auch am Blatt 4 durchgeführt, das etwa eine Woche älter ist als Blatt 1, so dass die Probenahme auch in diesem Experiment eine große Zeitspanne abdeckt.

Die Genexpressionen dieses Versuchs wurden mit dem „Makroarray 2005“ (Tabelle 23) analysiert, der Klone aus den Genbanken „Golden Delicious“, „Rewena früh“ und „Rewena ontogenetisch“ enthielt (6.1.1 und 6.1.2) und somit auf *V. inaequalis* induzierte Gene angereichert war.

7.1 Ergebnisse

7.1.1 Genexpression

Die folgenden *volcano plots* (Abbildung 26) stellen die Sorten-, N- und Alterseffekte des Freilandexperiments dar. Es wird deutlich, dass die mit Abstand stärksten Effekte altersbedingt sind. Nach Bonferroni-Korrektur der p-Werte waren 48 Gene zwischen jungen und älteren Blättern differentiell exprimiert, neun Gene zwischen den beiden Sorten und gar keines zwischen den beiden N-Stufen. Auf einem α -Niveau von 0,05 gab es immerhin 80 Sorten-, 27 N- und 117 Altersunterschiede. In den nachfolgenden Kapiteln wird näher auf die verschiedenen Effekte eingegangen.

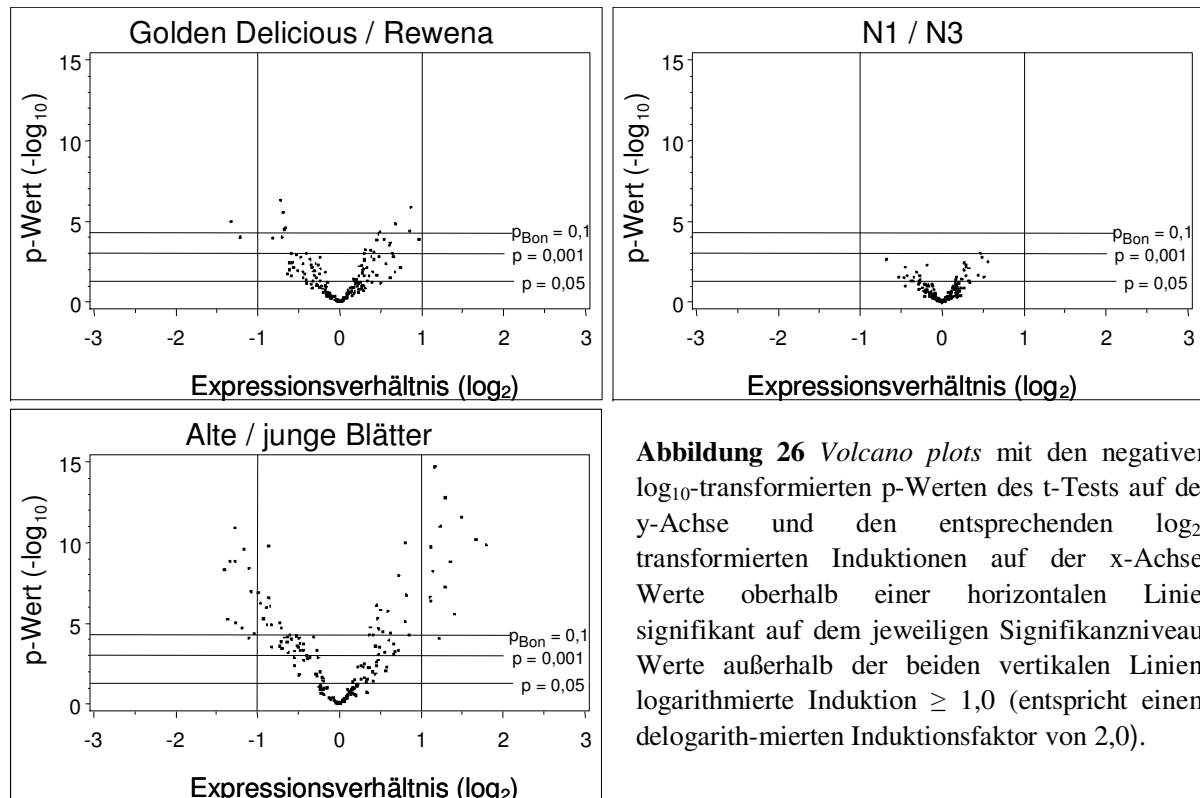


Abbildung 26 Volcano plots mit den negativen \log_{10} -transformierten p-Werten des t-Tests auf der y-Achse und den entsprechenden \log_2 -transformierten Induktionen auf der x-Achse. Werte oberhalb einer horizontalen Linie: signifikant auf dem jeweiligen Signifikanzniveau. Werte außerhalb der beiden vertikalen Linien: logarithmierte Induktion $\geq 1,0$ (entspricht einem delogarithmierten Induktionsfaktor von 2,0).

7.1.1.1 Sortenunterschiede

Insgesamt lag bei neun der untersuchten 184 Gene ein mit $p_{\text{Bon}} < 0,1$ signifikanter reiner Sortenunterschied vor. Dreimal trat dabei die höhere Expression in Golden Delicious auf, sechsmal in Rewena (Tabelle 15). Diejenigen Gene, die in Rewena signifikant stärker exprimiert waren als in Golden Delicious, sind alle dem Primärstoffwechsel zuzuordnen. Unter denjenigen Genen, die an der Abwehr beteiligt sind, waren Klone mit größter Homologie zu einem cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD)-Gen und ein Avr9/Cf-9 rapidly elicited Gen (*N. tabacum*) am deutlichsten stärker in Rewena als in Golden Delicious exprimiert ($p < 0,05$; nicht dargestellt).

Nach N-Stufen und Blattalter getrennt gab es 56 signifikante Sortenunterschiede mit $p_{\text{Bon}} < 0,1$, von denen 46 in N1- und zehn in jungen Blättern auftraten. In N3- und in älteren Blättern wurde dagegen kein einziger signifikanter Expressionsunterschied detektiert. In N1 waren 24 Gene in Rewena signifikant stärker exprimiert als in Golden Delicious, 22 Gene waren in Golden Delicious stärker exprimiert. Von den zehn signifikant unterschiedlichen Expressionen in jungen Blättern wurde siebenmal die höhere Expression in Golden Delicious und dreimal in Rewena beobachtet. In Rewena waren dabei wiederum Klone mit größter Homologie zu Primärstoffwechselgenen stärker exprimiert, in Golden Delicious waren auch stress- und/oder abwehrbezogene Gene stärker exprimiert, beispielsweise *fgt* (1,5-fach

stärkere Expression), ein PR-6 Gen (1,7-fach stärkere Expression) oder ein lipid transfer protein precursor (2,0-fach stärkere Expression).

Tabelle 15 Signifikante Sortenunterschiede ($p_{\text{Bon}} < 0,1$; GD: $n = 106$, Re: $n = 106$). Expressionsverhältnis > 1 : stärkere Expression in Rewena-Blättern, < 1 : stärkere Expression in Golden Delicious-Blättern.

Homologie	Re / GD	p
mRNA for NAPH-dependent hydroxypyruvate reductase (EC1.1.1.29), <i>C. sativus</i>	1,6	<0,0001
Chloroplast oxygen-evolving enhancer protein, <i>M. esculenta</i>	1,6	<0,0001
mRNA for nitrite reductase, <i>B. pendula</i>	2,5	<0,0001
mRNA for pathogenesis-related protein PR-6 type, <i>S. nigra</i>	0,6	<0,0001
Polypeptide precursor of photosystem II (PP1) mRNA, <i>P. pyrifolia</i> strain Whangkeumbae	1,6	<0,0001
psbP mRNA for 23kDa polypeptide of the oxygen-evolving complex of photosystem II, <i>C. sativus</i>	1,6	<0,0001
Photosystem I reaction center subunit X psaK mRNA, nuclear gene for chloroplast product, <i>N. tabacum</i>	1,6	<0,0001
Putative NifU protein mRNA, <i>P. armeniaca</i>	0,6	<0,0001
Adenosine 5'-phosphosulfate reductase, <i>G. max</i>	0,7	<0,0001

7.1.1.2 N-Unterschiede

Nach der konservativen Bonferroni-Korrektur der p-Werte gab es kein Gen, bei dem über die Sorten, Behandlungen und Blattalter gemittelt signifikante N-Unterschiede auftraten. Die größten und mit $p < 0,05$ signifikanten Effekte wurden für die in Tabelle 16 dargestellten Gene ermittelt. Auffällig war dabei, dass relativ viele Klone mit größter Homologie zu Stress- und/oder Abwehrgenen aufgrund der N-Düngung differentiell exprimiert waren. Während einige dieser Gene in N1 stärker exprimiert waren (beispielsweise PR-6, PR-10, *dfr*), wurde für andere eine stärkere Expression in N3 gemessen (beispielsweise PR-2, PR-5, Metallothionein).

Mit $p_{\text{Bon}} < 0,1$ gab es nach Sorten getrennt 16 signifikante N-Unterschiede in Golden Delicious und einen in Rewena. Während in Rewena ein *dfr*-Klon in N3 signifikant stärker exprimiert war als in N1, wurden in Golden Delicious stress- und/oder abwehrbezogene Klone teilweise in N1- und teilweise in N3-Blättern stärker exprimiert: So wurden Klone mit größter Homologie zu einem putative *relA/spoT* homologous protein RSH2 1,8-fach, einem PR-6 Gen 2,1-fach und einem *fgt*-Klon 1,6-fach stärker in N1 exprimiert, Klone mit Homologie zu einem Metallothionein-ähnlichen Gen 2,7-fach und einem blight-associated-Gen 2,5-fach stärker in N3 exprimiert.

Tabelle 16 Signifikante N-Unterschiede ($p < 0,05$; N1: $n = 104$, N3: $n = 108$). Expressionsverhältnis > 1 : stärkere Expression in N1-Blättern, < 1 : stärkere Expression in N3-Blättern.

Homologie	N1 / N3	p
mRNA for pathogenesis-related protein PR-6 type, <i>S. nigra</i>	1,4	0,0009
Clone 21-6 methylcochlorine hydroxylase mRNA, <i>M. domestica</i>	1,4	0,0017
Putative NifU protein mRNA, <i>P. armeniaca</i>	1,5	0,0030
Clone 12-1 small Ras-like GTP-binding protein, <i>M. domestica</i>	1,2	0,0037
Lemir, <i>L. esculentum</i>	1,2	0,0047
Putative relA/spoT homologous protein RSH2, <i>O. sativa</i> (japonica cultivar group)	1,2	0,0068
Chaperonin precursor mRNA, chloroplast gene encod. chloroplast protein, <i>P. sativum</i>	1,3	0,0078
Dihydroflavonol 4-reductase mRNA, <i>P. communis</i> cultivar Conference	1,2	0,0103
Lipid transfer protein precursor, <i>M. domestica</i>	1,4	0,0192
Metallothionein-like protein (AMT2) mRNA, <i>M. domestica</i>	0,6	0,0021
Putative beta-1,3-glucanase, <i>A. thaliana</i>	0,9	0,0050
Thaumatococin-like protein precursor Mdt11 (MDTL1) mRNA, <i>M. domestica</i>	0,7	0,0068
mRNA for NAPH-dependent hydroxypyruvate reductase (EC 1.1.1.29), <i>C. sativus</i>	0,8	0,0138

7.1.1.3 Altersunterschiede

In weiteren Mittelwertvergleichen wurden Alterseffekte untersucht. Über die Sorten und N-Stufen gemittelt traten nach Bonferroni-Korrektur der p-Werte 48 signifikante Altersunterschiede auf, wobei 25-mal höhere Transkriptgehalte in den älteren Blättern beobachtet wurden und 23-mal in den jungen Blättern (Tabelle 17). Unter den in älteren Blättern stärker exprimierten Genen befanden sich viele Stress- und/oder Abwehrgene. Nach Sorten getrennt gab es 41 signifikante Altersunterschiede, darunter 15 in Golden Delicious (neunmal stärkere Expression in jungen, sechsmal stärkere Expression in älteren Blättern) und 26 in Rewena (zehnmal stärkere Expression in jungen, 16-mal in älteren Blättern). Innerhalb den sortenspezifischen Altersunterschiede gab es acht Gene, die in beiden Sorten signifikante Effekte zeigten, wobei diese jeweils einheitlich in jungen oder älteren Blättern stärker exprimiert waren und größte Homologie zu folgenden Sequenzen aufweisen: lipid transfer protein precursor (*P. sativum*), aspartic protease (*Ipomea batatas*), calcium-binding EF hand family Gen, S6PDH mRNA for NADP-dependent D-sorbitol-6-phosphate dehydrogenase, zwei Thaumatococin-ähnliche Klone, NAD-dependent sorbitol dehydrogenase 2 Gen (alle *M. domestica*), flavonoid 3'-hydroxylase (*C. chinensis*), omega-3 desaturase (*Vernicia fordii*), mRNA for putative photosystem I reaction centre subunit IV (*Populus euramericana*), Metallothionein-ähnlicher Klon (MT2; *P. pyrifolia*) und heat-shock protein 90 (*E. esula*).

Tabelle 17 Signifikante Altersunterschiede ($p_{\text{Bon}} < 0,1$; „jung“: $n = 114$, „alt“: $n = 98$). Expressionsverhältnis > 1 : stärkere Expression in alten Blättern, < 1 : stärkere Expression in jungen Blättern.

Homologie	alte / junge	
	Blätter	p
Lipid transfer protein precursor, <i>P. sativum</i>	2,2	<0,0001
S6PDH mRNA for NADP-dependent D-sorbitol-6-phosphate dehydrogenase, <i>M. domestica</i>	2,5	<0,0001
Putative aspartic protease, <i>I. batatas</i>	2,8	<0,0001
mRNA for thaumatin-like protein (tl gene), <i>M. domestica</i>	2,4	<0,0001
Metallothionein-like protein (AMT2) mRNA, <i>M. domestica</i>	3,2	<0,0001
Putative cysteine protease 1, <i>I. hollandica</i>	1,8	<0,0001
Metallothionein-like protein (MT2) mRNA, <i>P. pyrifolia</i> strain Whangkeumbae	3,5	<0,0001
Putative flavonoid 3'-hydroxylase, <i>C. chinensis</i>	2,2	<0,0001
mRNA for putative photosystem I reaction centre subunit IV (psa gene), <i>P. euramericana</i>	2,6	<0,0001
Thaumatine-like protein (PR-5a) mRNA, <i>M. domestica</i>	2,2	<0,0001
Pectinesterase, <i>F. ananassa</i>	1,7	<0,0001
Blight-associated protein p12 precursor, <i>C. jambhiri</i>	2,5	<0,0001
Gene encoding methionine sulfoxide reductase, <i>F. ananassa</i>	1,8	<0,0001
Lipid transfer protein precursor, <i>M. domestica</i>	2,1	<0,0001
TPA: isoflavone reductase-like protein 3, <i>V. vinifera</i>	1,4	<0,0001
Abscisic acid response protein (rab21) mRNA, <i>P. dulcis</i>	1,4	<0,0001
Adenosine 5'-phosphosulfate reductase, <i>G. max</i>	1,5	<0,0001
mRNA for nitrite reductase, <i>B. pendula</i>	2,7	<0,0001
Aminoimidazolecarboximide ribonucleotide transformylase/inosine monophosphate cyclohydrolase, <i>V. unguiculata</i>	1,4	<0,0001
psaH gene for photosystem I psaH protein, <i>N. sylvestris</i>	1,7	<0,0001
Metal transport protein, <i>M. truncatula</i>	1,3	<0,0001
Plasma membrane localized protein protecting membranes from desiccation; stress induced; regulated by HOG and Ras-Pka pathways; Hsp12p, <i>S. cerevisiae</i>	1,4	<0,0001
Soluble inorganic pyrophosphatase mRNA, <i>M. domestica</i>	1,4	<0,0001
Clone 19-6 cysteine proteinase mRNA, <i>M. domestica</i>	1,6	<0,0001
Sorting nexin 1, <i>B. oleracea</i>	1,3	<0,0001
Calcium-binding EF hand family protein mRNA, <i>M. domestica</i>	0,4	<0,0001
Putative heat-shock protein 90, <i>E. esula</i>	0,5	<0,0001
NAD-dependent sorbitol dehydrogenase 2 gene, <i>M. domestica</i>	0,4	<0,0001
ATP-dependent protease (CD4B) gene, <i>L. esculentum</i>	0,4	<0,0001
Omega-3 desaturase, <i>V. fordii</i>	0,4	<0,0001
Putative acyl-CoA binding protein, <i>A. thaliana</i>	0,5	<0,0001
Major allergen and lipid transfer protein Mal d 3 mRNA, <i>M. domestica</i>	0,4	<0,0001
mRNA for thioredoxin-dependent peroxidase (txp1 gene), <i>P. major</i>	0,5	<0,0001
Protein disulfide isomerase (PDI)-like protein 2, <i>C. melo</i>	0,5	<0,0001
BCL-2 binding anthanogene-1, <i>H. vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>	0,6	<0,0001
Acyl-CoA-binding protein mRNA, <i>T. majus</i>	0,5	<0,0001
Protein synthesis initiation factor 4G; EIF4G, <i>A. thaliana</i>	0,6	<0,0001

Homologie	alte / junge	
	Blätter	p
Putative thioredoxin mRNA, <i>L. esculentum</i>	0,5	<0,0001
Putative heat shock protein, <i>A. thaliana</i>	0,5	<0,0001
MdSPDS2a mRNA for spermidine synthase, <i>M. domestica</i>	0,4	<0,0001
Auxin efflux carrier protein (PIN1) gene, <i>M. truncatula</i>	0,4	<0,0001
mRNA for rubisco-1,5-bisphosphate carboxylase, <i>Malus</i> (crab apple)	0,6	<0,0001
Chalcone isomerase (CHI-1) mRNA, <i>M. domestica</i>	0,5	<0,0001
Cell wall hydrolase, <i>H. orientalis</i>	0,6	<0,0001
Chloroplast chaperonin 21 (cpn21) mRNA, nuclear gene for chloroplast product, <i>V. vinifera</i>	0,6	<0,0001
Putative leucoanthocyanidin reductase (LAR1) mRNA, <i>M. domestica</i>	0,4	<0,0001
MdSPDS2b mRNA for spermidine synthase, <i>M. domestica</i>	0,5	<0,0001
ATP-dependent Clp mRNA, <i>M. domestica</i>	0,7	<0,0001

7.1.1.4 Expressionsanalysen der Flavonoidgene

Auch im Freilandexperiment wurde die Expression der Flavonoidgene in Makroarray- und in qRT-PCR-Analysen ermittelt. Während im vorangegangenen Experiment (6.1.3.5) die Expressionen der getesteten möglichen Referenzgene für die qRT-PCR-Analysen teilweise ziemlich schwankten, war der Elongation factor 1 α in allen Freilandproben konstant exprimiert (durchschnittlicher Ct-Wert = $21,1 \pm 0,6$), so dass dieses Gen zur Normalisierung verwendet wurde.

Abbildung 27 stellt die mit beiden Methoden ermittelten normalisierten *pal*- und *chs*-Genexpressionen dar. Insgesamt wurden sehr hohe Standardabweichungen beobachtet. Mit beiden Analysemethoden fiel auf, dass die *pal*- und *chs*-Transkripte stark koreguliert waren, wobei der Korrelationskoeffizient der Arrayanalysen mit 0,74 leicht höher war als derjenige der qRT-PCR-Studien mit 0,65. Der Korrelationskoeffizient zwischen den Makroarray- und qRT-PCR-Analysen betrug 0,40. Mit beiden Methoden fiel eine teilweise starke Reduktion der *pal*- und *chs*-Expressionen mit zunehmendem Blattalter auf. Es wurden weder deutliche Expressionsunterschiede zwischen den Sorten noch zwischen den N-Stufen detektiert.

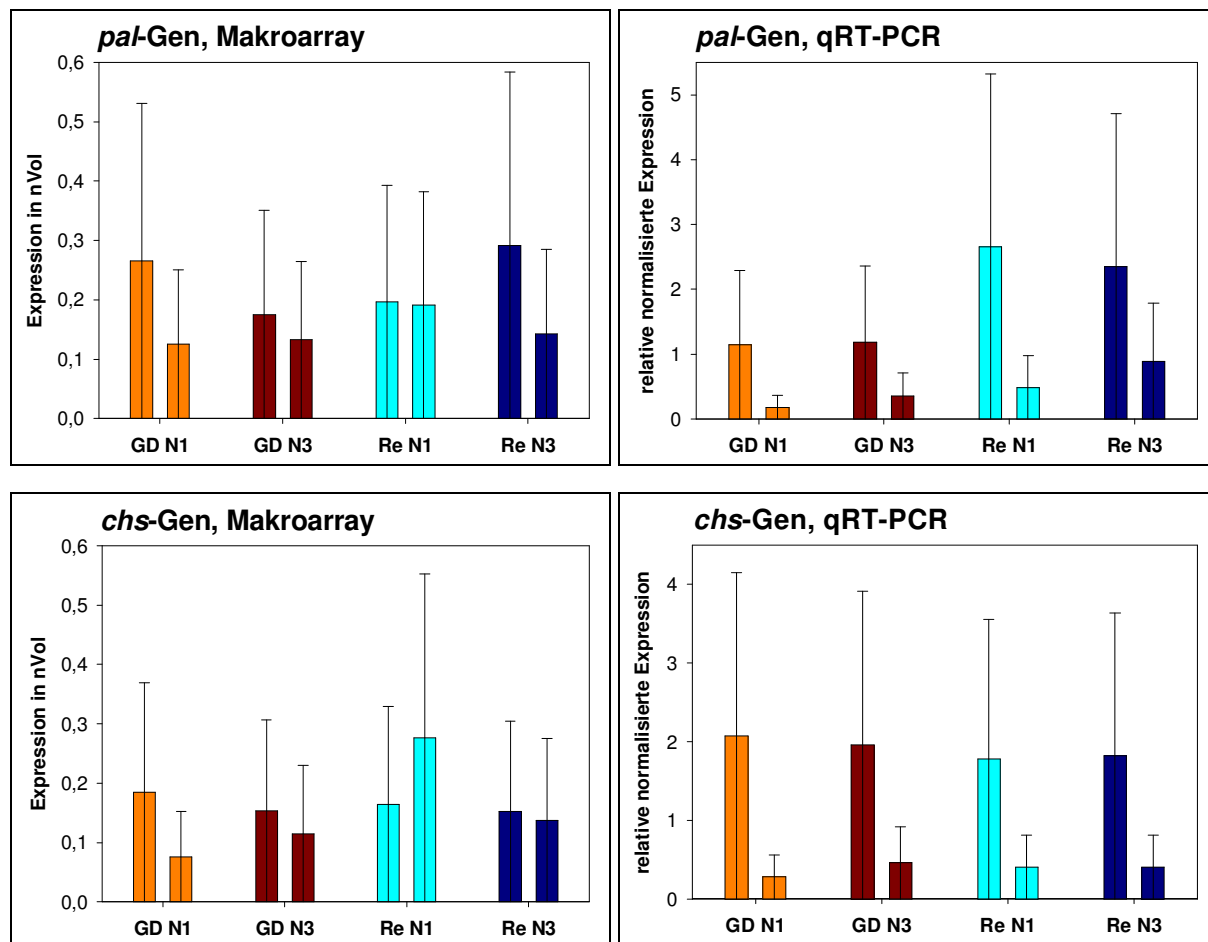


Abbildung 27 Mittels Mikroarray- bzw. qRT-PCR-Analysen ermittelte *pal*- und *chs*-Expressionen in jungen (jeweils erste Säule) und älteren Blättern (jeweils zweite Säule) der Sorten Golden Delicious und Rewena von Freilandbäumen der N-Stufen N1 und N3.

7.1.2 Phenolische Inhaltsstoffe

Die mittels HPLC-Analysen quantifizierten phenolischen Inhaltsstoffe (5.1.4) werden im Folgenden für junge und ältere N1- und N3-Blätter von Freilandbäumen der Sorten Golden Delicious und Rewena dargestellt. Für die Analysen wurde jeweils auf dieselbe Charge an gemörsertem Blattmaterial zurückgegriffen wie für die Genexpressionsstudien.

Hydroxycimtsäuren

In Golden Delicious wurden deutlich höhere Konzentrationen an Hydroxycimtsäuren gemessen als in Rewena (Abbildung 28). Junge und ältere Blätter verhielten sich in beiden Sorten recht ähnlich. Bei erhöhter N-Zufuhr nahmen die Hydroxycimtsäuregehalte leicht ab.

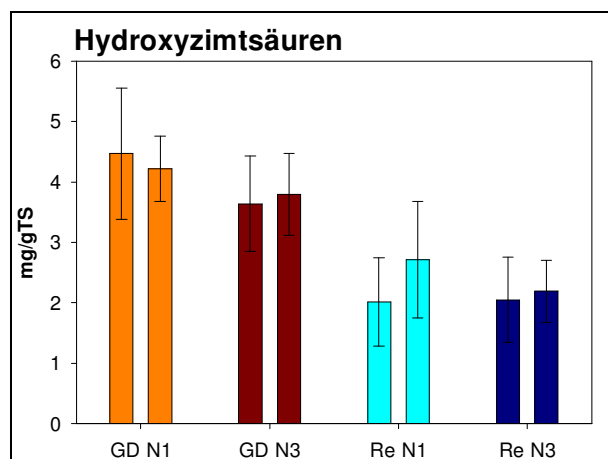


Abbildung 28 Konzentration an Hydroxyzimtsäuren [mg/g TS] in jungen (jeweils erste Säule) und älteren Blättern (jeweils zweite Säule) der Sorten Golden Delicious und Rewena von Freilandbäumen der N-Stufen N1 und N3.

Dihydrochalkone

Bei den „minor“ Dihydrochalkonen (Abbildung 29) traten insbesondere in Golden Delicious N1 sehr große Streuungen auf. Für Golden Delicious wurden leicht höhere Werte ermittelt als für Rewena, wobei jeweils in der Düngestufe N1 leicht erhöhte Konzentrationen vorlagen. Mit Ausnahme von Golden Delicious N1-Blättern stiegen die Gehalte in älteren Blättern leicht an.

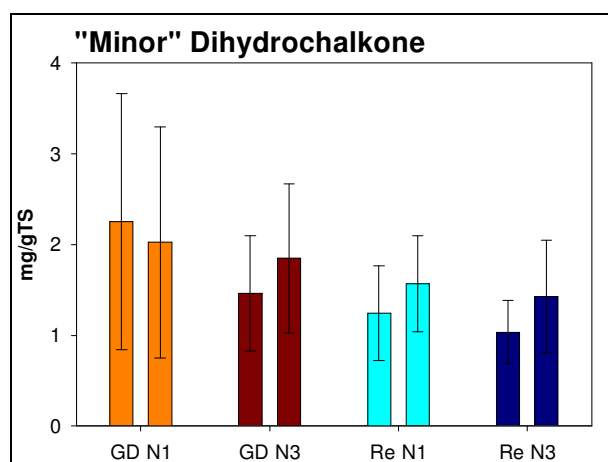


Abbildung 29 Konzentration an Dihydrochalkonen [mg/g TS] in jungen (jeweils erste Säule) und älteren Blättern (jeweils zweite Säule) der Sorten Golden Delicious und Rewena von Freilandbäumen der N-Stufen N1 und N3.

Phloridzin

In Golden Delicious wurden leicht höhere Phloridzin-Konzentrationen gemessen als in Rewena (Abbildung 30). Bei beiden Sorten nahmen die Gehalte mit dem Blattalter ab. Blätter verschiedener N-Stufen verhielten sich bezüglich des Phloridzin- und damit des Gesamtphenolgehalts sehr ähnlich.

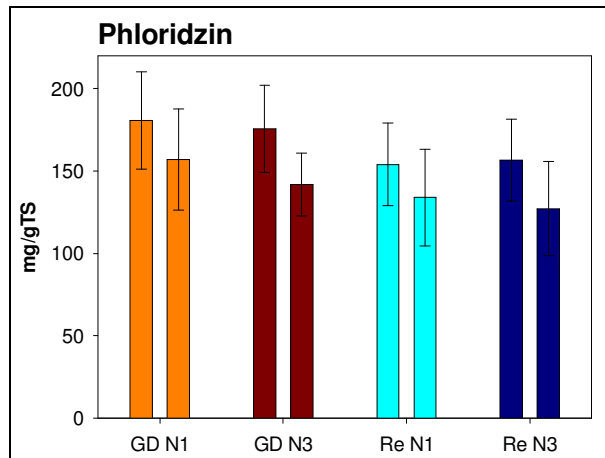


Abbildung 30 Konzentration an Phloridzin [mg/g TS] in jungen (jeweils erste Säule) und älteren Blättern (jeweils zweite Säule) der Sorten Golden Delicious und Rewena von Freilandbäumen der N-Stufen N1 und N3.

Flavonole

Bei den Flavonolen (Abbildung 31) wurden in beiden Sorten leicht höhere Werte in den mäßig mit N versorgten Blättern gemessen. Insbesondere in Rewena N1 nahmen die Konzentrationen mit dem Blattalter zu.

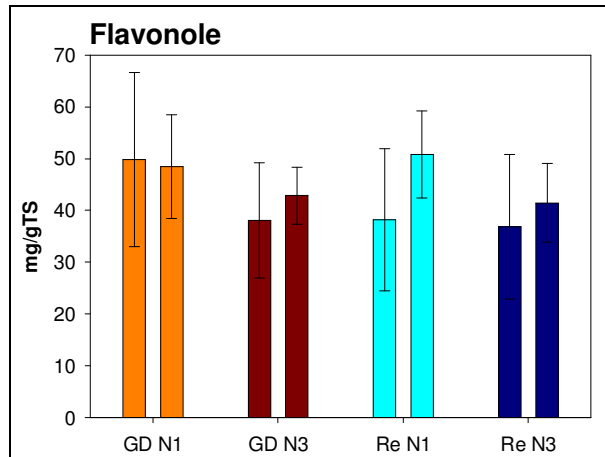


Abbildung 31 Konzentration an Flavonolen [mg/g TS] in jungen (jeweils erste Säule) und älteren Blättern (jeweils zweite Säule) der Sorten Golden Delicious und Rewena von Freilandbäumen der N-Stufen N1 und N3.

Flavanole

Tendenziell war in beiden Sorten sowohl bei den monomeren als auch bei den oligomeren Flavanolen ein leichter Konzentrationsanstieg mit dem Blattalter zu verzeichnen (Abbildung 32). Insgesamt wurden für N1- höhere Werte ermittelt als für N3-Blätter.

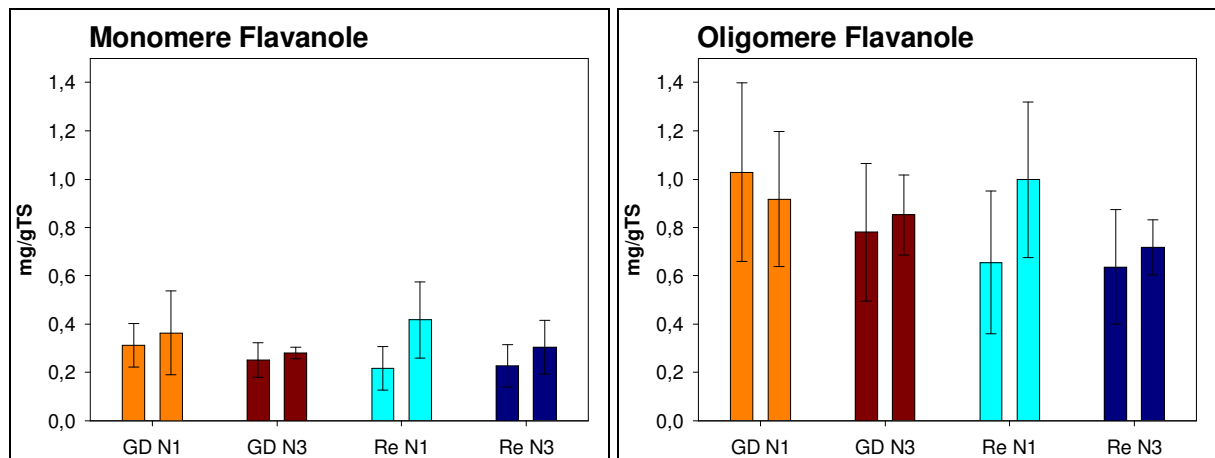


Abbildung 32 Konzentration an monomeren und oligomeren Flavanolen [mg/g TS] in jungen (jeweils erste Säule) und älteren Blättern (jeweils zweite Säule) der Sorten Golden Delicious und Rewena von Freilandbäumen der N-Stufen N1 und N3.

7.2 Diskussion

Innerhalb des Freilandexperimentes wurde mit total *V. inaequalis* infizierten Golden Delicious-Blättern (3.1.2) bzw. mit einem 100 %-igen Befallsdruck auf die resistente Sorte Rewena gearbeitet. Es ist daher davon auszugehen, dass Stress- und Abwehrreaktionen stärker waren als in den vorangegangenen Versuchen. Diesem sehr großen Vorteil steht allerdings gegenüber, dass in diesem Experiment keine nicht inokulierten Kontrollblätter vorlagen, weshalb keine Aussagen über den reinen *V. inaequalis*-Effekt getroffen werden konnten. Stattdessen wurden in diesem Experiment Sorten-, N- und Altersunterschiede analysiert (7.1.1). Die konservative Bonferroni-Korrektur der multiplen Mittelwertvergleiche führte zu nur relativ wenigen signifikanten Expressionsunterschieden, was allerdings die biologische Interpretation erleichtert.

N-Unterschiede

Besonders niedrig fielen die N-Unterschiede aus (7.1.1.2). Wie auch die Wachstumsdaten (4.1) nahe legen und wie es bereits im Folienhausversuch der Fall war (6.1.3.3), lässt sich dies wohl durch zu geringe N-Unterschiede in der Düngung erklären. Im Vergleich zu Kontainerkulturen ist eine zielgerechte Düngung im Freiland wesentlich schwieriger, weil die Nährstoffe leichter ausgewaschen werden.

Ingesamt traten keine reinen, sondern lediglich sortenspezifische N-Effekte auf. Die Sorte Golden Delicious schien dabei mit 16 signifikanten N-Effekten etwas stärker auf die unterschiedliche Düngung und damit auf veränderte *V. inaequalis*-Anfälligkeit zu reagieren als Rewena mit nur einem signifikanten N-Effekt.

Die dem SFB 607 zugrunde liegende Theorie von HERMS und MATTSON (1992), dass eine gesteigerte Resistenz stets mit reduziertem Wachstum einhergeht, können die Ergebnisse nur teilweise bestätigen. So war beispielsweise die Expression des Klons mit Homologie zu einem Metallothionein-ähnlichen Gen in Golden Delicious in N-übersorgten Blättern stärker als in N1-Blättern. Ein *dfr*-Klon und damit wichtiges Gen innerhalb der Flavonoid- und hier insbesondere der Flavanolsynthese war in Blättern von Rewena N3 signifikant stärker exprimiert als in N1. Auch bei den reinen N-Effekten war der Metallothionein-ähnliche Klon mit einer Signifikanz von $p < 0,05$ in N3 stärker exprimiert als in N1. Bei einigen Klonen jedoch führte die reduzierte N-Düngung – der Theorie entsprechend – zu einer stärkeren Expression abwehrtypischer Gene: Transkripte mit größter Homologie zu einem PR-6 Gen, einem *fgt*-Klon sowie einem *relA/spoT* homologous protein RSH2 codierenden Gen waren in Golden Delicious N1 stärker exprimiert als in N3. In einer Studie von VAN DER BIEZEN et al. (2000) sind *relA/spoT*-Homologe als Signaltransduktoren in *A. thaliana* an einer schnellen Antwort auf einen Pathogenbefall beteiligt. Die Enzyme *relA* und *spoT* spielen eine zentrale Rolle in der Stressantwort und werden beispielweise unter N-Mangel aktiviert (VAN

DER BIEZEN et al. 2000), was durch das vorliegende Experiment bestätigt werden kann. PR-6 Proteine sind Proteinaseinhibitoren, welche vorrangig nach Insektenbefall induziert werden (VAN LOON et al. 1999).

Sortenunterschiede

Neun Klone waren zwischen den Sorten signifikant differentiell exprimiert (7.1.1.1). Sechs vermutlich an der Photosynthese bzw. -respiration beteiligte Klone waren in Rewena signifikant stärker exprimiert. Dies lässt den Schluss zu, dass die Photosynthese in Golden Delicious durch den Pilzbefall beeinträchtigt war. Auch die Gene knapp unter der Signifikanzgrenze, die in Rewena stärker exprimiert waren, sind alle dem Primärstoffwechsel zuzuordnen. Die Tatsache, dass kein Abwehrgen in Rewena deutlich stärker exprimiert war als in Golden Delicious, legt nahe, dass die Resistenz der Sorte Rewena nicht durch eine konsequent starke Expression einzelner Abwehrgene bedingt ist, sondern vielmehr durch eine rechtzeitige Abwehrbereitschaft, die eventuell nur zu einer temporären Akkumulation von Transkripten führt. Neben einem *cad*-Gen war ein Klon mit Homologie zu einem Avr9/Cf-9-Gen (*N. tabacum*) derjenige abwehrbeteiligte Klon, der zwar nicht signifikant, aber noch am deutlichsten stärker in Rewena als in Golden Delicious exprimiert war. *Cf*-Gene wurden in der Tomate entdeckt und sind dort jeweils für die Resistenz gegenüber verschiedenen Rassen des pathogenen Pilzes *Cladosporium fulvum* verantwortlich, indem sie Avirulenz-Peptide des Pathogens erkennen (ROWLAND et al. 2005). Viele dieser schnell elicitierten Gene codieren Signalkomponenten und spielen so eine Schlüsselrolle in der frühen Abwehrreaktion. BELFANTI et al. (2004) identifizierten in der *Vf*-Region des Apfels ein Gencluster mit Homologie zum *Cf*-Resistenzgen der Tomate. Sie verwendeten eines dieser Gene, *HcrVf2*, um die Apfelsorte Gala zu transformieren und übertrugen auf diese Weise Schorfresistenz in die anfällige Sorte. Im vorliegenden Experiment ist somit ein Gen, das möglicherweise in Verbindung zu einem Apfel-Resistenzgen gegenüber *V. inaequalis* steht, in der resistenten Sorte Rewena deutlich stärker exprimiert als in Golden Delicious, wenn auch aufgrund der konservativen Bonferroni-Adjustierung der p-Werte nicht signifikant. Betrachtet man die Expression dieses Gens nun auch im vorangegangenen Folienhausversuch näher, so stellt man allerdings fest, dass hier das Avr9/Cf-9-Gen derjenige Klon mit dem geringsten Sortenunterschied ist (nicht dargestellt). Auch wenn durch die künstliche *V. inaequalis*-Inokulation der Befallsdruck im Folienhaus relativ niedrig war und dadurch eine stärkere Induktion dieses Gens möglicherweise verhindert wurde, scheidet damit das Avr9/Cf-9-Gen als Kandidatengen für die Schorfresistenz in Rewena aus.

Unter Einbeziehung des Blattalters und der N-Düngung traten von 56 signifikanten Sortenunterschieden interessanterweise 46 Effekte in N1 auf. Dies bedeutet, dass sich die stärker gedüngten N3-Blätter ähnlicher verhalten als N1-Blätter. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die N1-Blätter der Sorte Golden Delicious stark auf die Infektion reagieren,

während N3-Blätter aufgrund stärkerer Schorfinfektion in ihrer Reaktion träger und zu keinen großen Genexpressionsänderungen in der Lage sind.

Altersunterschiede

Da die natürlichen *V. inaequalis*-Inokulationen im Freilandexperiment ständig und unkontrolliert stattfanden, sind die einzelnen Termine nicht als definierte Zeitreihe zu sehen. Die Gruppierung der Blätter in „jung“ und „alt“ ist deshalb nicht unbedingt auch eine Einteilung in frische und etablierte Schorfinfektion. Die Einteilung in verschiedene Blattalter führte zu 49 signifikanten Altersunterschieden und hatte somit statistisch den größten Effekt des Experiments (7.1.1.3). Ähnlich große Effekte wurden auch schon im vorangegangenen Versuch (6.1.3.4) erzielt. Auffallend im Freiland war, dass viele Stress- und/oder Abwehrgene in älteren Blättern stärker exprimiert waren als in jüngeren, was möglicherweise mit der Altersresistenz in Zusammenhang steht, wie sie bei Apfelblättern gegenüber *V. inaequalis* beispielsweise von FALK et al. (1996) und GADOURY et al. (1996) beobachtet wurde.

Vergleicht man den Freiland- mit dem Folienhausversuch, so fällt auf, dass in beiden Experimenten Transkripte mit Homologien zu Proteasegenen sowie Metallothionein-Genen in älteren Blättern signifikant stärker exprimiert waren als in jungen Blättern. Im Gegensatz zum Folienhausversuch wurden im Freiland aber trotz der großen Elicitorwirkung durch den immensen *V. inaequalis*-Befall keine Flavonoidgene in jungen Blättern signifikant stärker exprimiert als in älteren Blättern.

Sehr aufschlussreich sind auch die sortenspezifischen Alterseffekte, da so möglicherweise frühe und für die Schorfresistenz verantwortliche Abwehrreaktionen in Rewena und späte Stressantworten in Golden Delicious detektiert werden können. Allerdings waren alle Gene, die in älteren Golden Delicious-Blättern signifikant stärker exprimiert waren als in jungen, auch in älterem Rewena-Blättern signifikant stärker exprimiert als in jungen, so dass keine sortenspezifischen Sekundärreaktionen auf die *V. inaequalis*-Inokulation sichtbar wurden. Dagegen gab es einige Gene, die ausschließlich in der Sorte Rewena in jungen Blättern stärker exprimiert waren als in älteren, und zwar mit größter Homologie zu folgenden Sequenzen: Cysteinprotease 1 (*Iris hollandica*), lipid transfer protein precursor (*M. domestica*), TPA: isoflavone reductase-like protein 3 (*V. vinifera*), Pektinesterase (*F. ananassa*), blight-associated protein p12 precursor (*C. jambhiri*), psaH gene for photosystem I (*Nicotiana sylvestris*) und methionine sulfoxide reductase-Gen (*F. ananassa*). Möglicherweise stehen diese Gene mit einer frühen Abwehr- und Stressantwort der Sorte Rewena in Zusammenhang.

Vergleich der qRT-PCR und Makroarrayergebnisse mit Phenolkonzentrationen

Die Expressionen der beiden Schlüsselgene der Flavonoidbiosynthese – *pal* und *chs* – wurden sowohl in qRT-PCR- als auch in Makroarrayanalysen untersucht (7.1.1.4). Insgesamt stimmten die Ergebnisse der unterschiedlichen Analysemethoden gut überein. Bei beiden Methoden fielen eine starke Koregulation der beiden Gene sowie eine Expressionsabnahme in älteren Blättern auf. Letzteres wurde auch auf Endproduktebene bestätigt: Der durch den Phloridzingehalt repräsentierte Gesamtphenolgehalt, der eng mit den beiden Schlüsselenzymen PAL und CHS in Verbindung steht, nahm ebenfalls in alten Blättern ab.

8 Gesamtdiskussion

8.1 Methodenvalidierung

Die Verwendung subtraktiver Genbanken erwies sich als erfolgreich. Da über Gene, die im Apfel infolge einer Schorfinokulation induziert werden, bisher wenig bekannt ist, war dies ein geeignetes Werkzeug, um einen Einblick in die Zusammensetzung der beteiligten Gene zu erhalten. Ein großer Vorteil der angewendeten Technologie besteht darin, dass durch die Normalisierung auch Transkripte niedriger Kopienzahl angereichert werden, wodurch eine sehr hohe Sensitivität erreicht wird.

Auch die anschließenden Makroarrayanalysen waren im Wesentlichen positiv zu bewerten. Die Qualität der einzelnen Filter ist dabei in hohem Maße dafür ausschlaggebend, inwieweit die Daten verlässlich und reproduzierbar sind. Qualitativ schlechte Filter wurden zwar von vorneherein von den weiteren Analysen ausgeschlossen, allerdings wurde von einigen Proben auch nach mehreren Wiederholungen keine optimale Filterqualität erzielt, so dass mitunter mit suboptimalen Daten weitergerechnet werden musste.

Die Fülle an Genexpressionsdaten sowie zu vergleichender Varianten erzwang geradezu eine statistische Auswertung, wie sie in der Regel für Mikroarrays mit meist mehreren Tausend Genen angewendet wird. Diese Methoden bieten den Vorteil, bei hoher Signifikanz und damit kleiner Standardabweichung auch die Bedeutung geringer Expressionsunterschiede zu erkennen. So wies beispielweise das Gen mit dem Bonferroni-adjustierten signifikantesten Sortenunterschied im Freiland lediglich eine 1,6-fache Expressionsänderung auf. Bei der Betrachtung der Expressionsänderungen als alleinigem Ausschlusskriterium hätte dieser Klon mit einer Expressionsänderung < 2 als nicht differentiell exprimiert gegolten. Andererseits wurden Klone, die zwar große Mittelwertdifferenzen (≥ 2) aufwiesen, bei denen aber die Einzelwerte stark schwankten, aufgrund mangelnder Signifikanz als nicht differentiell exprimiert erklärt.

Obwohl die Expressionsdaten der einzelnen Probenahmetermine aufgrund der großen Datenmenge nicht gesondert statistisch ausgewertet wurden, sondern eine Mittelwertbildung über frühe und späte Termine stattfand, wäre rückblickend dennoch kein abgeänderter Versuchsaufbau vorzuziehen gewesen. Bei Auftreten auffälliger Expressionsunterschiede zwischen den einzelnen Terminen wären diese nämlich durchaus gesondert analysiert worden. Auch auf die unterschiedlichen Düngervarianten wäre nicht verzichtet worden, wobei man jedoch größere Unterschiede zwischen den einzelnen N-Stufen anstreben hätte müssen, um die Schorfanfälligkeit der Sorte Golden Delicious stärker zu modifizieren und größere Unterschiede in der Genexpression zu bewirken. Die Probenahme verschieden alter Blattstadien war hilfreich, um durch Verwendung älterer Blätter den Zeitraum der

Probenahme verlängern zu können. Die Studien an Blättern aus Folienhaus und Freiland waren sehr gut geeignet, um Klone zu identifizieren, die in beiden Umwelten signifikant differentiell exprimiert waren. Rückblickend hätten möglicherweise auch im Freiland nicht inokulierte Bäume der beiden Sorten kultiviert werden sollen, um gezielt den Effekt zwischen inokulierten und nicht inokulierten Blättern untersuchen zu können. Jedoch hätten solche nicht inokulierten Bäume im Freiland mit einem Fungizid behandelt werden müssen, was sich wiederum auf Genexpressionsebene widerspiegelt hätte.

8.2 Genexpression

Eines der Ziele dieser Arbeit war die Charakterisierung von Genen, die an der Resistenz der Sorte Rewena gegenüber *V. inaequalis* beteiligt sind. Um derartige Gene zu identifizieren, wurde die Pathogen-induzierte Genexpression der schorfanfälligen Apfelsorte Golden Delicious mit derjenigen von Rewena verglichen. Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurden im Anschluss an ein Folienhausexperiment die Proben eines Freilandversuchs analysiert. Es sei jedoch explizit erwähnt, dass keine Funktionsanalysen der Klone durchgeführt wurden. Die vermutete Funktion der Klone aus den subtraktiven cDNA-Banken beruht vielmehr auf Homologien zu Sequenzen bereits veröffentlichter Klone.

Insgesamt traten im Freilandexperiment größere Sorten- und Alterseffekte auf als im Folienhausversuch. Die N-Unterschiede fielen dagegen in beiden Umwelten ähnlich niedrig aus. Um nun die wirklich interessanten Klone herauszufiltern, wurde nach denjenigen Genen gesucht, die in beiden Experimenten eine signifikant differentielle Expression zeigten.

Vergleicht man die 19 mit $p < 0,05$ signifikanten Sortenunterschiede aus dem Folienhaus (6.1.3.2) mit den 80 signifikanten Unterschieden auf demselben Signifikanzniveau aus dem Freiland (7.1.1.1), fallen 13 Gene auf, die in beiden Experimenten signifikant differentiell exprimiert waren (Tabelle 18).

Tabelle 18 Signifikante Sortenunterschiede ($p < 0,05$), die sowohl im Folienhaus (FH)- als auch im Freilandexperiment (FL) auftraten. Expressionsverhältnis > 1 : stärkere Expression in Rewena-Blättern, < 1 : stärkere Expression in Golden Delicious-Blättern.

Homologie	Re/GD	p	Re/GD	p
	FH	FH	FL	FL
mRNA for oxygen evolving enhancer protein 2, <i>B. gymnorhiza</i>	1,3	0,0350	1,5	0,0033
mRNA for NAPH-dependent hydroxypyruvate reductase (EC 1.1.1.29), <i>C. sativus</i>	1,2	0,0097	1,6	<0,0001
psbP mRNA for 23kDa polypeptide of the oxygen-evolving complex of photosystem II, <i>C. sativus</i>	1,3	0,0344	1,6	<0,0001

Homologie	Re/GD	p	Re/GD	p
	FH	FH	FL	FL
Cytosolic ascorbate peroxidase (APX) mRNA, APX42 allele, <i>F. ananassa</i>	1,4	0,0024	1,2	0,0211
Putative cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) mRNA, <i>M. domestica</i>	1,2	0,0011	1,2	0,0016
Photosystem I reaction center subunit X psaK mRNA, nuclear gene for chloroplast product, <i>N. tabacum</i>	1,4	<0,0001	1,6	<0,0001
Putative cysteine protease 1, <i>I. hollandica</i>	1,3	0,0046	1,3	0,0022
Annexin, <i>M. sativa</i>	0,9	0,0411	0,8	0,0251
Auxin-repressed protein like-protein mRNA, <i>M. domestica</i>	0,8	0,0081	0,8	0,0006
Clone 12-1 small Ras-like GTP-binding protein, <i>M. domestica</i>	0,9	0,0206	0,8	0,0026
Clone 19-6 cysteine proteinase mRNA, <i>M. domestica</i>	0,8	0,0070	0,7	0,0015
Clone 21-6 methylcochlorine hydroxylase mRNA, <i>M. domestica</i>	0,8	0,0239	0,7	0,0003
MdSPDS2a mRNA for spermidine synthase, <i>M. domestica</i>	0,8	0,0102	0,7	0,0326

Unter den sieben in Rewena stärker exprimierten Klonen spielen vier Gene vermutlich eine Rolle im Primärstoffwechsel (Tabelle 18: mRNA for oxygen evolving enhancer protein 2, mRNA for NAPH-dependent hydroxypyruvate reductase, psbP mRNA for 23kDa polypeptide of the oxygen-evolving complex of photosystem II, Photosystem I reaction center subunit X psaK mRNA). Dies verdeutlicht, dass die Resistenz der Sorte Rewena nicht auf Kosten des Wachstums geht, sondern sogar trotz stärkerer Investitionen in den Primärstoffwechsel als bei der Sorte Golden Delicious aufrechterhalten wird (vgl. Abbildung 33).

Außerdem waren in Rewena Klone mit Homologie zu einem proteinabbauenden Gen (putative cysteine protease) sowie zu einem cytosolischen Ascorbatperoxidase (APX)-Gen (Tabelle 18) stärker exprimiert. APX ist ein wichtiges H₂O₂-detoxifizierendes Enzym in Pflanzen und wird als Antwort auf verschiedene Stressoren, die zu einer Akkumulation an reaktiver Sauerstoffspezies führen, schnell induziert (MITTLER et al. 1999). FAIZE et al. (2004) beobachteten in einer schorfresistenten Birnensorte eine gesteigerte APX-Aktivität infolge einer *V. nashicola*-Inokulation. Das Expressionsmuster der verwendeten europäischen Birnensorte Flemish Beauty unterschied sich dabei als Nichtwirt-resistente Sorte von denen anfälliger japanischer und chinesischer Sorten. Da Peroxidasen auch in die Ligninbiosynthese involviert sind, schlagen die Autoren vor, dass Lignifizierung in diesem Resistenztyp eine wichtige Rolle spielt. Derartige so genannte ligninformende Peroxidasen bilden die Familie der PR-9 Proteine. In einer früheren Studie an der Vf-resistenten Apfelsorte Florina wurde ebenfalls beobachtet, dass Peroxidasen bei der *V. inaequalis* Abwehr eine entscheidende Rolle spielen (BECK 2003).

In diesem Zusammenhang fiel auch die in der resistenten Sorte Rewena verstärkte Expression eines Klons auf, der größte Homologie zu einem Cinnamylalkoholdehydrogenase (CAD)-Gen aus *M. domestica* aufweist (Tabelle 18). Wie in Kapitel 6.2 bereits beschrieben, katalysiert

CAD die NADPH-abhängige Reduktion von Cinnamylaldehyden zu den entsprechenden Cinnamylalkoholen, aus welchen wiederum Lignin gebildet wird (KUTSUKI et al. 1982). Wie ebenfalls bereits erläutert, spielt die Lignifizierung pflanzlichen Gewebes in Abwehrprozessen von Pflanzen gegenüber biotischen und abiotischen Stressoren eine wichtige Rolle.

Unter den sieben Genen, die sowohl im Folienhaus- als auch im Freilandexperiment in Rewena signifikant stärker exprimiert waren als in Golden Delicious, befinden sich also mit einem APX- und einem CAD-codierenden Klon nur zwei Gene, die in einen direkten Zusammenhang mit Stress- und/oder Abwehrreaktionen gebracht werden können. Beide Gene scheinen im Lignifizierungsprozess von Pflanzen eine wichtige Rolle zu spielen, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die verstärkte Produktion von *defense lignin* der Sorte Rewena einen entscheidenden Vorteil bei der Pathogenabwehr bietet (vgl. Abbildung 33). Auch in anderen Wirt-Pathogen-Interaktionen ist Lignin von Bedeutung: So fanden beispielsweise VALENTINES et al. (2005) eine hervorragende Korrelation zwischen dem Ligningehalt und der *Penicillium expansum*-Resistenz in Apfel und NAFUSSI et al. (2001) beschrieben einen Zusammenhang zwischen der Lignifizierung und der *Penicillium digitatum*-Resistenz in Zitrone.

Wie in Rewena ein Klon mit Homologie zu einem proteinabbauenden Cysteinprotease-Gen aus *I. hollandica*, so wurde in Golden Delicious ein Cysteinprotease-Gen aus *M. domestica* sowohl im Folienhaus- als auch im Freilandexperiment verstärkt exprimiert. Diese Proteasen haben somit wohl keine sortenspezifische Aufgabe in der Schorfabwehr.

Die Funktion des in Golden Delicious stärker exprimierten und möglicherweise in die Signaltransduktion involvierten Spermidinsynthase-Gens wurde bereits in Kapitel 6.2 beschrieben. Im Folienhausexperiment besaß dieses Gen zudem eine signifikant stärkere Expression in inokulierten im Vergleich zu nicht inokulierten Rewena-Blättern (6.1.3.1).

Ein Klon mit größter Homologie zu einem Methylcoclaurinhydroxylase-Gen wies ebenfalls in Golden Delicious eine signifikant höhere Expression auf als in Rewena. Die Methylcoclaurinhydroxylase ist eines der Schlüsselenzyme der Alkaloidbiosynthese. Alkaloide stellen eine Gruppe von etwa 12.000 N-haltigen Stoffen dar, die in ungefähr 20 % aller Pflanzenarten auftreten. Die meisten Alkaloide sind sehr giftig und schmecken außerordentlich bitter. Bekannte Vertreter dieser Stoffgruppe sind beispielsweise Cocain, Codein, Koffein, Morphin, Nikotin oder Strychnin. SCHMELLER et al. (1997) berichten, dass die Alkaloide Berberin, Palmatin und Sanguinarin chemische Abwehr gegen Pathogene vermitteln. Da im Apfel allerdings keine Alkaloide auftreten, wurden mittels der Programme blastn und blastx weitere Sequenzhomologien gesucht. Die nächstgrößten Homologien wurden dabei für ein P450-Hydroxylase-Gen aus *Solanum melongena* und ein Flavonoid 3',5'-Hydroxylase (F3'5'H)-Gen aus *Verbena hybrida* gefunden, so dass ein Zusammenhang des betroffenen Klons mit der Flavonoidbiosynthese bestehen könnte. Die F3'5'H ist ein

Cytochrom P450-Enzym, welches die 3',5'-Hydroxylierung von Naringenin und Eriodictyol zu 3',4',5'-Pentahydroxyflavanon und von Dihydrokaempferol und Dihydroquercetin zu Dihydromyricetin katalysiert, und stellt damit das Schlüsselenzym für die Bildung blauer oder violetter Blütenfarben dar (HOLTON et al. 1993). Im Apfelblatt besitzt der in der Genbank „Golden Delicious“ gefundene Klon möglicherweise F3'H-Aktivität. Die F3'H katalysiert im Apfelblatt die Hydroxylierung von Naringenin zu Eriodictyol. Die nähere Betrachtung der Expression dieses Gens zeigt, dass die höhere Akkumulation in Golden Delicious vor allem durch eine verstärkte Expression in inokulierten N1-Blättern zustande kommt (Tabelle 19).

Tabelle 19 Signifikante Effekte ($p < 0,05$) eines vermutlich mit der Flavonoidbiosynthese in Zusammenhang stehenden Klons (Homologie zu F3'5'H-Gen) im Folienhausexperiment, Freilandexperiment und im Experiment mit unterschiedlich stark infizierten Golden Delicious-Blättern (Vi %).

Experiment	Effekt	Expressions- verhältnis	p
FH	GD > Re	1,2	0,0239
FH	GD N1 > Re N1	1,3	0,0254
FH	GD inokuliert > Re inokuliert	1,4	0,0051
FH	GD inokuliert, alt > Re inokuliert, alt	1,7	0,0077
FH	GD inokuliert > GD nicht inokuliert	1,4	0,0252
FL	GD > Re	1,5	0,0003
FL	GD N1 > Re N1	2,2	<0,0001
FL	GD jung > Re jung	1,7	0,0001
FL	N1 > N3	1,4	0,0017
FL	GD N1 > GD N3	2,0	0,0001
Vi %	GD N1 > GD N3	1,9	0,0189
Vi %	GD stark infiziert > GD schwach infiziert	2,0	0,0184
Vi %	GD stark infiziert N1 > GD schwach infiziert N1	2,4	0,0212

Somit wurde ein möglicherweise in die Flavonoidbiosynthese involviertes Gen in Golden Delicious durch die *V. inaequalis*-Inokulation signifikant induziert, und zwar insbesondere in N1-Blättern im Vergleich zur reaktionsträgeren Düngestufe N3 (vgl. Abbildung 33). In der Genbank „Golden Delicious“ wurde ein Klon mit größter Homologie zu einem putative flavonoid 3'-hydroxylase-Gen aus *C. chinensis* gefunden, der möglicherweise nah verwandt ist mit dem hier näher besprochenen Gen. Dieser F3'H codierende Klon wurde im Folienhausexperiment in jungen inokulierten Golden Delicious-Blättern signifikant stärker exprimiert als in den entsprechenden Rewena-Blättern ($p < 0,05$) und im Freilandexperiment in alten Blättern beider Sorten signifikant stärker als in jungen Blättern der beiden Sorten ($p_{Bon} < 0,1$).

Des Weiteren wurde in Golden Delicious ein Klon mit größter Homologie zu einem Ras-like GTP-binding-Gen verstärkt exprimiert. Ras-Proteine sind Teil eines Mehrkomponenten-Signalnetzwerkes (BOS 1997), deren Transkripte Guanintriphosphat (GTP)asen (auch G-Proteine) codieren (BERKEN 2006). CASTELLANO et al. (2007) stellten fest, dass Ras beim Menschen in Abwehr- und apoptotische Reaktionen involviert ist.

Ein Klon mit Homologie zu einem Auxin-reprimierten Gen aus *M. domestica* wurde ebenfalls stärker in Golden Delicious als in Rewena exprimiert. Das Phytohormon Auxin ist ein Wachstumsregulator, der vor allem in apikalen Knospen gebildet wird, und spielt eine Schlüsselrolle in vielen Wachstums- und Entwicklungsprozessen wie Apikaldominanz, Zellteilung und Phototropismus. Der polare Transport des Phytohormons Auxin erfolgt im Phloem. Über Auxin-reprimierte Gene und ihre Rolle im Wachstumsprozess in der Pflanze liegen im Gegensatz zu Auxin-induzierten Genen nur sehr wenige Studien vor (PARK und HAN 2003). Auxin-reprimierte Gene wurden bisher beispielsweise in Zusammenhang mit der Fruchtreife bei Erdbeere gebracht (REDDY und POOVAIAH 1990), der Knospenruhe in Erbse (STAFSTROM et al. 1998), der Pollenreife bei Tabak (STEINER et al. 2003) oder dem Triebwachstum bei Robinie (PARK und HAN 2003).

Ebenfalls in Golden Delicious stärker exprimiert wurde ein Klon mit Homologie zu Annexin. Pflanzliche Annexine binden Ca^{2+} und Phospholipide und machen als ubiquitäre Proteine mindestens 0,1 % des Gesamtproteingehalts aus (DELMER und POTIKHA 1997). Die genaue Funktion von Annexinen ist noch ungeklärt, jedoch wurden sie bereits mit der Sekretion oder der Fruchtreife in Zusammenhang gebracht und besitzen darüber hinaus möglicherweise Peroxidase-Aktivität.

Insgesamt muss bei einem Vergleich der Genexpressionen zwischen den verschiedenen Sorten bedacht werden, dass oftmals schon geringe Expressionsunterschiede – mitunter auch lediglich von so genannten *modifier* Genen – ausreichen, um beispielsweise eine wirksame Pathogenresistenz zu erzielen. ROUSSELLE et al. stellten bereits 1974 dar, dass das Ausmaß der durch ein *major* Resistenzgen vermittelten Schorfresistenz bei Apfel durch *modifier* Gene verändert werden kann. Die Identifikation derartig kleiner Expressionsänderungen stellt natürlich eine größere Herausforderung dar als das Auffinden großer Geninduktionen. Durch die gleichzeitige Betrachtung der Signifikanz und der Expressionsänderung eines Gens wurde allerdings gewährleistet, dass auch kleine Expressionsunterschiede nicht übersehen wurden.

Zur Modifizierung der Schorfanfälligkeit der Sorte Golden Delicious wurden die Bäume mit unterschiedlichen N-Düngegaben versorgt. Bei einem Vergleich der signifikanten N-Unterschiede aus dem Folienhaus (6.1.3.3) und dem Freiland (7.1.1.2) fällt nur ein einziges Gen auf, das auf einem α -Niveau von 0,05 in beiden Umwelten signifikant differentiell exprimiert war: Der Klon mit Homologie zu einem Metallothionein-ähnlichen Gen aus *M. domestica* war sowohl im Folienhaus als auch im Freiland jeweils in der N-Stufe N3 um

den Faktor 1,7 stärker exprimiert als in N1. Wie in Kapitel 5.2 bereits beschrieben, handelt es sich bei Metallothioneinen um Metall-detoxifizierende Proteine, deren Transkripte durch verschiedene biotische und abiotische Stressoren induziert werden. Die im ersten Versuch mit normal N-versorgten Folienhausbäumen ermittelte starke *V. inaequalis*-bedingte Induktion dieses Gens in der Sorte Golden Delicious zum letzten Probenahmetermin (5.1.2) wurde allerdings in keinem der beiden weiteren Versuche bestätigt.

Da es sowohl im Folienhaus (6.1.3.4) als auch im Freiland (7.1.1.3) sehr viele signifikante Altersunterschiede gab, werden im Folgenden nur diejenigen Gene berücksichtigt, die mit $p_{\text{Bon}} < 0,1$ signifikant waren. Insgesamt wurden zehn Gene gefunden, die in beiden Umwelten einen signifikanten Alterseffekt aufwiesen (Tabelle 20), wobei die meisten Klone in älteren Blättern stärker exprimiert waren. Insgesamt fiel auf, dass die Expressionsänderungen im Folienhaus- höher waren als im Freilandexperiment, was vermutlich auf verschieden alte Blätter in den beiden Umwelten zurückzuführen ist: Als „alt“ bezeichnete Blätter waren im Folienhaus 9-27, im Freiland 8-14 Tage alt (2.2.1).

Tabelle 20 Signifikante Altersunterschiede ($p_{\text{Bon}} < 0,1$), die sowohl im Folienhaus- als auch im Freilandexperiment auftraten. Expressionsverhältnis > 1 : stärkere Expression in älteren Blättern, < 1 : stärkere Expression in jungen Blättern.

Homologie	alte / junge Blätter FH	p FH	alte / junge Blätter FL	p FL
Blight-associated protein p12 precursor, <i>C. jambhiri</i>	5,5	<0,0001	2,5	<0,0001
Metallothionein-like protein (AMT2) mRNA, <i>M. domestica</i>	5,4	<0,0001	3,2	<0,0001
Metallothionein-like protein (MT2) mRNA, <i>P. pyrifolia</i> strain Whangkeumbae	5,9	<0,0001	3,5	<0,0001
Metal transport protein, <i>M. truncatula</i>	1,8	<0,0001	1,3	<0,0001
Pectinesterase, <i>F. ananassa</i>	2,8	<0,0001	1,7	<0,0001
Plasma membrane localized protein protecting membranes from desiccation; stress induced; regulated by HOG and Ras-Pka pathways; Hsp12p, <i>S. cerevisiae</i>	1,6	<0,0001	1,4	<0,0001
Putative aspartic protease, <i>I. batatas</i>	3,7	<0,0001	2,8	<0,0001
Putative cysteine protease 1, <i>I. hollandica</i>	3,2	<0,0001	1,8	<0,0001
BCL-2 binding anthanogene-1, <i>H. vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>	0,7	<0,0001	0,6	<0,0001
Acyl-CoA-binding protein mRNA, <i>T. majus</i>	0,5	<0,0001	0,5	<0,0001

Am deutlichsten wurden Klone mit Homologie zu einem blight-associated-Gen sowie zu zwei Metallothionein-ähnlichen Genen in älteren Blättern verstärkt exprimiert. Die verstärkte Expression dieser stress- und abwehrtypischen Gene steht möglicherweise in Verbindung mit

ontogenetischer Resistenz, wie sie für den Apfel beispielsweise von FALK et al. (1996), GADOURY et al. (1996) sowie LI und XU (2002) beobachtet wurde.

CECCARDI et al. (1998) identifizierten einen blight-associated p12-Klon in Citrus nach *Citrus Blight* (auch *Young Tree Decline*), wobei jedoch Transkripte lediglich in Spross und Wurzel, nicht aber in Blättern gefunden wurden. Das Protein selbst wurde dagegen in der gesamten Pflanze nachgewiesen, so dass ein vermutlich apoplastischer Transport von p12 aus Wurzel und Stamm in die Blätter stattfindet. Die Funktion des Proteins ist bisher noch unbekannt, allerdings stellten die Autoren eine Ähnlichkeit von p12 zu Expansinen fest. Expansine stellen eine Multigenfamilie von Proteinen dar, die mit dem Lockern der Zellwände während des Längenwachstums in Zusammenhang stehen (MCQUEEN-MASON et al. 1992).

Eine mit der Blattalterung steigende Expression eines Metallothionein-Klons wurde bereits von REID und ROSS (1997) für den Apfel beschrieben. Eine altersbedingte Metallothionein-Regulation wurde auch für Raps- und Holunder-Blätter nachgewiesen (BUCHANAN-WOLLASTON 1994, COUPE et al. 1995). Möglicherweise werden die durch die verschiedensten Elicitoren induzierten Metallothionein-Klone in älteren Blättern aufgrund von oxidativem Stress verstärkt akkumuliert. Die späte Metallothionein-Expression passt zudem gut zu der Tatsache, dass der Klon verstärkt in der Genbank „Rewena ontogenetisch“ auftrat. Hier hatte der Klon einen Anteil von über 20 % aller sequenzierten Gene (6.1.1.3), während in der Genbank „Rewena früh“ nur einer von 384 Klonen eine entsprechende Homologie aufwies (6.1.1.2). Zusätzlich wurden an nicht inokulierten N2-Blättern des ersten Folienhausversuchs qRT-PCR-Analysen zur Verifizierung der altersbedingten Metallothionein-Akkumulation durchgeführt (Ergebnisse nicht dargestellt). Die Expressionen wurden auf den ersten Probenahmetermin unmittelbar vor der Inokulation bezogen und es zeigte sich in beiden Sorten ein stetiger, ab dem Termin 8 dpi sprunghafter Anstieg an Metallothioneinexpression, die ihr Maximum zum letzten Termin 25 dpi erreichte.

Lediglich zwei Gene wurden in jungen Blättern sowohl im Folienhaus als auch im Freiland signifikant stärker exprimiert als in älteren Blättern, und zwar mit Homologie zu einem BCL-2 binding anthanogene-1- und einem Acyl-CoA-binding-Gen. Während letzteres im Fettsäuremetabolismus eine Rolle spielt, zählt ersteres zu einer Genfamilie, die mit programmiertem Zelltod in Zusammenhang steht (DOUKHANINA et al. 2006). Während über BCL-2 bindende Anthanogene in Mensch und Tier viel erforscht ist, liegen über diese Gengruppe in Pflanzen bisher nur sehr wenige Studien vor. Jedoch scheinen diese Gene infolge abiotischen Stresses (Kälte, Trockenheit, Salzstress, oxidativer Stress) und biotischen Stresses (Pathogenbefall) induziert zu werden (DOUKHANINA et al. 2006). In einigen inkompatiblen Wirt-Pathogen-Interaktionen findet nach Inokulation ein schneller Zelltod statt, der zu einem Bereich abgestorbener Zellen um die Infektionsstelle herum führt. Durch diese hypersensitive Reaktion entsteht eine physikalische Barriere, die ein weiteres Ausbreiten des Pathogens verhindern soll. Da programmierter Zelltod sehr rasch auftritt, soll

er das Pathogenwachstum möglicherweise in den frühen Stadien der Abwehrantwort eindämmen, um die Zeit bis zur aufwändigeren Induktion anderer Abwehrmechanismen, wie die Synthese von PR-Proteinen und Phytoalexinen, zu überbrücken (GOODMAN und NOVACKY 1994). Somit lässt sich die stärkere Expression des BCL-2 binding anthanogene-1-Genes in jungen Blättern als frühe Abwehrreaktion erklären. Die beiden Proteasen mit signifikant stärkerer Expression in älteren Blättern (Tabelle 20) stehen nach KORSMEYER (1995) als lytische Enzyme möglicherweise ebenfalls mit dem programmierten Zelltod in Verbindung.

Bei der Analyse der Alterseffekte muss bedacht werden, dass für die Identifikation einiger in der Sorte Rewena wirksamer Abwehrgene möglicherweise selbst die frühen Termine zu spät angesetzt waren. In resistenten Sorten tritt eine wirkungsvolle Abwehr gegenüber Pathogenen oftmals schon Stunden nach einer Inokulation auf. Damit besteht der einzige Unterschied zwischen anfälligen und resistenten Sorten mitunter lediglich im Zeitpunkt der Abwehrbereitschaft (KATAGIRI 2004). HABEREDER et al. (1989) beispielsweise beobachteten bereits 1-2 Stunden nach einer *Phytophthora megasperma*-Inokulation erhöhte *pal*- und *chs*-mRNA-Level in der Sojabohne.

Vergleicht man schließlich die 20 mit $p < 0,05$ signifikanten Unterschiede zwischen inokulierten und nicht inokulierten Blättern der Sorte Golden Delicious aus dem Folienhaus (6.1.3.1) mit den 94 signifikanten Unterschieden, die bei den Analysen unterschiedlich stark infizierter Golden Delicious-Blätter als Infektionsunterschiede bezeichnet wurden (6.1.3.6), findet man vier Gene, die unter beiden Bedingungen signifikant reguliert wurden (Tabelle 21).

Tabelle 21 Signifikante Behandlungs- bzw. Infektionsunterschiede in Golden Delicious ($p < 0,05$), die sowohl im Folienhausexperiment als auch im Experiment mit unterschiedlich stark infizierten Blättern auftraten. Expressionsverhältnis > 1 : stärkere Expression in inokulierten bzw. stark infizierten Blättern, < 1 : stärkere Expression in nicht inokulierten bzw. schwach infizierten Blättern.

Homologie	inok. /		stark / schwach	
	nicht inok. FH	p FH	inf. Vi%	p Vi%
mRNA for thaumatin-like protein (tl gene), <i>M. domestica</i>	1,5	0,0370	1,6	0,0020
Clone 21-6 methylcoclaurine hydroxylase mRNA, <i>M. domestica</i>	1,4	0,0252	2,0	0,0184
Major allergen and lipid transfer protein Mal d 3 mRNA, <i>M. domestica</i>	0,7	0,0048	0,4	0,0039
Nonreversible glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, <i>A. graveolens</i>	1,3	0,0058	2,2	$< 0,0001$

Mithilfe dieses Vergleichs sollten neue Hinweise auf *V. inaequalis*-induzierte Gene in Golden Delicious erhalten werden. Es zeigte sich allerdings, dass bei nur vier Genen eine synchrone Expressionsänderung vorlag, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass in die Behandlungsunterschiede des Folienhausversuchs Daten aller Probenahmetermine einfließen, während für die Infektionsunterschiede lediglich Blätter des Termins 25 dpi analysiert wurden. Zudem ist davon auszugehen, dass schon eine schwache Infektion ausreicht, um Veränderungen im Stoffwechsel eines Baumes in Gang zu setzen. Durch die Inokulation bzw. die starke Infektion wurde jeweils ein Klon mit Homologie zu einem Thaumatin-ähnlichen Gen verstärkt exprimiert (vgl. Abbildung 33). Eine Thaumatin-Geninduktion in Golden Delicious fiel auch schon im ersten Folienhausexperiment auf (5.1.2). Wie bereits beschrieben, sind Thaumatin-ähnliche Proteine in der Lage, pilzliche Zellwände abzubauen (STINTZI et al. 1993), was die hohe Expression infolge einer Inokulation erklärt.

Ein weiteres PR-Gen wurde unter beiden Bedingungen synchron reguliert: Ein Klon mit größter Homologie zu einem Major allergen and lipid transfer protein Mal d 3-Gen aus *M. domestica* wurde aufgrund der Inokulation bzw. starken Infektion signifikant reprimiert. Diese Repression ist auf sehr hohe konstitutive Expressionen in gesunden bzw. nur schwach infizierten Sorten zurückzuführen. Möglicherweise ist also das konstitutive Expressionsniveau bereits ausreichend für eine Beteiligung an einer Stress- bzw. Abwehrreaktion. Die Repression lässt sich darüber hinaus sehr gut in frühere Ergebnisse von GAU et al. (2004) und KOUTB (2006) einordnen, die in der ersten Woche nach *V. inaequalis*-Inokulation eine starke Abnahme eines Lipidtransferproteins im Apoplasten der schorfanfälligen Apfelsorte Elstar beobachteten.

Infolge der Inokulation bzw. starken Infektion wurde ein Klon mit Homologie zu einem Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (GAPDH)-Gen aus *Apium graveolens* signifikant induziert. GAPDH katalysiert den sechsten Schritt innerhalb der Glykolyse und damit des wichtigsten Abbauweges der Kohlenhydrate. LAXALT et al. (1996) beobachteten in der Kartoffel infolge einer *Phytophthora infestans*-Infektion eine Akkumulation an GAPDH-Transkripten und sprachen in diesem Zusammenhang von einer *stress-induced metabolic response* (SIMR). Laut ihrer Definition stellen SIMR langsam aktivierte Gene dar, die den Primärstoffwechsel umleiten, um die für den neuen physiologischen Status erforderlichen Substanzen zu produzieren. Für die stressbedingte Induktion von GAPDH-Genen schlagen LAXALT et al. (1996) zwei verschiedenen Erklärungen vor: Ebenfalls stressbedingt akkumuliertes H_2O_2 inhibiert die GAPDH-Aktivität, so dass die Transkriptionsrate erhöht werden muss, um genügend Enzym zu synthetisieren und so die Glykolyse aufrecht zu erhalten. Als zweiter möglicher Grund wurde genannt, dass in Pflanzen während einer Infektion die Respirationsrate ansteigt, was von einer Induktion der beteiligten Gene begleitet wird.

Wie auch in Tabelle 19 bereits dargestellt, wurde ein vermutlich mit der Flavonoidbiosynthese in Zusammenhang stehender Klon, der allerdings größte Homologie zu einem Methylcochlorinhydroxylase-Gen aufweist, infolge der Inokulation bzw. der starken Infektion verstärkt exprimiert und spielt somit möglicherweise eine Schlüsselrolle in der Stress- und/oder Abwehrreaktion der Sorte Golden Delicious gegenüber *V. inaequalis* (vgl. Abbildung 33).

8.3 Vergleich der Genexpression in Apfel und Kartoffel

Im Rahmen des SFB 607 wurden zu den vorliegenden Studien vergleichbare Genexpressionsanalysen an der Kartoffel durchgeführt. Mittels subtraktiver cDNA-Banken wurden *P. infestans* induzierte Gene identifiziert und deren Expression in Makroarrayanalysen untersucht (ROS 2004). Trotz der sehr unterschiedlichen Wirt-Pathogen-Interaktionen (holzige Pflanze – Pilz und krautige Pflanze – Oomycet) traten einige Gemeinsamkeiten in den Genexpressionen auf, die im Folgenden diskutiert werden. Allerdings können aufgrund unterschiedlicher Auswertemethoden keine direkten Vergleiche angestellt werden.

Zunächst einmal fiel auf, dass es einige Überschneidungen in den Inhalten der auf *P. infestans* induzierten Kartoffel- und der auf *V. inaequalis* induzierten Apfel-Genbanken gab. Dies betraf neben einigen Primärstoffwechselgenen (*psaH* gene for photosystem I, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase-Gen, ATP synthase-Gen) in erster Linie stress- und/oder abwehrbezogene Klone: Hitzeschockgene, ein *chi*-Gen, Metallothionein-ähnliche Gene sowie Transkripte, die PR-Proteine codieren (PR-2, PR-6, PR-8, PR-14). Diese Klone werden also vermutlich relativ unspezifisch von verschiedenen Pflanzenarten nach einer Pathogeninokulation induziert und sind somit Teil einer generellen Stressantwort. Dies deckt sich auch mit der Aussage von KATAGIRI (2004), dass die Expressionsprofile verschiedener Wirt-Pathogen-Interaktionen oft sehr gut miteinander übereinstimmen. Bei der Kartoffel zeichnete sich die *P. infestans*-anfällige Sorte Indira durch eine starke Geninduktion infolge der Inokulation aus, die resistere Sorte Bettina wies dagegen bereits eine konstitutiv hohe Expression abwehrrelevanter Gene auf. Im Apfel waren ebenfalls die beiden an der Lignifizierung und damit möglicherweise an der Pathogenabwehr beteiligten CAD- und APX-homologen Gene in nicht inokulierten Rewena-Blättern signifikant stärker exprimiert als in nicht inokulierten Golden Delicious-Blättern (Tabelle 10). Derart starke inokulationsbedingte Expressionsänderungen von Abwehrgenen wie im Kartoffelexperiment wurden in der Sorte Golden Delicious allerdings nicht beobachtet. Zu den in der Kartoffel infolge einer *P. infestans*-Inokulation induzierten Genen zählten Klone mit größter Homologie zu PR-1, PR-2 und PR-5 Genen, einem wurzelspezifischen Metalltransporter-Klon, einem

Kupferaminoxidase-Gen, einem LeMir-Gen sowie einem mit biotischem Zelltod assoziierten Gen.

Eine reduzierte N-Düngung führte sowohl bei der anfälligen Apfel- als auch Kartoffelsorte zu einer leicht verringerten Pathogenanfälligkeit (vgl. Abbildung 33).

8.4 Konkurrenz zwischen Wachstum und Abwehr

Wie bereits mehrfach erwähnt, wurde die vorliegende Arbeit im Rahmen eines Sonderforschungsprojekts durchgeführt, das sich mit dem Konflikt des pflanzlichen Stoffwechsels zwischen dem Zwang zum Wachstum und dem Zwang zur Abwehr von biotischem Stress beschäftigt.

Die dem SFB 607 zugrunde liegende Theorie von HERMS und MATTSON (1992), dass eine gesteigerte Resistenz mit reduziertem Wachstum einhergeht, können die Ergebnisse nur teilweise und insbesondere für die schorfanfällige Sorte Golden Delicious bestätigen.

Wie bereits erläutert, sind vier von sieben Genen, die in Rewena stärker exprimiert waren als in Golden Delicious, vermutlich am Primärstoffwechsel beteiligt (Tabelle 18). Somit muss die vom SFB 607 vertretene Hypothese, dass Pathogenabwehr mit reduziertem Wachstum verbunden ist, für die Sorte Rewena abgelehnt werden (vgl. Abbildung 33). Möglicherweise gilt dieses Postulat also nur für quantitative und somit polygen bedingte Resistenzen bzw. für anfällige Sorten. Zur Klärung dieses Sachverhalts wären weitere Studien an Apfelsorten mit polygen vererbter *V. inaequalis*-Resistenz nötig. Detailliertere Aussagen zu Auswirkungen stärkeren Wachstums auf die Abwehr und Resistenz der Sorte Rewena waren in dieser Studie nur schwer möglich, da die Unterschiede in der N-Düngung zu gering ausfielen.

Aus der Literatur sind negative Korrelationen zwischen typischen Wachstums- und Abwehrgenen bekannt. MIRANDA et al. (2007) beispielsweise beobachteten in einer kompatiblen Interaktion zwischen Pappel und dem biotrophen Rostpilz *Melampsora medusae* eine Induktion von Flavonoidgenen bei gleichzeitig starker Repression von Photosynthesegenen und weiterer am Primärmetabolismus beteiligten Klone.

Bei einer näheren Betrachtung der APX- und CAD-Expressionen, also zweier Gene, die mit der Lignifizierung und in der Sorte Rewena möglicherweise mit der Schorfabwehr in Zusammenhang stehen, stellt man fest, dass die Klone in beiden N-Stufen ähnlich reagierten (vgl. Abbildung 33). In Freilandbäumen wurde zudem ein *dfr*-Gen in Rewena-N3-Blättern signifikant stärker exprimiert als in N1 (7.1.1.2). Stärker wachsende Rewena-Bäume investierten demnach nicht weniger in die Abwehr als schwächer wachsende Bäume, was die SFB-Hypothese für den resistenten Genotyp ebenfalls widerlegt.

In der schorfanfälligen Sorte Golden Delicious dagegen wurde ein vermutlich in die Flavonoidbiosynthese involviertes und damit möglicherweise an der Schorfabwehr beteiligtes Gen durch die *V. inaequalis*-Inokulation in weniger befallenen N1-Blättern stärker induziert als in N3-Blättern (Tabelle 19). In N1-Blättern von Golden Delicious-Freilandbäumen waren zudem ein PR-6 Gen sowie ein *fgt*-Klon signifikant stärker exprimiert als in N3 (7.1.1.2). Im Gegensatz zur monogen resistenten Sorte Rewena könnte damit die SFB-Hypothese der verringerten Resistenz bei gesteigertem Wachstum bei der anfälligen Sorte Golden Delicious ihre Gültigkeit besitzen (vgl. Abbildung 33). Allerdings wurden auch in Golden Delicious stress- und/oder abwehrtypische Gene gefunden, die in der stärker befallenen Variante N3 höher exprimiert waren als in N1, beispielsweise ein Klon mit Homologie zu einem Metallothionein-ähnlichen Gen (7.1.1.2). Ein weiterer Hinweis für die verringerte Abwehrbereitschaft in N-übersorgten Golden Delicious-Blättern stammt aus dem Vergleich zwischen schwach und stark infizierten Blättern: Vier Flavonoidgene sowie weitere stress- und/oder abwehrbeteiligte Klone wurden in N1-Blättern signifikant stärker exprimiert als in N3 (6.1.3.6).

8.5 *pal*- und *chs*-Genexpression und Phenolkonzentrationen

In früheren Studien wurden phenolische Inhaltsstoffe mehrfach mit der Schorfabwehr des Apfels in Verbindung gebracht: TREUTTER und FEUCHT (1990) und PICINELLI et al. (1995) beobachteten höhere Flavanolgehalte in *Vf*-resistenten Apfelsorten. MAYR et al. (1997) erreichten durch Inhibierung der Phenylpropanoidbiosynthese die Anfälligkeit einer resistenten Sorte. RÜHMANN et al. (2002) zeigten, dass N-induziertes starkes Sprosswachstum die Akkumulation phenolischer Inhaltsstoffe reduziert und gleichzeitig die *V. inaequalis*-Anfälligkeit von Apfelbäumen erhöht. LESER und TREUTTER (2005) beobachteten, dass N-induziertes gesteigertes Sprosswachstum sowohl in Golden Delicious als auch in Rewena zu verringerten Phenolgehalten im Blatt führte, aber lediglich in Golden Delicious die Schorfanfälligkeit erhöhte. Aufgrund all dieser Ergebnisse wurde auch in der vorliegenden Arbeit ein Schwerpunkt auf den Flavonoidmetabolismus gelegt.

Sowohl im Folienhaus- als auch im Freilandexperiment fiel mit beiden verwendeten Analysemethoden – Makroarray und qRT-PCR – eine starke Koregulation der *pal*- und *chs*-Expression sowie eine Abnahme in älteren Blättern auf. Die Genexpressionsabnahme mit steigendem Blattalter wurde in beiden Umwelten für die entsprechenden detektierbaren Endprodukte (Phloridzin sowie im Folienhaus zusätzlich Hydroxyzimtsäuren) nachvollzogen.

Darüberhinaus wurden weder im Folienhaus- noch im Freilandexperiment eindeutige Hinweise auf die Regulation der Flavonoide gewonnen. Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass eine alleinige Steuerung der Biosynthese auf Genebene vermutlich ausscheidet. Noch viele

andere Faktoren wie Substratverfügbarkeit und Enzymaktivitäten spielen hier eine womöglich ebenso wichtige Rolle. Außerdem ist der Einfluss von Transkriptionsfaktoren auf die Regulierung der Flavonoidbiosynthese nicht zu vernachlässigen. In diesem Zusammenhang sind beispielsweise Mitglieder der wrky- myb- oder bZip-Familien zu nennen, für die bereits eine Beteiligung an der Regulierung der Flavonoidbiosynthese bzw. einzelner Gene wie *pal* oder *chs* nachgewiesen wurde (DIXON et al. 2002). In der Genbank „WILD 2004“ besaß ein Klon höchste Homologie zu einem *bZip*-Gen aus *A. thaliana*. Für dieses Gen wurden mit Expressionsänderungen um den Wert 1 keine signifikanten Induktionen bzw. Repressionen beobachtet. In der Genbank „Rewena ontogenetisch“ wurde zudem ein Klon mit größter Homologie zu einem *myb1*-Gen aus *Malus xiaojinensis* gefunden. Während für diesen Klon im Freilandversuch ebenfalls keine signifikante Expressionsänderung auftrat, war es im Folienhausversuch in den Golden Delicious-Proben mit $p < 0,05$ signifikant stärker exprimiert als in den Rewena-Proben, allerdings lediglich mit einem Induktionsfaktor von 1,2. Zudem war das *myb*-Gen in jungen *V. inaequalis* inokulierten Golden Delicious-Blättern signifikant und um den Faktor 1,4 stärker exprimiert als in älteren inokulierten Blättern.

Die in beiden Umwelten relativ schwachen N-bedingten Unterschiede in den Phenolkonzentrationen bestätigten den bereits in den Expressionsstudien gewonnenen Eindruck von zu geringen Unterschieden der N-Düngegaben.

8.6 Hypothese über die Mechanismen der Schorfabwehr

Ein stark vereinfachtes Schaubild stellt die wichtigsten Ergebnisse der vorliegenden Studie zusammenfassend dar und entwirft eine Hypothese über die Mechanismen der Schorfabwehr in der anfälligen Sorte Golden Delicious und der resistenten Sorte Rewena (Abbildung 33):

Nach einer *V. inaequalis*-Inokulation findet zunächst in beiden Apfelsorten gleichermaßen die Keimung, Appressorienbildung und Penetration der Kutikula statt. Während das Pilzwachstum in der resistenten Sorte Rewena daraufhin gestoppt wird, werden in der anfälligen Sorte Golden Delicious Hyphen und schließlich Konidien und Konidiophoren gebildet. Nach etwa drei Wochen werden die ersten Krankheitssymptome sichtbar. Dementsprechend wurde in inokulierten Golden Delicious-Blättern zwischen 14 und 25 dpi ein sprunghafter Anstieg pilzlicher cDNA beobachtet, wohingegen in Rewena keine *V. inaequalis* cDNA nachgewiesen wurde. Während der Resistenzgrad von Rewena nicht durch die N-Düngung modifiziert wurde, führte erhöhte Düngung in Golden Delicious zu gesteigerter Anfälligkeit. In Rewena wurden Lignifizierungs- und Primärstoffwechselgene signifikant stärker exprimiert als in Golden Delicious, wobei sich unterschiedlich N-gedüngte Blätter ähnlich verhielten. Die Inokulation führte in Golden Delicious insbesondere in den weniger stark befallenen N1-Blättern zu einer verstärkten Expression von Abwehrgenen.

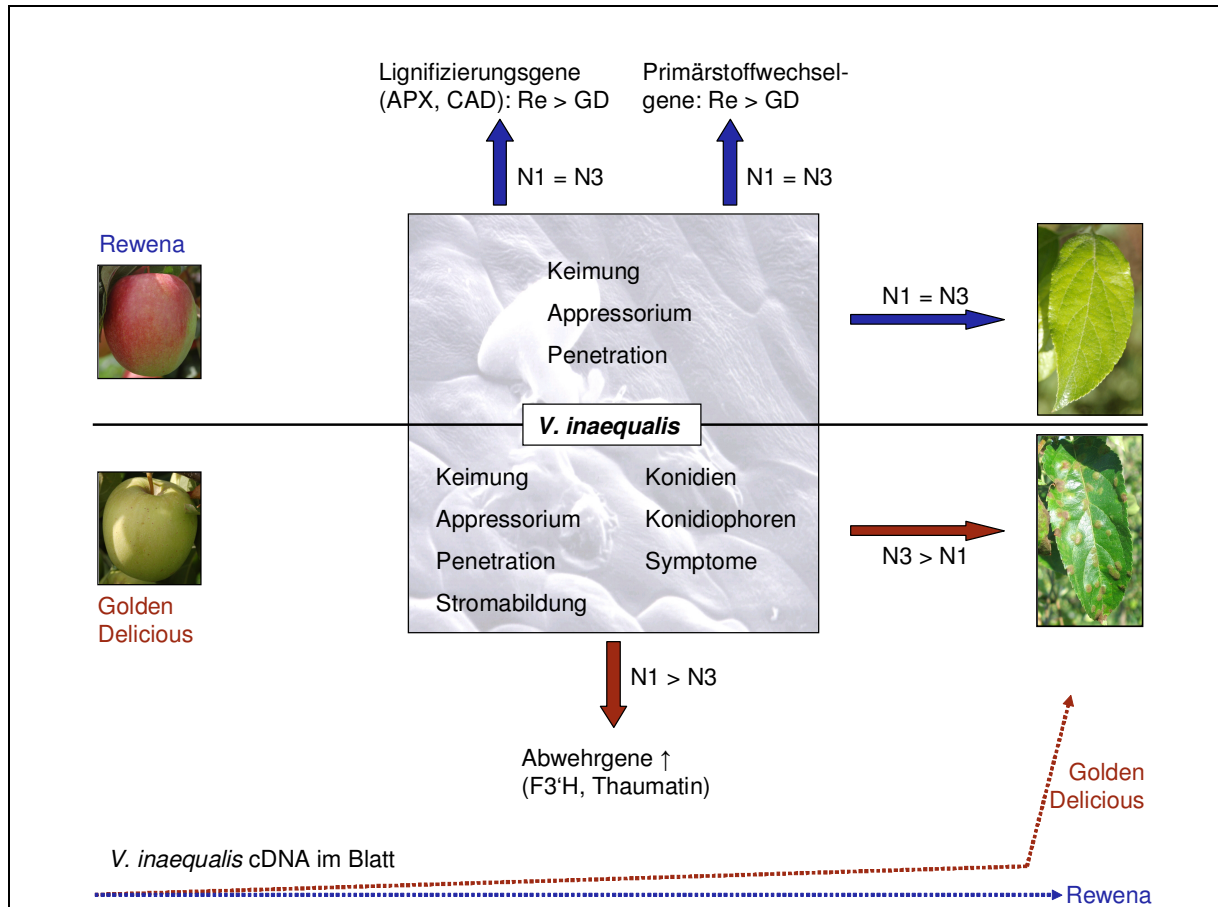


Abbildung 33 Hypothese über die Mechanismen der Schorfabwehr in der Vf-resistenten Apfelsorte Rewena und der anfälligen Sorte Golden Delicious. Gesteigerte N-Düngegaben (N3) erhöhen die Schorfanfälligkeit und verringern die Abwehrbereitschaft von Golden Delicious. Der Resistenzgrad der Sorte Rewena dagegen ist von der N-Düngung unbeeinflusst.

9 Zusammenfassung

Eine der weltweit bedeutendsten Apfelkrankheiten ist der durch den Pilz *V. inaequalis* verursachte Apfelschorf. In der vorliegenden Arbeit wurde die Pathogen-induzierte Genexpression in Blättern der schorfanfälligen Apfelsorte Golden Delicious und der resistenten Sorte Rewena untersucht. Zur weiteren Charakterisierung der Wirt-Pathogen-Interaktion wurden die Konzentrationen an abwehrbeteiligten phenolischen Inhaltsstoffen ermittelt. Durch eine Variierung der N-Düngung wurde zudem der Grad der Anfälligkeit der Sorte Golden Delicious modifiziert.

Die in dieser Studie erzielten Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Unter Verwendung von *V. inaequalis* spezifischen Primern gelang mittels qRT-PCR die Detektion und Quantifizierung von *V. inaequalis* cDNA in infizierten Apfelblättern. Die mit dieser Methode gemessenen Werte stimmen gut mit den Ergebnissen einer visuellen Schorfbonitur überein und verdeutlichen auf molekularer Ebene das langsame Wachstum des Schorfpilzes.
2. Aus vier verschiedenen subtraktiven cDNA-Banken wurden 1.536 Klone sequenziert, die für 838 Unigene codierten. Den größten Anteil an redundanten Genen machte ein Klon mit größter Homologie zu einem Metallothionein-ähnlichen AMT2-Gen aus *M. domestica* aus, der in der Genbank „Rewena ontogenetisch“ über 20 % aller sequenzierten Klone darstellte. Insgesamt wiesen 53,8 % aller sequenzierten Klone eine Homologie zu Sequenzen öffentlicher Genbanken auf. Aufgrund ihrer vermutlichen Funktion sowie aufgrund ihrer Expressionsmuster wurden 257 Gene für Genexpressionsanalysen mittels Makroarray ausgewählt.
3. Dreizehn Gene wiesen sowohl im Folienhaus als auch im Freiland einen signifikanten Sorteneffekt auf. In Rewena wurden neben Primärstoffwechselgenen zwei Klone verstärkt exprimiert, die Homologie zu Lignifizierungsgenen aufweisen und möglicherweise zur Bildung von so genanntem *defense lignin* führen. Die stärkere Expression der Primärstoffwechselgene deutet zudem darauf hin, dass die Resistenz der Sorte Rewena nicht auf Kosten des Wachstums geht.
4. Die größten Genexpressionsunterschiede wurden zwischen jungen und älteren Blättern ermittelt, wobei ältere Blätter insgesamt stärkere Expressionen aufwiesen. Zehn Gene wurden sowohl in Folienhaus- als auch in Freilandblättern signifikant reguliert. Am deutlichsten wurden Klone mit Homologie zu einem Blight-associated p12-Gen sowie zu zwei verschiedenen Metallothionein-Klonen stärker in älteren als in jungen Blättern

exprimiert. Möglicherweise stehen diese Gene in Zusammenhang mit ontogenetischer Resistenz.

5. Die schorfanfällige Sorte Golden Delicious exprimierte als Stress- und Abwehrreaktion auf die *V. inaequalis*-Inokulation ein Thaumatin codierendes Gen sowie ein vermutlich mit der Flavonoidbiosynthese in Zusammenhang stehendes Gen verstärkt, und zwar insbesondere in inokulierten N1-Blättern, die schwächer befallen waren als entsprechende N3-Blätter. Im Gegensatz zu Rewena (siehe Punkt 3) besitzt die Hypothese, dass gesteigertes Wachstum mit verringerter Abwehrbereitschaft einhergeht, damit für Golden Delicious möglicherweise ihre Gültigkeit.
6. Die Expressionen der beiden Schlüsselgene der Flavonoidbiosynthese, *pal* und *chs*, korrelierten stark miteinander und nahmen mit steigendem Blattalter ab. Eine ebenfalls in älteren Blättern beobachtete Reduktion des Gesamtphenolgehalts spricht für eine Beteiligung der *pal*- und *chs*-Transkripte an der Regulierung der Flavonoidbiosynthese.
7. Abschließend wurde eine Hypothese aufgestellt, nach der die Schorfabwehr der Vf-resistenten Sorte Rewena auf anderen Mechanismen beruht als die der anfälligen Sorte Golden Delicious.

10 Summary

Apple scab, caused by the fungus *V. inaequalis*, is one of the most damaging diseases in apple worldwide. In the present study, pathogen induced gene expression in leaves of the scab susceptible cultivar Golden Delicious and the resistant cultivar Rewena was analyzed. In order to further characterize the host-pathogen-interaction, the concentrations of defence-related phenolic compounds were examined. In addition, varying N-fertilization levels modified the degree of susceptibility of the cultivar Golden Delicious.

The following gives an overview of the most important results of this study:

1. Detection and quantification of *V. inaequalis* cDNA in infected apple leaves was performed by the use of sequence specific primers in qRT-PCRs. The results corresponded very well to the visible scab symptoms and expressed the slow fungal development on molecular level.
2. Out of four different subtractive cDNA-libraries 1,536 clones were sequenced coding for 838 unigenes. The most redundant clone had highest homology to a metallothionein-like AMT2 gene from *M. domestica* representing more than 20 % of all sequenced clones in the cDNA-library “Rewena ontogenetic”. Overall, 53.8 % of all clones exhibited homologies to sequences in publicly available gene banks. According to their putative function and expression profiles, 257 genes were selected for further gene expression analyses using macroarray.
3. Thirteen genes exhibited significant differences between the cultivars in the greenhouse as well as in the field. In addition to genes playing a role in primary metabolism, two clones associated with lignification and possibly leading to defence lignin were higher expressed in Rewena than in Golden Delicious. The higher expression of primary metabolism related genes indicates that Rewena is resistant despite higher inputs in growth.
4. Highest expression differences were detected between young and older leaves, with mostly higher expression in older leaves. Ten genes were significantly regulated in both environments. Amongst others, clones with homology to a blight-associated p12 gene and two different metallothionein-like genes were significantly higher expressed in older compared to young leaves. These genes might play a role in ontogenetic resistance.
5. In the scab susceptible cultivar Golden Delicious, the *V. inaequalis* inoculation led to an induction of clones with homology to a thaumatin-like gene and a clone probably involved in flavonoid metabolism. The gene induction was most obvious in N1 leaves

suggesting that – in contrast to Rewena (see number 3) – increased growth leads to decreased defence readiness in Golden Delicious.

6. The expression of the key genes within flavonoid biosynthesis, *pal* and *chs*, seemed strongly co-regulated and decreased with increasing leaf age. A reduction of total phenolics in older leaves suggested an involvement of the *pal*- and *chs*-transcripts in the regulation of flavonoid biosynthesis.
7. Finally, a hypothesis was proposed according to which the defence of the *Vf* resistant cultivar Rewena is based on different mechanisms than that of Golden Delicious.

11 Literaturverzeichnis

- AGRIOS GN, 1970: Plant Pathology, Second Printing. London, Academic Press Inc LTD.
- ALTSCHUL SF, W GISH, W MILLER, EW MYERS und DJ LIPMAN, 1990: Basic logical alignment sequence technique. *J Mol Biol* 215:403-410.
- BAGNI N und A TASSONI, 2001: Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. *Amino Acids* 20:301-317.
- BARNES WM, 1994: PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates. *Proc Natl Acad Sci* 91:2216-2220.
- BECK U, 2003: Differentielle RNA-Expression bei der Infektion von *Malus domestica cv Florina* durch *Venturia inaequalis*. Diplomarbeit, ETH Zürich.
- BELFANTI E, E SILFVERBERG-DILWORTH, S TARTARINI, A PATOCCHI, M BARBIERI, J ZHU, BA VINATZER, L GIANFRANCESCHI, C GESSLER und S SANSAVINI, 2004: The *HcrVf2* gene from a wild apple confers scab resistance to a transgenic cultivated variety. *Proc Natl Acad Sci* 101:886-890.
- BELL AA, 1981: Biochemical Mechanisms of Disease Resistance. *Ann Rev Plant Physiol* 32:21-81.
- BÉNAOUF G und L PARISI, 1997: Pathogenicity of *Venturia inaequalis* strains from *Malus floribunda* 821: comparison with race 6 on apple clones. In: Integrated Control of Pome Fruit Diseases. AM Berrie, XM Xu, DC Harries, AL Roberts, K Evans, DJ Barbara und C Gessler (Hrsg), Croydon, IOBC/WPRS Bull.
- BERKEN A, 2006: ROPs in the spotlight of plant signal transduction. *Cell Mol Life Sci* 63:2446-2459.
- BÖHM H, H BOEING, J HEMPEL, B RAAB und A KROKE, 1998: Flavonole, Flavone und Anthocyane als natürliche Antioxidantien der Nahrung und ihre mögliche Rolle bei der Prävention chronischer Erkrankung. *Z Ernährungswiss* 37:147-163.
- BOLLER T, 1993: Antimicrobial Functions of the Plant Hydrolases, Chitinase and β -1,3-Glucanase. In: Mechanisms of Plant Defense Responses. B Fritig und M Legrand (Hrsg), Dordrecht, Kluwer Academic Publishers.
- BONGUE-BARTELSMAN M und DA PHILLIPS, 1995: Nitrogen stress regulates gene expression of enzymes in the flavonoid biosynthetic pathway of tomato. *Plant Phys Biochem* 33:539-546.
- BOS JL, 1997: Ras-like GTPases. *Biochim Biophys Acta* 1333:M19-M31.
- BROGGINI G, B LE CAM, A PATOCCHI und C GESSLER, 2006: Avirulence genes of *Venturia inaequalis*. In: Pome Fruit Health Research in Europe: Current Status 2006. K Stich, R Steffek, H Halbwirth und U Persen (Hrsg), TU Wien.
- BRYANT JP, FS CHAPIN und DR KLEIN, 1983: Carbon/nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory. *Oikos* 40:357-368.
- BUCHANAN-WOLLASTON V, 1994: Isolation of cDNA clones for genes that are expressed during leaf senescence in *Brassica napus*. *Plant Physiol* 105:839-846.
- BUS V, C RANATUNGA, S GARDINER, H BASSETT und E RIKKERINK, 2005: Marker assisted selection for pest and disease resistance in the New Zealand apple breeding programme. *Acta Hort* 538:541-547.
- CALENGE F, A FAURE, M GOERRE, C GEBHARDT, WE VAN DE WEG, L PARISI und CE DUREL, 2004: Quantitative trait loci (QTL) analysis reveals both broad-spectrum and isolate-specific QTL for scab resistance in an apple progeny challenged with eight isolates of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 94:370-379.

- CALMBACH M, 2005: Einfluss von Stickstoff auf das vegetative und generative Wachstum von ‚Rewena‘ und ‚Golden Delicious‘. Diplomarbeit, TU München Weihenstephan.
- CASTELLANO E, J DE LAS RIVAS, C GUERRERO und E SANTOS, 2007: Transcriptional networks of knockout cell lines identify functional specificities of H-Ras and N-Ras: significant involvement of N-Ras in biotic and defense responses. *Oncogene* 26:917-933.
- CECCARDI GL, GA BARTHE und KS DERRICK, 1998: A novel protein associated with citrus blight has sequence similarities to expansin. *Plant Mol Biol* 38:775-783.
- CHANG S, J PURYEAR und J CAIRNEY, 1993: A simple and efficient method for isolating RNA from Pine Trees. *Plant Mol Biol Rep* 11:113-116.
- CHARRIER B, H TRINH, S POIRIER, A KONDOROSI und P RATET, 1998: Flavanone 3-hydroxylase (F3H) Expression and Flavonoid Localization in Nodules of Three Legume Plants Reveal Distinct Tissue Specificities. *Mol Plant-Microbe Interact* 11:924-932.
- CHURCH GM und W GILBERT, 1984: Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci* 81:1991-1995.
- COELHO AC, M HORTA, D NEVES und A CRAVADOR, 2006: Involvement of a cinnamyl alcohol dehydrogenase of *Quercus suber* in the defence response to *Phytophthora cinnamomi*. *Physiol Mol Plant Pathol* 69:62-72.
- COUPE SA, JE TAYLOR und JA ROBERTS, 1995: Characterisation of an mRNA encoding a metallothionein-like protein that accumulates during ethylene-promoted abscission of *Sambucus nigra* L. leaflets. *Planta* 197:442-447.
- CUI X und GA CHURCHILL, 2003: Statistical tests for differential expression in cDNA microarray experiments. *Genome Biol* 4:210.1-210.10.
- CZECHOWSKI T, RP BARI, M STITT, W SCHEIBLE und MK UDVARDI, 2004: Real-time RT-PCR profiling of over 1400 Arabidopsis transcription factors: unprecedented sensitivity reveals novel root- and shoot-specific genes. *Plant J* 38:336-379.
- DA CUNHA A, 1987: The estimation of L-phenylalanine ammonia-lyase shows phenylpropanoid biosynthesis to be regulated by L-phenylalanine supply and availability. *Phytochemistry* 26:2723-2727.
- DALLAS PB, NG GOTTARDO, MJ FIRTH, AH BEESLEY, K HOFFMANN, PA TERRY, JR FREITAS, JM BOAG, AJ CUMMINGS und UR KEES, 2005: Gene expression levels assessed by oligonucleotide microarray analysis and quantitative real-time RT-PCR – how well do they correlate? *BMC Genomics* 6:59.
- Dean RA, NJ Talbot, DJ Ebbole, ML Farman, TK Mitchell, MJ Orbach, M Thon, R Kulkarni, J-R Xu, H Pan, ND Read, Y-H Lee, I Carbone, D Brown, Y Yee Oh, N Donofrio, J Seop Jeong, DM Soanes, S Djonovic, E Kolomiets, C Rehmeyer, W Li, M Harding, S Kim, M-H Lebrun, H Bohnert, S Coughlan, J Butler, S Calvo, L-J Ma, R Nicol, S Purcell, C Nusbaum, JE Galagan und BW Birren, 2005: The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Nature* 434:980-986.
- DEGENHARDT J, AN AL-MASRI, S KURKCUOGLU, I SZANKOWSKI und AE GAU, 2005: Characterization by suppression subtractive hybridization of transcripts that are differentially expressed in leaves of apple scab-resistant and susceptible cultivars of *Malus domestica*. *Mol Genet Genomics* 273:326-335.
- DELMER DP und TS POTIKHA, 1997: Structures and functions of annexins in plants. *Cell Mol Life Sci* 53:546-553.
- DIXON RA, L ACHNINE, P KOTA, C-J LIU, MSS REDDY und L WANG, 2002: The phenylpropanoid pathway and plant defence – a genomics perspective. *Mol Plant Pathol* 3:371-390.

- DOUKHANINA EV, S CHENG, E VAN DER ZALM, A GODZIK, J REED und MB DICKMAN, 2006: Identification and Functional Characterization of the BAG Protein Family in *Arabidopsis thaliana*. J Biol Chem 281:18793-18801.
- DUREL CE, L PARISI, F LAURENS, WE VAN DE WEG, R LIEBHARD und MF JOURJON, 2003: Genetic dissection of partial resistance to race 6 of *Venturia inaequalis* in apple. Genome 46:224-234.
- FAIZE M, L FAIZE, M ISHIZAKA und H ISHII, 2004: Expression of potential defense responses of Asian and European pears to infection with *Venturia nashicola*. Physiol Mol Plant Pathol 64:319-330.
- FALK SP, DM GADOURY und RC SEEM, 1996: Impact of ontogenic resistance and fenarimol on seasonal development of scab on apple foliage. (Abstr) Phytopathology 86(suppl):85-86.
- FISCHER C und M FISCHER, 1996: Results in apple breeding at Dresden-Pillnitz - A review. Gartenbauwissenschaft 61:139-146.
- FISCHER C, 1998: Development of apple fruit quality within the resistance breeding program. Acta Hort 466:139-142.
- FISCHER TC, H HALBWIRTH, S ROEMMELT, E SABATINI, K SCHLANGEN, C ANDREOTTI, F SPINELLI, G COSTA, G FORKMANN, D TREUTTER und K STICH, 2006: Induction of polyphenol gene expression in apple (*Malus x domestica*) after the application of a dioxygenase enzyme inhibitor. Physiol Plant 128:604-617.
- FLOR HH, 1956: The complementary genic systems in flax and flax rust. Adv Genet 8:29-54.
- FORKMANN G und W HELLER, 1999: Biosynthesis of Flavonoids. In: Comprehensive Natural Products Chemistry Vol 1. Barton D und K Nakanishi (Hrsg), Amsterdam, Elsevier.
- FREIFELDER D, 1982: Physical biochemistry: applications to biochemistry and molecular biology. New York, Freeman WH und Co.
- FRITZ C, N PALACIOS-ROJAS, R FEIL und M STITT, 2006: Regulation of secondary metabolism by the carbon-nitrogen status in tobacco: nitrate inhibits large sectors of phenylpropanoid metabolism. Plant J 46:533-548.
- GADOURY DM, RC SEEM, A STENSVAND und SP FALK, 1996: Minimum criteria for infection by *Venturia inaequalis*, and severity of scab at different phenological stages. (Abstr) Phytopathology 86(suppl):122.
- GALLIANO H, M CABANÉ, C ECKERSKORN, F LOTTSPEICH, H SANDERMANN und D ERNST, 1993: Molecular cloning, sequence analysis and elicitor-/ozone-induced accumulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase from Norway spruce (*Picea abies* L.). Plant Mol Biol 23:145-156.
- GAO ZS, WE VAN DE WEG, JG SCHAART, HJ SCHOUTEN, DH TRAN, LP KODDE, IM VAN DER MEER, AHM VAN DER GEEST, J KODDE, H BREITENEDER, K HOFFMANN-SOMMERGRUBER, D BOSCH und LJWJ GILISSEN, 2005: Genomic cloning and linkage mapping of the Mal d 1 (PR-10) gene family in apple (*Malus domestica*). Theor Appl Genet 111:171-183.
- GARCÍA-HERNÁNDEZ M, A MURPHY und L TAIZ, 1998: Metallothioneins 1 and 2 Have Distinct but Overlapping Expression Patterns in *Arabidopsis*. Plant Physiol 118:387-397.
- GARCÍA-OLMEDO F, A MOLINA, A SEGURA und M MORENO, 1995: The defensive role of nonspecific lipid-transfer proteins in plants. Trends Microbiol 3:72-74.
- GAU AE, M KOUTB, M PITROWSKI und K KLOPPSTECH, 2004: Accumulation of pathogenesis-related proteins in the apoplast of a susceptible cultivar of apple (*Malus domestica* cv. Elstar) after infection by *Venturia inaequalis* and constitutive expression of PR genes in the resistant cultivar Remo. Europ J Plant Pathol 110:703-711.

- GOODMAN RN und AJ NOVACKY, 1994: The Hypersensitive Reaction in Plants to Pathogens. St Paul, APS Press.
- GOSCH C, H HALBWIRTH und K STICH, 2006: Cloning and heterologous expression of cDNAs involved in the biosynthesis of phloretin and phloridzin in apple (*Malus domestica*). In: Pome Fruit Health Research in Europe: Current Status 2006. K Stich, R Steffek, H Halbwirth und U Persen (Hrsg), TU Wien.
- GRAF BA, PE MILBURY und JB BLUMBERG, 2005: Flavonols, Flavones, Flavanones, and Human Health: Epidemiological Evidence. *J Med Food* 8:281-290.
- GRAND C, F SARNI und C LAMB, 1987: Rapid induction by fungal elicitor of the synthesis of cinnamyl alcohol dehydrogenase, a specific enzyme of lignin synthesis. *Eur J Biochem* 169:73-77.
- GYGAX M L GIANFRANCESCHI, R LIEBHARD, M KELLERHALS, C GESSLER und A PATOCCHI, 2004: Molecular markers linked to the apple scab resistance gene *Vbj* derived from *Malus baccata jackii*. *Theor Appl Genet* 109:1702-1709.
- HABEREDER H, G SCHRÖDER und J EBEL, 1989: Rapid induction of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNAs during fungus infection of soybean (*Glycine max* L.) roots or elicitor treatment of soybean cell cultures at the onset of phytoalexin synthesis. *Planta* 177:58-65.
- HAHLBROCK K und D SCHEEL, 1989: Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Ann Rev Plant Physiol* 40:347-369.
- HAMMERSCHMIDT R, 1999: Phytoalexins: What Have We Learned After 60 Years? *Annu Rev Phytopathol* 37:285-306.
- HAWKINS S und A BOUDET, 2003: 'Defense lignin' and hydroxycinnamyl alcohol dehydrogenase activities in wounded *Eucalyptus gunnii*. *Forest Pathol* 33:91-104.
- HELLEMANS J, G MORTIER, A DE PAEPE, F SPELEMAN und J VANDESOMPELE, 2007: qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of *real-time* quantitative PCR data. *Genome Biol* 8:R19.1-R19.14.
- HELLER W und G FORKMANN, 1994: Biosynthesis of Flavonoids. In: The Flavonoids. Harborne JB (Hrsg), London, Chapman & Hall.
- HEMMAT M, SK BROWN, HS ALDWINCKLE, SA MEHLENBACHER und NF WEEDEN, 2003: Identification and mapping of markers for resistance to apple scab from 'Antonovka' and 'Hansens's baccata #2'. *Acta Hort* 622:153-161.
- HERMS DA und WJ MATTSON, 1992: The dilemma of plants – to grow or defend. *Q Rev Biol* 67:283-335.
- HERNANDEZ CASTILLO D, 1990: La tavelure du pommier. *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. Etude du pouvoir pathogène des races 1 et 5 et essai de lutte raisonnée. Dissertation, Universität Nantes.
- HILT P, A SCHIEBER, C YILDIRIM, G ARNOLD, I KLAIBER, J CONRAD, U BEIFUSS und R CARLE, 2003: Detection of Phloridzin in Strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.) by HPLC-PDA-MS/MS and NMR Spectroscopy. *J Agric Food Chem* 51:2896-2899.
- HOLTON TA, F BRUGLIERA, DR LESTER, Y TANAKA, CD HYLAND, JGT MENTING, C-Y LU, E FARCY, TW STEVENSON und EC CORNISH, 1993: Cloning and expression of P450 genes controlling flower colour. *Nature* 366:276-279.
- HUGGETT J, K DHEDA, S BUSTIN und A ZUMLA, 2005: *Real-time* RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun* 6:279-284.
- HUNTER LD, 1975: Phloridzin and apple scab. *Phytochemistry* 14:1519-1522.
- JONES CG und SE HARTLEY, 1999: A protein competition model of phenolic allocation. *Oikos* 86:27-44.
- KADER JC, 1996: Lipid-transfer proteins in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47:627-654.

- KASUKABE Y, L HE, K NADA, S MISAWA, I IHARA und S TACHIBANA, 2004: Overexpression of Spermidine Synthase Enhances Tolerance to Multiple Environmental Stresses and Up-Regulates the Expression of Various Stress-Regulated Genes in Transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 45:712-722.
- KATAGIRI F, 2004: A global view of defense gene expression – a highly interconnected network. *Curr Opin Plant Biol* 7:506-511.
- KELLERHALS M, C KESPER, B KOLLER und C GESSLER, 2002: Breeding apples with durable disease resistance. In: 10th International Conference on Cultivation Technique and Phytopathological Problems in Organic Fruit Growing and Viticulture. FÖKO e.V. (Hrsg), Weinsberg.
- KIM S, I-P AHN und Y-H LEE, 2001: Analyses of Genes Expressed During Rice-*Magnaporthe grisea* Interactions. *Mol Plant-Microbe Interact* 14:1340-1346.
- KOELLER W, DM PARKER und CM BECKER, 1991. Role of cutinase in the penetration of apple leaves by *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 81:1375-1379.
- KOLBE W, 1987: Untersuchungen über das Auftreten des Apfelschorfs (1950-1987). *Rhein Monatsschr Gemüse Obst Zierpflanzen* 75:584-587.
- KORSMEYER SG, 1995: Regulators of cell death. *Trends Genet* 11:101-105.
- KOUKOL J und EE KONN, 1961: The metabolism of aromatic compounds in higher plants, IV. Purification and properties of the phenylalanine deaminase of *Hordeum vulgare*. *J Biol Chem* 236:2692-2698.
- KOUTB M, 2006: Functional analyses on the nonspecific lipid transfer protein (nsLTP) of apple (*Malus domestica*). Dissertation, Universität Hannover.
- KUTSUKI H, M SHIMADA und T HIGUCHI, 1982: Regulatory role of cinnamyl alcohol dehydrogenase in the formation of guaiacyl and syringyl lignins. *Phytochemistry* 21:19-23.
- LAXALT AM, RO CASSIA, PM SANLLORENTI, EA MADRID, AB ANDREU, GR DALEO, RD CONDE und L LAMATTINA, 1996: Accumulation of cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase RNA under biological stress conditions and elicitor treatments in potato. *Plant Mol Biol* 30:961-972.
- LESER C und D TREUTTER, 2005: Effects of nitrogen supply on growth, contents of phenolic compounds and pathogen (scab) resistance of apple trees. *Physiol Plantarum* 123:49-56.
- LI B und X XU, 2002: Infection and Development of Apple Scab (*Venturia inaequalis*) on Old Leaves. *J Phytopathology* 150:687-691.
- LIEBHARD R, B KOLLER, L GIANFRANCESCHI und C GESSLER, 2003: Creating a saturated reference map for the apple (*Malus x domestica* Borkh.) genome. *Theor Appl Genet* 106:1497-1508.
- LUX-ENDRICH A, D TREUTTER und W FEUCHT, 2000: Influence of nutrients and carbohydrate supply on the phenol composition of apple shoot cultures. *Plant Cell* 60:15-21.
- Maliepaard C, FH Alston, G Van Arkel, LM Brown, E Chevreau, F Dunemann, KM Evans, S Gardiner, P Guilford, AW Van Heusden, J Janse, F Laurens, JR Lynn, AG Manganaris, APM Den Nijs, N Periam, E Rikkerink, P Roche, C Ryder, S Sansavini, H Schmidt, S Tartarini, JJ Verhaegh, M Vrieling-Van Ginkel und GJ King, 1998: Aligning male and female linkage maps of apple (*Malus pumila* Mill.) using multi-allelic markers. *Theor Appl Genet* 97:60-73.
- MARGNA U, 1977: Control at the level of substrate supply - an alternative in the regulation of phenylpropanoid accumulation in plant cells. *Phytochemistry* 16:419-426.
- MATYSSEK R, R AGERER, D ERNST, JC MUNCH, W OSSWALD, H PRETZSCH, E PRIESACK, H SCHNYDER und D TREUTTER, 2005: The plant's capacity in regulating resource demand. *Plant Biol* 7:560-580.

- MAXSON-STEIN K, H SHENG-YANG, R HAMMERSCHMIDT und AL JONES, 2002: Effect of Treating Apple Trees with Acibenzolar-S-Methyl on Fire Blight and Expression of Pathogenesis-Related Protein Genes. *Plant Dis* 86:785-790.
- MAYR U, D TREUTTER, C SANTOS-BUELGA, H BAUER und W FEUCHT, 1995: Developmental Changes in the Phenol Concentrations of 'Golden Delicious' Apple Fruits and Leaves. *Phytochemistry* 38:1151-1155.
- MAYR U, S MICHALEK, D TREUTTER und W FEUCHT, 1997: Phenolic Compounds of Apple and their Relationship to Scab Resistance. *J Phytopathol* 145:69-75.
- MCNALLY MT und SJ FREE, 1988: Isolation and characterization of a *Neurospora* glucose-repressible gene. *Curr Genet* 14:545-551.
- MCQUEEN-MASON S, DM DURACHKO und DJ COSGROVE, 1992: Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. *Plant Cell* 4:1425-1433.
- MENU-BOUAOUICHE L, C VRIET, WJ PEUMANS, A BARRE, EJM VAN DAMME und P ROUGÉ, 2003: A molecular basis for the endo- β 1,3-glucanase activity of the thaumatin-like proteins from edible fruits. *Biochimie* 85:123-131.
- MICHALEK S, C KLEBEL und D TREUTTER, 2005: Stimulation of Phenylpropanoid Biosynthesis in Apple (*Malus domestica* Borkh.) by Abiotic Elicitors. *Europ J Hort Sci* 70:116-120.
- MILLS WD und AA LAPLANTE, 1951: Diseases and insects in the orchard. *Cornell Ext Bull* 711:21-27.
- MIRANDA M, SG RALPH, R MELLWAY, R WHITE, MC HEATH, J BOHLMANN und CP CONSTABEL, 2007: The Transcriptional Response of Hybrid Poplar (*Populus trichocarpa* x *P. deltoides*) to Infection by *Melampsora medusae* Leaf Rust Involves Induction of Flavonoid Pathway Genes Leading to the Accumulation of Proanthocyanidins. *Mol Plant-Microbe Interact* 20:816-831.
- MITCHELL HJ, JL HALL und MS BARBER, 1994: Elicitor-induced cinnamyl alcohol dehydrogenase activity in lignifying wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. *Plant Physiol* 104:551-556.
- MITTAG M, D-H LEE und JW HASTINGS, 1994: Circadian expression of the luciferin-binding protein correlates with the binding of a protein to the 3' untranslated region of its mRNA. *Proc Natl Acad Sci* 91:5257-5261.
- MITTLER R, E LAM, V SHULAEV und M COHEN, 1999: Signals controlling the expression of cytosolic ascorbate peroxidase during pathogen-induced programmed cell death in tobacco. *Plant Mol Biol* 39:1025-1035.
- MORIGUCHI T, M KITA, S HISADA, T ENDO-INAGAKI und M OMURA, 1998: Characterization of gene repertoires at mature stage of citrus fruits through random sequencing and analysis of redundant metallothionein-like genes expressed during fruit development. *Gene* 211:221-227.
- MOYLE R, DJ FAIRBAIRN, J RIPI, M CROWE und JR BOTELLA, 2005: Developing pineapple fruit has a small transcriptome dominated by Metallothionein. *J Exp Botany* 56:101-112.
- MÜHL F, 2001: Alte und neue Apfelsorten. München, Obst- und Gartenbauverlag.
- MÜLLER KO und H BORGER, 1940: Experimentelle Untersuchungen über die *Phytophthora infestans*-Resistenz der Kartoffel. *Arb Biol Reichsanst Land Forstwirtschaft* 23:189-231.
- NAFUSSI B, S BEN-YEHOSHUA, V RODOV, J PERETZ, BK OZER und G D'HALLEWIN, 2001: Mode of action of hot-water dip in reducing decay of lemon fruit. *J Sci Food Chem* 49:107-113.
- NOVEROSKE RL, J KUC und EB WILLIAMS, 1964: Oxidation of phloridzin and phloretin related to resistance of *Malus* to *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 54:92-97.
- PARISI L, Y LESPINASSE, J GUILLAUMES und J KRUGER, 1993: A New Race of *Venturia inaequalis* Virulent to Apples with Resistance Due to the *Vf* Gene. *Phytopathology* 83:533-537.

- PARISI L und Y LESPINASSE, 1996: Pathogenicity of *Venturia inaequalis* strains of race 6 on apple clones (*Malus* sp). Plant Dis 80:1179-1183.
- PARK S und K-H HAN, 2003: An auxin-repressed gene (*RpARP*) from black locust (*Robinia pseudoacacia*) is posttranscriptionally regulated and negatively associated with shoot elongation. Tree Physiol 23:815-823.
- PATOCCHI A, B BIGLER, B KOLLER, M KELLERHALS und C GESSLER, 2004: *Vr₂*: a new apple scab resistance gene. Theor Appl Genet 109:1087-1092.
- PATOCCHI A, M WALSER, S TARTARINI, GAL BROGGINI, F GENNARI, S SANSAVINI und C GESSLER, 2005: Identification by genome scanning approach (GSA) of a microsatellite tightly associated with the apple scab resistance gene *Vm*. Genome 48:630-636.
- PICINELLI A, E DAPENA und JJ MANGAS, 1995: Polyphenolic Pattern in Apple Tree Leaves in Relation to Scab Resistance. A Preliminary Study. J Agric Food Chem 43:2273-2278.
- PLUTHERO FG, 1993: Rapid purification of high-activity Taq DNA polymerase. Nucl Acids Res 21:4850-4851.
- POUPARD P, L PARISI, C CAMPION, S ZIADI und P SIMONEAU, 2003: A wound- and etephon-inducible PR-10 gene subclass from apple is differentially expressed during infection with a compatible and an incompatible race of *Venturia inaequalis*. Physiol Mol Plant Pathol 62:3-12.
- PUEHRINGER H, D MOLL, K HOFFMANN-SOMMERGRUBER, B WATILLON, H KATINGER und M LAIMER DA CAMARA MACHADO, 2000: The promoter of an apple Ypr10 gene, encoding the major allergen Mal d 1, is stress- and pathogen-inducible. Plant Sci 152:35-50.
- QUACKENBUSH J, 2001: Computational analysis of microarray data. Nat Rev Genet 2:418-427.
- QUAST P, 1986: Düngung, Bewässerung und Bodenpflege im Obstbau. Stuttgart, Eugen Ulmer Verlag.
- RAA J, 1974: Polyphenols and natural resistance of apple leaves against *Venturia inaequalis*. Neth J Plant Pathol (suppl 1):37-45.
- RADONIĆ A, S THULKE, IM MACKAY, O LANDT, W SIEGERT und A NITSCHKE, 2004: Guideline to reference gene selection for quantitative *real-time* PCR. Biochem Biophys Res Commun 313:856-862.
- RAJEEVAN MS, DG RANAMUKHAARACHCHI, SD VERNON und ER UNGER, 2001: Use of real-time quantitative PCR to validate the results of cDNA array and differential display PCR technologies. Methods 25:443-451.
- RAUSER WE, 1999: Structure and function of metal chelators produced by plants – The case for organic acids, amino acids, phytin, and metallothioneins. Cell Biochem Biophys 31:19-48.
- REDDY ASN und BW POOVAIAH, 1990: Molecular cloning and sequencing of a cDNA for an auxin-repressed messenger-RNA – correlation between fruit growth and repression of the auxinregulated gene. Plant Mol Biol 14:127-136.
- REID SJ und GS ROSS, 1997: Up-regulation of two cDNA clones encoding metallothionein-like proteins in apple fruit during cool storage. Physiol Plant 100:183-189.
- RENAULT AS, A DELOIRE, I LETINOIS, E KRAEVA, C TESNIERE, A AGEORGES, C REDON und J BIERNE, 2000: beta-1,3-glucanase gene expression in grapevine leaves as a response to infection with *Botrytis cinerea*. Am J Enol Viticult 51:81-87.
- ROS B, 2004: Analyse der differentiellen Genexpression der Kartoffel gegenüber biotischen und abiotischen Stressoren. Dissertation, TU München Weihenstephan.
- ROS B, F THUEMMLER und G WENZEL, 2004: Analysis of differentially expressed genes in a susceptible and moderately resistant potato cultivar upon *Phytophthora infestans* infection. Mol Plant Pathol 5:191-201.

- ROUSSELLE GL, EB WILLIAMS und LF HOUGH, 1974: Modification of the level of resistance to apple scab from the *Vf* gene. In: Proceedings of the XIX international horticulture congress III. R Antoszewski, L Harrison und J Nowosielski (Hrsg), Warszawa. (Zitiert in BELFANTI et al. 2004).
- ROWLAND O, AA LUDWIG, CJ MERRICK, F BAILLIEUL, FE TRACY, WE DURRANT, L FRITZ-LAYLIN, V NEKRASOV, K SJÖLANDER, H YOSHIOKA und JDG JONES, 2005: Functional Analysis of *Avr9/Cf-9* Rapidly Elicited Genes Identifies a Protein Kinase, ACIK1, That Is Essential for Full Cf-9-Dependent Disease Resistance in Tomato. *Plant Cell* 17:295-310.
- RÜHMANN S, C LESER, M BANNERT und D TREUTTER, 2002: Relationship Between Growth, Secondary Metabolism, and Resistance of Apple. *Plant Biol* 4:137-143.
- SALM H und K GEIDER, 2004: *Real-time* PCR for detection and quantification of *Erwinia amylovora*, the causal agent of fireblight. *Plant Pathol* 53:602-610.
- SANCHO AI, R FOXALL, T BROWNE, R DEY, L ZUIDMEER, G MARZBAN, KW WALDRON, R VAN REE, K HOFFMANN-SOMMERGRUBER, M LAIMER und ENC MILLS, 2006: Effect of postharvest storage on the expression of the apple allergen Mal d 1. *J Agr Food Chem* 54:5917-5923.
- SCHMELLER T, B LATZ-BRÜNING und M WINK, 1997: Biochemical activities of berberine, palmatine and sanguinarine mediating chemical defence against microorganisms and herbivores. *Phytochemistry* 44:257-266.
- SELITRENNIKOFF CP, 2001: Antifungal Proteins. *Appl Environ Microbiol* 67:2883-2894.
- STAFSTROM JP, BD RIPLEY, ML DEVITT und B DRAKE, 1998: Dormancy-associated gene expression in pea axillary buds. *Planta* 205:547-552.
- STEINER C, J BAUER, N AMRHEIN und M BUCHER, 2003: Two novel genes are differentially expressed during early germination of the male gametophyte of *Nicotiana tabacum*. *Biochim Biophys Acta* 1625:123-133.
- STICH K, T EIDENBERGER, F WURST und G FORKMANN, 1992: Flavonol synthase activity and the regulation of flavonol and anthocyanin biosynthesis during flower development in *Dianthus caryophyllus* L. (Carnation). *Z Naturforsch* 47:553-560.
- STINTZI A, T HEITZA, V PRASADB, S WIEDEMANN-MERDINOGLU, S KAUFFMANNA, P GEOFFROYA, M LEGRANDA und B FRITIG, 1993: Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie* 75:687-706.
- STRISSEL T, H HALBWIRTH, U HOYER, C ZISTLER, K STICH und D TREUTTER, 2005: Growth Promoting Nitrogen Nutrition Affects Flavonoid Biosynthesis of Young Apple (*Malus domestica* Borkh.) Leaves. *Plant Biol* 7:677-685.
- STÜRZENBAUM SR und P KILLE, 2001: Control genes in quantitative molecular biological techniques: the variability of invariance. *Comparative Biochem Physiol Part B* 130:281-289.
- SUZUKI T, PJ HIGGINS und DR CRAWFORD, 2000: Control selection for RNA quantitation. *Biotechniques* 29:332-337.
- TARTARINI S, F GENNARI, D PRATESI, C PALAZZETTI, S SANSAVINI, L PARISI, A FOUILLET, V FOUILLET und CE DUREL, 2004: Characterisation and genetic mapping of a major scab resistance gene from the old Italian apple cultivar 'Durello di forli'. *Acta Hort* 663:129-133.
- THELLIN O, W ZORZI, B LAKAYE, B DE BORMAN, B COUMANS, G HENNEN, T GRISAR, A IGOUT und E HEINEN, 1999: Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnology* 75:291-295.
- TREUTTER D, 1989: Chemical reaction detection of catechins and proanthocyanidins with *p*-dimethylaminocinnamaldehyde. *J Chromatogr* 467:185-193.

- TREUTTER D und W FEUCHT, 1990: The pattern of flavan-3-ols in relation to scab resistance of apple cultivars. *J Hort Sci* 65:511-517.
- TREUTTER D, 2001: Biosynthesis of phenolic compounds and its regulation in apple. *Plant Growth Reg* 34:71-89.
- VAN DER BIEZEN EA, J SUN, MJ COLEMAN, MJ BIBB und JDG JONES, 2000: *Arabidopsis* RelA/SpoT homologs implicate (p)ppGpp in plant signaling. *Proc Natl Acad Sci* 97:3747-3752.
- VAN LOON LC und EA VAN STRIEN, 1999: The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol Mol Plant Pathol* 55:85-97.
- VAN LOON LC, M REP und CMJ PIETERSE, 2006: Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annu Rev Phytopathol* 44:135-162.
- VALENTINES MC, R VILAPLANA, R TORRES, J USALL und C LARRIGAUDIÈRE, 2005: Specific roles of enzymatic browning and lignification in apple disease resistance. *Postharvest Biol Tec* 36:227-234.
- VANCE CP, TK KIRK und RT SHERWOOD, 1980: Lignification as a mechanism of disease resistance. *Ann Rev Phytopathol* 18:259-288.
- VANDESOMPELE J, K DE PRETER, F PATTYN, B POPPE, N VAN ROY, A DE PAEPE und F SPELEMAN, 2002: Accurate normalization of *real-time* quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3:0034.1-0034.11.
- VANEK-KREBITZ M, K HOFFMANN-SOMMERGRUBER, M LAIMER DA CAMARA MACHADO, M SUSANI, C EBNER, D KRAFT, O SCHEINER und H BREITENEDER, 1995: Cloning and sequencing of Mal d 1, the major allergen from apple (*Malus domestica*), and its immunological relationship to Bet v 1, the major birch pollen allergen. *Biochem Biophys Res Commun* 214:538-551.
- VENISSE JS, M MALNOY, M ZAIZE, JP PAULIN und MN BRISSET, 2002: Modulation of defense responses of *Malus* spp. during compatible and incompatible interactions with *Erwinia amylovora*. *Mol Plant-Microbe Interact* 15:1204-1212.
- WATZL G und B RECHKEMMER, 2001: Flavonoide. *Ernährungs-Umschau* 48:498-502.
- WILD M, 2004: Differentielle Genexpression beim Apfel (*Malus domestica*) nach der Infektion mit *Venturia inaequalis*. Diplomarbeit, TU München Weihenstephan.
- WILLIAMS EB und JR SHAY, 1957: The relationship of genes for pathogenicity and certain other characters in *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. *Genetics* 42:704-711.
- WILLIAMS EB und J KUC, 1969: Resistance in *Malus* to *Venturia inaequalis*. *Annu Rev Phytopathol* 7:223-246.
- WINKEL-SHIRLEY B, 2002: Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr Opin Plant Biol* 5:218-223.
- WOLFINGER RD, G GIBSON, E WOLFINGER, L BENNETT, H HAMADEH, P BUSHEL, C AFSHARI und RS PAULES, 2001. Assessing gene significance from cDNA microarray expression data via mixed models. *J Comput Biol* 8:625-637.
- XIE D-Y, SB SHARMA und RA DIXON, 2004: Anthocyanidin reductases from *Medicago truncatula* and *Arabidopsis thaliana*. *Arch Biochem Biophys* 422:91-102.
- YUEN T, E WURMBACH, RL PFEFFER, BJ EBERSOLE und SC SEALFON, 2002: Accuracy and calibration of commercial oligonucleotide and custom cDNA microarrays. *Nucl Acids Res* 30:e48.
- ZHANG Z, C HONDA, M KITA, C HU, M NAKAYAMA und T MORIGUCHI, 2003: Structure and expression of spermidine synthase genes in apple: two cDNAs are spatially and developmentally regulated through alternative splicing. *Mol Gen Genomics* 268:799-807.

12 Anhang

Tabelle 22 Sequenzen und Annealingtemperaturen der verwendeten Primer.

Primer	Sequenz	T _a [°C]
Primer für die Standard-PCR		
5'pBL2SK	GACTGGAAAGCGGGCAGTGAG	55
3'pBL2SK	TGCTGCAAGGCGATTAAGTTG	
5'pBSKoL	ATGCTTCCGGCTCGTATGTT	55
3'pBSKoR	CAGGGTTTTCCAGTCACGA	
Sequenzierprimer		
M13 reverse	CAGGAAACAGCTATGAC	50
M13 (-20) forward	GTA AACGACGGCCGA	
T7	GTAATACGACTCACTATAGGGC	50
Primer für die Reverse Transkription		
oligo (dT) ₁₂₋₁₈	TTTTTTTTTTTT(TTTTTT)	42
Primer für die qRT-PCR-Analysen		
5'β-Actin	TGGTGAGGCTCTATTCCAAC	50
3'β-Actin	TGGCATATACTCTGGAGGCT	
5'Elongation factor 1 α subunit	CCCTCAGACAAGCCCCTCC	55
3'Elongation factor 1 α subunit	GCCAAAAGTCACCACCATAACCG	
5'GAPDH	GCTGCCAAGGCTGTTGGAA	61
3'GAPDH	ACAGTCAGGTCAACAACGGAAAC	
5'18S ribosomale RNA	GACTGTGAAACTGCGAATGG	50
3'18S ribosomale RNA	CAATTAAGGCCAGGAGCGTA	
5'Rubisco	GTCTGTCCAAGAGCAAGAGAAT	51
3'Rubisco	CTCCCTCCCCTCAATTATAACC	
5'RNA Polymerase II	ATATGCCACCCCGTTCTCTACT	51
3'RNA Polymerase II	CACGTTCCATTTGTCCAAACTT	
5'Hypothetical protein MG08918.4, <i>M. grisea</i>	GTAACGCATCTGAGGCATCCAA	53
3'Hypothetical protein MG08918.4, <i>M. grisea</i>	TGCTGGTTCGAGCTTGTCGG	
5' <i>pal</i> , <i>M. domestica</i>	ACGGTGAGCCAAGTAGCG	48
3' <i>pal</i> , <i>M. domestica</i>	TGCAGGGATCGTGAATGTAG	
5' <i>chs</i> , <i>M. domestica</i>	ATGTAAGCCCTACTTCACGGAGAT	52
3' <i>chs</i> , <i>M. domestica</i>	GCCGTCATCATTGGTGCG	
5' <i>fht</i> , <i>M. domestica</i>	TGTCCGAGACGAAGACGAGC	52
3' <i>fht</i> , <i>M. domestica</i>	GTCTCACAAGCCGCTACAAT	
5' <i>dfr</i> , <i>M. domestica</i>	TGCCGCTCCGTCAAGATG	51
3' <i>dfr</i> , <i>M. domestica</i>	GACTTGGGATAATGGTGATGAAAT	
5' <i>fgt</i> , <i>M. domestica</i>	CAAGCCGCAGGAGAACATAG	50
3' <i>fgt</i> , <i>M. domestica</i>	GACCCAAGGCACTCCCAAC	
5' <i>fls</i> , <i>M. domestica</i>	AGGCTGTTGGGAAGGAGTT	48
3' <i>fls</i> , <i>M. domestica</i>	CCACCCTTTCTTCGTAGTATCG	
5' <i>ans</i> , <i>M. domestica</i>	AGCGTGACTTGTCTATTTGGC	49
3' <i>ans</i> , <i>M. domestica</i>	CAACTTCTTTCTCCAGCCTCC	

Tabelle 23 Für die Makroarrayanalysen ausgewählte Klone der differentiellen Genbanken „Golden Delicious“, „Rewena früh“, „Rewena ontogenetisch“ und „WILD 2004“ sowie die zusätzlichen Flavonoidklone.

Homologie	Homologie zu Acc.no.	GenBank Acc.no.	E-Wert	Vgl. über	Identität [%]
Klone aus FISCHER et al. 2006					
<i>pal</i> (<i>Malus domestica</i>)					
<i>chs</i> (<i>Malus domestica</i>)					
<i>fht</i> (<i>Malus domestica</i>)					
<i>dfr</i> (<i>Malus domestica</i>)					
<i>fgt</i> (<i>Malus domestica</i>)					
<i>fls</i> (<i>Malus domestica</i>)					
<i>ans</i> (<i>Malus domestica</i>)					
Golden Delicious					
adenosine 5'-phosphosulfate reductase (<i>Glycine max</i>)	AAL66290	EG025829	7E-13	47 AS	76
putative rust resistance kinase Lr10 (<i>Oryza sativa</i> japonica cultivar-group)	NP_908443	EG025851	1E-22	97 AS	52
Avr9/Cf-9 rapidly elicited protein 216 (<i>Nicotiana tabacum</i>)	AAP03879	EG025873	2E-12	79 AS	41
hydrophobin (Davidiella tassiana)	CAD42710	EG025895	6E-05	96 AS	33
subtilisin-like protein (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	CAB65690	EG025898	1E-23	104 AS	56
putative Glucan 1,3-beta-glucosidase precursor (<i>Oryza sativa</i>)	AAP53385	EG025900	6E-26	80 AS	63
mRNA for putative Pi starvation-induced protein (<i>Cicer arietinum</i>)	AJ006766	EG025902	1E-21	148 bp	84
putative ATPase (ISW2-like; <i>Arabidopsis thaliana</i>)	AAF08585	EG025905	7E-77	150 AS	91
clone P42-2 putative NADH-dependent hydroxypyruvate reductase mRNA (<i>Glycine max</i>)	AF503361	EG025907	3E-50	261 bp	84
putative relA/spoT homologous protein RSH2 (<i>Oryza sativa</i> japonica cultivar group)	XP_467308	EG025909	6E-11	75 AS	49
chaperonin precursor mRNA, chloroplast gene encoding chloroplast protein (<i>Pisum sativum</i>)	U21139	EG025911	6E-83	295 bp	88
glucose-repressible gene protein-like protein (<i>Magnaporthe grisea</i>)	AAX07712	EG025913	1E-11	68 AS	57
mRNA for carboxypeptidase (<i>Pisum sativum</i>)	Z68130	EG025915	7E-17	84 bp	89
peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-like protein (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	AAM62526	EG025917	5E-38	113 AS	66
mRNA for thaumatin-like protein (<i>tl</i> gene; <i>Malus domestica</i>)	AJ243427	EG025920	0	395 bp	97
putative NADPH-dependent mannose 6-phosphate reductase (<i>Oryza sativa</i> japonica cultivar-group)	XP_463936	EG025922	3E-36	113 AS	67
mRNA for endo-chitinase class III (<i>Pyrus pyrifolia</i>)	AB021786	EG025924	1E-116	332 bp	91

Homologie	Homologie zu Acc.no.	GenBank Acc.no.	E-Wert	Vgl. über	Identität [%]
CHS mRNA for chalcone synthase (<i>Malus</i> sp.)	X68977	EG025926	8E-85	259 bp	88
CONSTANS-like protein 1 (<i>Malus domestica</i>)	AAC99309	EG025928	4E-55	112 AS	96
putative inosine-uridine preferring nucleoside hydrolase (<i>Oryza sativa japonica</i> cultivar-group)	AAP20832	EG025932	2E-42	112 AS	75
beta 1-3 glucanase PR2 mRNA (<i>Malus domestica</i>)	AY548364	EG025934	3E-78	217 bp	92
ribosomal protein L12 mRNA (<i>Prunus armeniaca</i>)	U93168	EG025936	2E-45	184 bp	88
ADP-glucose pyrophosphorylase large subunit (gpL2) mRNA (<i>Fragaria ananassa</i>)	AY518345	EG025938	1E-37	232 bp	84
clone 19-6 cysteine proteinase mRNA (<i>Malus domestica</i>)	AY347838	EG025941	5E-37	135 bp	89
hypothetical protein FG09469.1 (<i>Gibberella zeae</i> PH-1)	EAA76194	EG025943	4E-16	98 AS	44
putative flavanone 3-beta-hydroxylase (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	CAB78172	EG025945	3E-49	145 AS	66
thaumatine-like protein (<i>Malus domestica</i>)	AAM12887	EG025947	2E-45	99 AS	78
putative beta-(1,2)-xylosyltransferase (<i>Nicotiana tabacum</i>)	CAF25342	EG025949	7E-24	64 AS	81
nuclear transport factor 2 (NTF2)-like protein (<i>Oryza sativa japonica</i> cultivar-group)	BAD38417	EG025952	5E-12	115 AS	42
SOS2-like protein kinase mRNA (<i>Glycine max</i>)	AF525402	EG025954	4E-19	116 bp	86
putative aspartic protease (<i>Ipomea batatas</i>)	AAK48494	EG025956	5E-22	78 AS	62
monooxygenase 2 (MO2; <i>Arabidopsis thaliana</i>)	CAB80518	EG025959	8E-26	143 AS	39
ferric reductase-like transmembrane component family protein (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	NP_199785	EG025961	2E-21	74 AS	63
major allergen-like protein precursor (<i>Alternaria brassicicola</i>)	AAM18717	EG025964	1E-13	116 AS	40
putative ankyrin protein (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	AAM14332	EG025966	4E-14	62 AS	53
putative tropinone reductase (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	AAC95218	EG025968	2E-45	138 AS	64
thaumatine-like protein (PR-5a) mRNA (<i>Malus domestica</i>)	AF494393	EG025970	0	454 bp	94
putative salt-tolerance protein (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	AAL85108	EG025972	3E-31	151 AS	50
putative plastidic glutamine synthetase (GS2) mRNA, nuclear gene for chloroplast product (<i>Crataegus crus-galli</i>)	AY162465	EG025975	0	414 bp	95
mRNA for putative photosystem I reaction centre subunit IV (psa gene; <i>Populus euramericana</i>)	AJ457184	EG025977	2E-21	208 bp	81
ATP-dependent Clp mRNA (<i>Malus domestica</i>)	AY279311	EG025979	3E-57	140 bp	95
clone 21-6 methylcochlorine hydroxylase mRNA (<i>Malus domestica</i>)	AY347798	EG025981	2E-18	111 bp	86
Lemir (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	AAC63057	EG025983	9E-12	104 AS	40
mRNA for phosphoglyceromutase (<i>Malus domestica</i>)	AJ004915	EG025810	6E-135	104 bp	89

Homologie	Homologie zu Acc.no.	GenBank Acc.no.	E-Wert	Vgl. über	Identität [%]
S6PDH mRNA for NADP-dependent D-sorbitol-6-phosphate dehydrogenase (<i>Malus domestica</i>)	D11080	EG025812	0	352 bp	99
aminoimidazolecarboximide ribonucleotide transformylase/inosine monophosphate cyclohydrolase (<i>Vigna unguiculata</i>)	AAO40252	EG025814	1E-24	107 AS	59
sorting nexin 1 (<i>Brassica oleracea</i>)	CAD29576	EG025816	1E-58	141 AS	81
soluble inorganic pyrophosphatase mRNA (<i>Malus domestica</i>)	AF220202	EG025819	1E-102	296 bp	95
aminopeptidase like protein (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	BAD94901	EG025821	3E-34	130 AS	53
putative flavonoid 3'-hydroxylase (<i>Callistephus chinensis</i>)	AAG49298	EG025823	9E-45	130 AS	64
lipid transfer protein precursor (<i>Pisum sativum</i>)	AAF61436	EG025825	5E-29	92 AS	59
caBP1 gene for calcium binding protein (<i>Fagus sylvatica</i>)	AJ585413	EG025827	6E-12	120 bp	83
Plasma membrane localized protein protecting membranes from desiccation; stress induced; regulated by HOG and Ras-Pka pathways; Hsp12p (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	NP_116640	EG025830	1E-11	93 AS	37
mRNA for pathogenesis-related protein PR-6 type (<i>Sambucus nigra</i>)	Z46949	EG025832	6E-09	63 bp	88
auxin-repressed protein like-protein mRNA (<i>Malus domestica</i>)	AF336307	EG025834	0	387 bp	96
TPA: isoflavone reductase-like protein 3 (<i>Vitis vinifera</i>)	CAI56332	EG025837	2E-32	120 AS	56
ZPT3-3 (<i>Petunia hybrida</i>)	BAA21927	EG025839	2E-30	134 AS	57
putative Lipoxygenase 2.3, chloroplast precursor (<i>Oryza sativa japonica cultivar-group</i>)	XP_464447	EG025842	2E-15	52 AS	71
cell wall invertase (INV) mRNA (<i>Fragaria ananassa</i>)	AF000520	EG025846	1E-37	191 bp	85
putative ribose 5-phosphate isomerase (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	AAD14529	EG025848	4E-50	132 AS	73
gene encoding methionine sulfoxide reductase (<i>Fragaria ananassa</i>)	AJ297967	EG025850	1E-34	182 bp	85
nonreversible glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (<i>Apium graveolens</i>)	AAF08296	EG025853	1E-15	71 AS	59
DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein-like (<i>Oryza sativa japonica cultivar-group</i>)	BAD73413	EG025855	8E-20	82 AS	62
abscisic acid response protein (rab21) mRNA (<i>Prunus dulcis</i>)	AF172263	EG025857	3E-38	150 bp	89
lipid transfer protein precursor (<i>Malus domestica</i>)	AAT80649	EG025869	3E-28	92 AS	59
thaumatin-like protein precursor Mdt11 (MDTL1) mRNA (<i>Malus domestica</i>)	AF090143	EG025876	0	426 bp	98
Rewena früh					
putative anion:sodium symporter mRNA (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	AY568720	EG025918	2E-23	131 bp	86
DNAJ heat shock protein (At5g49580) mRNA (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	NM_124336	EG025929	5E-13	82 bp	87
putative methionine aminopeptidase I (MAP1; <i>Arabidopsis thaliana</i>)	AAN17426	EG025940	2E-79	163 AS	85

Homologie	Homologie zu Acc.no.	GenBank Acc.no.	E-Wert	Vgl. über	Identität [%]
putative ATP synthase (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	AAM64665	EG025951	6E-11	41 AS	80
mRNA rab for ras-related GTP-binding protein (<i>Pisum sativum</i>)	X65650	EG025962	7E-52	247 bp	85
malate dehydrogenase (NADP+; <i>Pisum sativum</i>)	CAA52614	EG025973	3E-17	49 AS	81
putative nucleolar GTP-binding protein (<i>Oryza sativa japonica</i> cultivar-group)	BAD35220	EG025807	1E-14	46 AS	82
putative beta-amylase (<i>Oryza sativa japonica</i> cultivar-group)	BAD46222	EG025818	3E-21	67 AS	70
superoxidase dismutase mRNA (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	AF527880	EG025840	7E-30	118 bp	89
putative vesicle transport v-SNARE protein (<i>Oryza sativa japonica</i> cultivar-group)	NP_916550	EG025862	3E-22	77 AS	74
ubiquitin-like protein SMT3 (SMT3) mRNA (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	AF451278	EG025884	8E-42	234 bp	84
LYTB-like protein mRNA (<i>Pyrus communis</i>)	AY433790	EG025897	2E-119	228 bp	99
psaDa gene for PSI-D2 (<i>Nicotiana glauca</i>)	X60008	EG025899	9E-39	227 bp	84
protein disulfide isomerase (PDI)-like protein 2 (<i>Cucumis melo</i>)	AAU04766	EG025901	2E-23	86 AS	58
mRNA for thioredoxin-dependent peroxidase (tpx1 gene; <i>Plantago major</i>)	AJ843119	EG025903	5E-34	201 bp	84
NAD-dependent sorbitol dehydrogenase 2 gene (<i>Malus domestica</i>)	AY244808	EG025904	0	395 bp	99
putative thioredoxin mRNA (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	AF261142	EG025906	6E-15	113 bp	84
(+)-pulegone reductase (<i>Mentha piperita</i>)	AAQ75423	EG025908	3E-26	80 AS	68
fiber protein Fb38 mRNA (<i>Gossypium barbadense</i>)	AY429444	EG025910	1E-10	142 bp	81
putative acyl-CoA binding protein (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	CAB81427	EG025912	7E-17	55 AS	67
cytosolic ascorbate peroxidase (APX) mRNA, APX42 allele (<i>Fragaria ananassa</i>)	AF159630	EG025914	3E-47	327 bp	81
putative leucoanthocyanidin reductase (LAR1) mRNA (<i>Malus domestica</i>)	AY830131	EG025916	0	400 bp	99
actin mRNA (<i>Pyrus communis</i>)	AF386514	EG025919	1E-92	187 bp	98
carbonate dehydratase-like protein (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	AAM65957	EG025921	2E-44	134 AS	70
MdSPDS2b mRNA for spermidine synthase (<i>Malus domestica</i>)	AB072917	EG025923	0	407 bp	99
auxin efflux carrier protein (PIN1) gene (<i>Medicago truncatula</i>)	AY115836	EG025925	5E-12	52 bp	94
putative cinnamoyl-CoA reductase (CCR) mRNA (<i>Prunus avium</i>)	AF298828	EG025927	2E-82	331 bp	86
putative heat-shock protein 90 (<i>Euphorbia esula</i>)	AAF64453	EG025930	1E-25	70 AS	84
protein synthesis initiation factor 4G; EIF4G (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	AAF73054	EG025931	5E-14	65 AS	58
PHA2 mRNA (<i>Solanum tuberosum</i> L. Desiree)	X76535	EG025933	6E-39	188 bp	86
putative cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) mRNA (<i>Malus domestica</i>)	AF053084	EG025935	0	399 bp	98

Homologie	Homologie zu Acc.no.	GenBank Acc.no.	E-Wert	Vgl. über	Identität [%]
OPB18 SCAR marker sequence band 2 sequence (<i>Malus sieversii</i>)	AY642930	EG025937	6E-12	44 bp	97
receptor-like protein kinase (RLK) gene (<i>Prunus dulcis</i>)	AF149037	EG025939	6E-27	104 bp	90
putative heat shock protein (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	AAF07844	EG025942	7E-25	70 AS	72
stearoyl-ACP desaturase (<i>Jatropha curcas</i>)	AAAY86086	EG025944	2E-11	39 AS	79
putative glutathione S-transferase T4 (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	AAG16759	EG025946	2E-13	68 AS	51
omega-3 desaturase (<i>Vernicia fordii</i>)	CAB45155	EG025948	2E-20	62 AS	75
putative NifU protein mRNA (<i>Prunus armeniaca</i>)	U95179	EG025950	5E-83	263 bp	90
putative FtsH protease (At1g79560) mRNA (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	AY035166	EG025953	2E-15	98 bp	86
Quinone oxidoreductase-like protein (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	AAM62737	EG025844	2E-55	124 AS	82
clone 12-1 small Ras-like GTP-binding protein (<i>Malus domestica</i>)	AY347864	EG025859	0	512 bp	92
annexin (<i>Medicago sativa</i>)	CAA52903	EG025861	4E-36	113 AS	68
14-3-3-like protein mRNA (<i>Euphorbia esula</i>)	AF222805	EG025865	3E-32	165 bp	85
psaH gene for photosystem I psaH protein (<i>Nicotiana sylvestris</i>)	X61664	EG025867	2E-58	302 bp	85
polygalacturonase (<i>Pisum sativum</i>)	AAK50769	EG025871	7E-44	106 AS	51
pyrophosphate-dependent phosphofructo-1-kinase mRNA (<i>Prunus armeniaca</i>)	U93272	EG025874	1E-106	390 bp	87
triose phosphate isomerase cytosolic isoform mRNA (<i>Solanum chacoense</i>)	AY438596	EG025878	2E-33	196 bp	84
putative bHLH DNA-binding protein (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	CAB77716	EG025880	2E-19	74 AS	60
metal transport protein (<i>Medicago truncatula</i>)	AAR08414	EG025882	3E-42	157 AS	72
Pto-like kinase SG5-3e (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	AAK52034	EG025885	4E-59	180 AS	63
dihydroflavonol reductase (DFR) mRNA (<i>Malus domestica</i>)	AF117268	EG025887	5E-122	224 bp	100
mRNA binding protein precursor, nuclear gene encoding chloroplast protein (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	AF106660	EG025889	6E-40	267 bp	83
protoporphyrinogen IX oxidase (<i>Zea mays</i>)	AAF26417	EG025892	6E-28	93 AS	63
CaM mRNA for calmodulin (<i>Malus domestica</i>)	X60738	EG025894	6E-169	377 bp	93
Rewena ontogenetisch					
mRNA for rubisco-1,5-bisphosphate carboxylase (<i>Malus</i> , unidentified sp. of crab apple)	X65494	EG025955	0	414 bp	95
MdSPDS2a mRNA for spermidine synthase (<i>Malus domestica</i>)	AB072916	EG025957	3E-84	187 bp	95
calcium-binding EF hand family protein mRNA (<i>Malus domestica</i>)	AY742306	EG025958	2E-69	277 bp	87

Homologie	Homologie zu Acc.no.	GenBank Acc.no.	E-Wert	Vgl. über	Identität [%]
photosystem I reaction center subunit X psaK mRNA, nuclear gene for chloroplast product (<i>Nicotiana tabacum</i>)	AY220078	EG025960	1E-59	296 bp	85
Putative 2-oxoglutarate-dependent oxygenase (<i>Oryza sativa</i> japonica cultivar-group)	BAD45236	EG025963	1E-22	117 AS	50
phosphoribulokinase mRNA (<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>)	M73707	EG025965	2E-114	564 bp	84
major allergen and lipid transfer protein Mal d 3 mRNA (<i>Malus domestica</i>)	AY792997	EG025967	2E-94	182 bp	99
temperature stress-induced lipocalin (Tat1l) mRNA (<i>Triticum aestivum</i>)	AY077702	EG025969	3E-14	116 bp	84
NADP-specific isocitrate dehydrogenase (<i>Lupinus albus</i>)	BAC77065	EG025971	2E-12	44 As	81
dehydration-responsive protein RD22 mRNA (<i>Prunus persica</i>)	AF319165	EG025974	8E-39	188 bp	85
mRNA for aspartic proteinase (ap1 gene; <i>Theobroma cacao</i>)	AJ313384	EG025976	2E-29	196 bp	83
transcription factor Myb1 mRNA (<i>Malus xiaojinensis</i>)	AY196776	EG025978	3E-75	347 bp	85
non-intrinsic ABC protein mRNA (<i>Nicotiana benthamiana</i>)	AY943856	EG025980	2E-24	341 bp	79
chloroplast oxygen-evolving enhancer protein (<i>Manihot esculenta</i>)	AAV74404	EG025982	2E-30	81 AS	81
mRNA for plastocyanin b (<i>Populus nigra</i>)	Z50186	EG025808	1E-19	221 bp	80
mRNA for nitrite reductase (<i>Betula pendula</i>)	X60093	EG025809	4E-22	170 bp	83
pectinesterase (<i>Fragaria ananassa</i>)	AAQ21125	EG025811	6E-41	92 AS	82
eukaryotic translation initiation factor 5A isoform II (eIF-5A) mRNA (<i>Hevea brasiliensis</i>)	AF516351	EG025813	3E-122	501 bp	86
molybdenum cofactor sulfurase protein -like (<i>Oryza sativa</i> japonica cultivar-group)	BAD46081	EG025815	2E-19	67 AS	67
chalcone isomerase (CHI-1) mRNA (<i>Malus domestica</i>)	AF494398	EG025817	2E-134	350 bp	93
gene for cyclophilin (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	X74403	EG025820	3E-41	164 bp	88
metallothionein-like protein (AMT2) mRNA (<i>Malus domestica</i>)	U61974	EG025822	0	402 bp	99
lecithin-cholesterol acyl transferase (LCAT1) gene (<i>Prunus dulcis</i>)	AF209909	EG025824	2E-42	221 bp	85
PSI light-harvesting antenna chlorophyll a/b-binding protein (lhca-P4) mRNA (<i>Pisum sativum</i>)	AF002248	EG025826	6E-18	249 bp	79
mRNA for NAPH-dependent hydroxypyruvate reductase (EC 1.1.1.29; <i>Cucumis sativus</i>)	X14609	EG025828	8E-48	220 bp	86
Putative cysteine protease 1 (<i>Iris hollandica</i>)	AAR92154	EG025831	2E-35	123 AS	59
CP12 (<i>Pisum sativum</i>)	CAA96570	EG025833	3E-34	126 AS	57
mRNA for glutamine synthetase (<i>Alnus glutinosa</i>)	Y08681	EG025835	3E-47	235 bp	85
copper chaperone (CCH) mRNA (<i>Populus alba</i> x <i>Populus tremula</i> var. <i>Glandulosa</i>)	AY603358	EG025836	6E-21	95 bp	89
gdcP gene for P-protein of glycine decarboxylase enzyme complex (<i>Pisum sativum</i>)	X54377	EG025838	6E-46	257 bp	84

Homologie	Homologie zu Acc.no.	GenBank Acc.no.	E-Wert	Vgl. über	Identität [%]
chlorophyll a/b-binding protein type III mRNA (<i>Alonsoa meridionalis</i>)	AF241525	EG025841	2E-33	296 bp	81
mRNA for thiazole biosynthetic enzyme (<i>Alnus glutinosa</i>)	X97434	EG025843	1E-68	255 bp	88
chloroplast chaperonin 21 (cpn21) mRNA, nuclear gene for chloroplast product (<i>Vitis vinifera</i>)	AY680700	EG025845	4E-50	336 bp	83
blight-associated protein p12 precursor (<i>Citrus jambhiri</i>)	AAD03398	EG025847	1E-28	117 AS	58
phosphoenolpyruvate carboxylase 1 (PEPC1) mRNA (<i>Gossypium hirsutum</i>)	AF008939	EG025849	5E-24	109 bp	87
BCL-2 binding anthanogene-1 (<i>Hordeum vulgare</i>)	CAI39214	EG025852	3E-15	87 AS	59
heat shock protein HSP82 (hsp82) gene (<i>Zea mays</i>)	S59780	EG025854	2E-76	332 bp	86
cytochrome P450 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	BAB02190	EG025856	9E-39	112 AS	65
ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase mRNA (<i>Malus domestica</i>)	Z21794	EG025858	5E-25	166 bp	84
phospholipase D delta isoform 1a (<i>Gossypium hirsutum</i>)	AAN05433	EG025860	3E-35	99 AS	63
thioredoxin H mRNA (<i>Prunus persica</i>)	AF323593	EG025863	2E-61	238 bp	88
mRNA for lipoxygenase (lox gene; <i>Prunus dulcis</i>)	AJ418043	EG025864	4E-34	161 bp	86
putative beta-1,3-glucanase (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	AAM20175	EG025866	1E-49	128 AS	72
14-3-3 protein homolog mRNA (<i>Maackia amurensis</i>)	AF039709	EG025868	1E-65	374 bp	83
mRNA for oxygen evolving enhancer protein 2 (<i>Bruguiera gymnorhiza</i>)	AB043961	EG025870	7E-24	248 bp	81
PPFRU16 mRNA for metallothionein-like protein (<i>Pyrus pyrifolia</i>)	AB021790	EG025872	4E-28	71 bp	98
ATP-dependent protease (CD4B) gene (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	M32604	EG025875	2E-22	119 bp	86
ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit (rbcS) mRNA (<i>Pyrus malus x domestica</i>)	L24497	EG025877	1E-154	291 bp	98
dihydroflavonol 4-reductase mRNA (<i>Pyrus communis</i> cultivar Conference)	AY227731	EG025879	7E-129	406 bp	89
cell wall hydrolase (<i>Hyacinthus orientalis</i>)	AAS20972	EG025881	2E-11	73 AS	49
metallothionein-like protein (MT2) mRNA (<i>Pyrus pyrifolia</i> strain Whangkeumbae)	AF195234	EG025883	3E-38	141 bp	89
McGRF15 mRNA for geraniol-responsible factor 15 (<i>Matricaria chamomilla</i>)	AB039375	EG025886	1E-12	68 bp	89
psbP mRNA for 23kDa polypeptide of the oxygen-evolving complex of photosystem II (<i>Cucumis sativus</i>)	AB032245	EG025888	7E-36	198 bp	84
polypeptide precursor of photosystem II (PP1) mRNA (<i>Pyrus pyrifolia</i> strain Whangkeumbae)	AF195209	EG025890	8E-79	255 bp	89
peroxidase (Prx2b) mRNA (<i>Glycine max</i>)	AF145348	EG025891	7E-27	129 bp	87
zinc finger protein-like (<i>Oryza sativa</i> japonica cultivar-group)	BAD53623	EG025893	2E-11	62 AS	53
acyl-CoA-binding protein mRNA (<i>Tropaeolum majus</i>)	AY319307	EG025896	4E-28	143 bp	86

Homologie	Homologie zu Acc.no.	GenBank Acc.no.	E-Wert	Vgl. über	Identität [%]
WILD 2004					
oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	NP_566838	EB710083	8E-57	135 AS	74
putative HSP70 (P0031D11.28; <i>Oryza sativa</i>)	NM_190528	EB710084	3E-80	306 bp	87
C-8,7 sterol isomerase (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	NP_173433	EB710085	5E-29	125 AS	47
homeodomain leucine zipper protein HDZ2 (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	AAK84886	EB710086	2E-18	106 AS	49
hypothetical protein F4F15.180 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	NP_190775	EB710087	3E-10	49 AS	65
pathogenesis-related protein 1 (<i>pr-1</i>) mRNA (<i>Malus domestica</i>)	AF507974	EB710088	1E-165	304 bp	99
CaM mRNA for calmodulin (<i>Malus domestica</i>)	X60738	EB710089	0	428 bp	99
expressed protein (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	NP_850444	EB710090	8E-17	53 AS	66
pectinesterase family (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	NP_173733	EB710161	2E-22	158 AS	40
carboxypeptidase-related (At1g71696) mRNA (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	NM_105827	EB710091	3E-16	143 bp	83
expressed protein (At5g53800) mRNA (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	NM_105827	EB710092	3E-19	68 bp	94
mRNA for major allergen Mal d 1 (<i>Malus domestica</i>)	X83672	EB710093	1E-169	356 bp	96
zinc finger (C3HC4-type RING finger) protein family (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	NP_565376	EB710094	5E-19	125 AS	40
xyloglucan endotransglycosylase mRNA (<i>Gossypium hirsutum</i>)	AY189971	EB710095	6E-33	179 bp	85
hypothetical protein (<i>Catharanthus roseus</i>)	CAC09928	EB710096	3E-19	54 AS	72
mRNA for thaumatin-like protein (<i>tl</i> gene; <i>Malus domestica</i>)	AJ243427	EB710097	0	362 bp	100
unknown (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	AAM62602	EB710098	4E-10	54 AS	57
cysteine protease inhibitor mRNA (<i>Pyrus communis</i>)	U82220	EB710099	4E-77	201 bp	94
SUBI-3 gene for ubiquitin (<i>Glycine max</i>)	D28123	EB710100	E-106	358 bp	88
gene for cyclophilin (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	X74403	EB710101	1E-39	142 bp	90
ns		EB710102			
ns		EB710103			
osmotin-like protein (<i>Vitis vinifera</i>)	CAA71883	EB710104	2E-39	99 AS	67
ns		EB710105			
expressed protein (At1g61150) mRNA (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	BT003122	EB710106	3E-13	98 bp	85
hypothetical protein At2g27830 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	E84677	EB710107	7E-23	72 AS	70
beta-1,3-glucanase (GLU-2) mRNA (<i>Malus domestica</i>)	AF494405	EB710108	7E-91	176 bp	99

Homologie	Homologie zu	GenBank Acc.no.	E-Wert	Vgl. über	Identität [%]
metallothionein like protein AMT2 (<i>Malus domestica</i>)		AF334840	3E-21	149 bp	84
expressed protein (At1g51450; <i>Arabidopsis thaliana</i>)		NP_175556	1E-47	120 AS	74
putative carboxypeptidase D (<i>Oryza sativa</i>)		NP_915353	3E-17	69 AS	65
expressed protein (<i>Arabidopsis thaliana</i>)		NP_200514	1E-11	27 AS	92
ns		EB710113			
senescence-associated protein-related (<i>Arabidopsis thaliana</i>)		NP_197570	6E-17	129 AS	42
ns		EB710115			
bZIP protein (<i>Arabidopsis thaliana</i>)		NP_849520	5E-20	129 AS	47
expressed protein (At2g05620) mRNA (<i>Arabidopsis thaliana</i>)		NM_126585	7E-29	212 bp	83
serum amyloid A protein (SAA) mRNA (<i>Canis familiaris</i>)		M59174	1E-79	277 bp	88
expressed protein (At3g52860) mRNA (<i>Arabidopsis thaliana</i>)		NM_115146	2E-16	95 bp	87
ns		EB710120			
ns		EB710121			
ns		EB710122			
expressed protein (<i>Arabidopsis thaliana</i>)		NP_563952	3E-16	48 AS	77
ns		EB710124			
oxidoreductase of short-chain (<i>Mesorhizobium loti</i>)		NP_103147	2E-21	125 AS	45
gblAJ002532 endo-polygalacturonase (<i>Arabidopsis thaliana</i>)		AAC98004	3E-42	101 AS	76
mRNA for methionine sulfoxide reductase (<i>Fragaria ananassa</i>)		Z69596	1E-53	514 bp	80
clone 22-5 putative chromatin remodelling complex (<i>Malus domestica</i>)		AY347855	3E-66	159 bp	95
QM mRNA (<i>Triticum aestivum</i>)		AF470356	7E-64	362 bp	83
lipid transfer protein precursor (<i>Malus domestica</i>)		AF221502	0	348 bp	100
ns		EB710131			
mRNA for high mobility group protein (<i>Solanum tuberosum</i>)		AJ002391	9E-10	64 bp	89
ns		EB710133			
ns		EB710134			
ns		EB710135			
expressed protein At3g03590 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)		NP_566210	2E-20	76 AS	61

Homologie	Homologie zu Acc.no.	GenBank Acc.no.	E-Wert	Vgl. über	Identität [%]
mRNA for glutamine synthetase (<i>Alnus glutinosa</i>)	Y08681	EB710137	1E-131	547 bp	85
ns		EB710138			
hypothetical protein MG08918.4 (<i>Magnaporthe grisea</i> 70-15)	EAA46575	EB710139	1E-63	183 AS	62
ns		EB710140			
ns		EB710141			
ns		EB710142			
clone mth2-32j21 (<i>Medicago truncatula</i>)	AC126778	EB710143	2E-17	101 bp	87
latex plastidic aldolase-like protein mRNA (<i>Hevea brasiliensis</i>)	AF467803	EB710144	1E-108	541 bp	84
copper chaperone (CCH)-related (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	NP_177261	EB710145	5E-19	82 AS	56
ns		EB710146			
ns		EB710147			
complete chloroplast genome (<i>Atropa belladonna</i>)	AJ316582	EB710148	6E-28	168 bp	83
auxin-binding protein (ABP20) mRNA (<i>Prunus persica</i>)	U81162	EB710149	1E-130	578 bp	85
formin homology 2 (FH2) domain-containing protein (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	NP_187198	EB710150	5E-20	64 AS	67
ns		EB710151			
ns		EB710152			
ns		EB710153			
ns		EB710154			
ns		EB710155			
ns		EB710156			
ns		EB710157			
expressed protein (At2g46820) mRNA (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	NM_130248	EB710158	7E-24	208 bp	82
ubiquitin like protein (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	NP_199045	EB710159	3E-21	52 AS	88
heat shock protein 40 like (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	CAB81922	EB710160	3E-22	87 AS	57

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Dieter Treutter bedanke ich mich sehr herzlich für die Ermöglichung der Arbeit im Rahmen des SFB-Projekts, für das große Vertrauen bei der Bearbeitung des Themas, für die Diskussionsbereitschaft und die Durchsicht des Manuskripts.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Gerhard Wenzel für die Übernahme des Koreferates sowie dafür, dass er mich als „Obstbau-Leihgabe“ so freundlich an seinem Lehrstuhl aufgenommen hat.

Bei Prof. Dr. Rainer Matyssek bedanke ich mich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich bei Christof Leser für seinen engagierten Einsatz bei der Versuchsdurchführung.

Dr. Fritz Thümmeler danke ich für die Erstellung der subtraktiven Genbanken.

Bei Dr. Barbara Ros bedanke ich mich für das Einarbeiten in die molekularbiologischen Methoden.

Dr. Thilo Fischer danke ich für die Bereitstellung der Flavonoidklone.

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Fachgebiets Obstbau sowie des Lehrstuhls für Pflanzenzüchtung für alle Hilfestellungen und die angenehme Atmosphäre an meinen beiden Arbeitsplätzen.

Mein besonderer Dank geht an Anja Härter für die selbstständige und zuverlässige Durchführung der HPLC-Analysen.

Ebenso bedanke ich mich bei Christina Hartmann für die Unterstützung bei PCRs, Sequenzierungen und Hybridisierungen.

Meiner Schwester Bernadette danke ich für die Durchsicht des Manuskripts.

Bei meinen Eltern bedanke ich mich von Herzen dafür, dass sie immer für mich da sind und an mich glauben.

Zum Schluss bedanke ich mich ganz besonders bei Seppi für die Unterstützung bei der Statistik sowie die Durchsicht des Manuskripts, vor allem aber fürs Zuhören, Aufbauen und Ablenken.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Christine Maria Zistler
Geburtsdatum: 23.03.1979
Geburtsort: Freising
Familienstand: ledig

Ausbildung

1985-1989 Grundschule Neustift, Freising
1989-1998 Josef-Hofmiller-Gymnasium, Freising
 Abschluss mit der Allgemeinen Hochschulreife
1998-2004 Studium der Gartenbauwissenschaften an der Technischen Universität
 München, Wissenschaftszentrum Weihenstephan
 Diplomarbeit am Fachgebiet Obstbau der Technischen Universität
 München, Wissenschaftszentrum Weihenstephan / Institut für
 Verfahrenstechnik, Umwelttechnik und Technische Biowissenschaften
 der Technischen Universität Wien:
 „Priming-Effekte einer Myco-Sin-Behandlung auf den Phenyl-
 propanoidmetabolismus des Apfels“
 Abschluss als Dipl.-Ing. agr.

Berufliche Tätigkeit

seit 07/2004 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Fachgebiet Obstbau der
 Technischen Universität München, Wissenschaftszentrum
 Weihenstephan