

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Fachgebiet für Obstbau

BEEINFLUSSUNG DES PHENYLPROPANOIDSTOFFWECHSELS DER WEINREBE (*VITIS VINIFERA* L.) UND DER ERDBEERE (*FRAGARIA X ANANASSA* DUCH.) DURCH PROHEXADION-Ca

Iva Puhl

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. W. Schwab

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

Die Dissertation wurde am 05.05.2008 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 11.06.2008 angenommen.

DANKSAGUNG

Ich habe lange überlegt, ob ich überhaupt eine Danksagung schreiben sollte...!

Die Worte dafür reichen einfach nicht!

Aber dann ist mir etwas klar geworden: Wenn sich so viele Menschen die Mühe gegeben haben, mir zu helfen, dann kann ich wenigstens versuchen, mich auf diese Weise zu bedanken.

In diesem Sinne schreibe ich los...

Erstmal möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater, Prof. Dr. Dieter Treutter bedanken.

Lieber Dieter, dein Vertrauen und deine Menschlichkeit haben mir die Erlaubnis gegeben, ‚so zu sein wie ich bin‘. Deswegen war ich oft in unsere Zusammenarbeit launisch, ungeduldig und dickköpfig. Ohne Deine Toleranz, Unterstützung, Hilfsbereitschaft und Ausdauer wäre ich nie so weit gekommen.

Ein dickes Dankeschön geht an Florian Stadler.

Ich frage mich immer wieder, wie meine Doktorarbeit aussehen würde, wenn Du damals irgendwo anders deine Diplomarbeit geschrieben hättest. Du hast immer verstanden, was ich sagen wollte, obwohl mein Deutsch „manchmal“ nicht lesbar war. Und erst nach deiner Korrektur hatte ich das Gefühl: na ja, vielleicht schaffe ich es doch! Jetzt klingt es doch gar nicht mehr so schlecht! Nicht nur deswegen, sondern auch für deine Freundschaft, fürs Zuhören und dein ehrliches Interesse, wie es mir geht, danke ich Dir. Durch die phenolischen Stoffe und die Weinrebe ist eine Freundschaft entstanden, die hoffentlich noch lange andauern wird!

An Dr. Carolin Ölschläger ein großes Dankeschön für die Unterstützung als Kollegin und als Freundin.

Liebe „Calo“, wegen Dir durfte ich erst überhaupt nicht über ein Aufgeben nachdenken! Jetzt sehe ich, dass Du Recht hattest. Dir und „Fedi“ danke ich auch für die wunderschönen Momente, die wir immer zusammen hatten und haben werden und für Mare's Glücksmomente bei der alleinigen Erwähnung eurer Namen!

Ein großes Dankeschön an Dr. Thorsten Strissel, Dr. Susanne Rühmann, Dr. Christine Zistler und Dr. Michael Neumüller für ihre immerwährende Hilfsbereitschaft, zahlreichen Ratschläge und angenehmen Gespräche.

Herzlichen Dank an Anja Härter, Kerstin Zofka und Marlene Kramler, die zu meinen zahllosen Fragen und Problemen immer Antworten und Lösungen hatten.

Besonders herzlich bedanken möchte ich mich bei Rita Wimmer für ihre zuverlässige Unterstützung bei der Extraktion meiner unendlichen Proben.

Auch ein riesiges Danke an Inge Lemberger, die immer für mich da war.

Liebe Inge, der Spruch, „Kopf hoch, es geht immer weiter“, wie Du ihn mir beigebracht hast, ist mittlerweile mein Lebensmotto geworden. Danke, dass Du dich immer so um mich gekümmert hast und für Dein zahlreiches Aufbauen.

Bei Dr. Bettina Deiml möchte ich mich herzlich bedanken für die hervorragende Zusammenarbeit. Danke Bettina, dass wir es immer geschafft haben, zwischen Wissenschaft und Wissenschaft auch über das Leben zu reden.

Bei Prof. Dr. Walter Feucht möchte ich mich bedanken für das regelmäßige Interesse an mich mit der Frage „und was macht die Wissenschaft?“.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Fachgebiets Obstbau für die angenehme Atmosphäre und Arbeitsmotivation bedanken. Ihr habt mir gezeigt, dass es möglich ist, ohne Konkurrenz und Hierarchie zu arbeiten. Bei Euch habe ich mich immer wohl gefühlt und mit Euch macht Arbeiten Spaß. Auf meinem weiteren beruflichen Weg wünsche ich mir vor allem Kollegen wie Euch!

Jedno veliko hvala mom jedinom i najdražem bratu Teu, koji mi je pomogao prilikom obrade podataka. Ne znam po koji put mi je postalo jasno da si ipak ti, bez obzira na moju buduću titulu, najpametniji u našoj obitelji.

I na kraju, Mare moja, zlato mamino, Marko, anđele moj, hvala vam na svemu jer bez vas, sve ovo ne bi imalo smisla.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	LITERATURÜBERSICHT	3
2.1	Taxonomische Einordnung der Weinrebe und der Erdbeere.....	3
2.2	Biosynthese phenolischer Stoffe (nach Forkmann und Heller 1999).....	3
2.2.1	<i>PAL (Phenylalaninammoniumlyase)</i>	3
2.2.2	<i>CHS/CHS (Chalkonsynthase/Chalkonisomerase)</i>	4
2.2.3	<i>STS (Stilbensynthase)</i>	4
2.2.4	<i>F3'H (Flavonoid 3'-hydroxylase) und F 3'5'H (Flavonoid 3'5'- hydroxylase)</i>	4
2.2.5	<i>FHT (Flavanon 3-Hydroxylase)</i>	5
2.2.6	<i>FLS (Flavonolsynthase)</i>	5
2.2.7	<i>DFR (Dihydroflavonol 4-reduktase)</i>	5
2.2.8	<i>LAR (Leucoanthocyanidinreduktase) und ANR (Anthocyanidinreduktase)</i>	5
2.2.9	<i>ANS (Anthocyanidinsynthase)</i>	5
2.2.10	<i>UFGT (UDP-Glucose:Flavonoid-3-O-glucosyltransferase) und OMT (O-Methyltransferase)</i>	6
2.3	Phenolische Verbindungen in der Weinrebe.....	8
2.4	Phenolische Verbindungen in der Erdbeere.....	9
2.5	Die Infektion von Blüten und Früchte durch <i>Botrytis cinerea</i> , dem Erreger des Grauschimmels.....	11
2.6	Stilbene (Phytoalexine) als Resistenzfaktoren.....	12
2.7	Konstitutive phenolische Stoffe (Phytoanticipine) als Resistenzfaktoren.....	14
2.8	Phenolstoffwechselmodifikatoren.....	16
3	MATERIAL UND METHODEN	18
3.1	BBCH Skalierung.....	18
3.2	Beschreibung der verwendeten Behandlungsmittel.....	19
3.3	Sorten Beschreibung.....	19

3.4	Versuche mit Erdbeeren.....	21
3.5	Versuche mit der Weinrebe.....	22
3.6	Analytik der phenolischen Inhaltsstoffe.....	22
3.6.1	<i>Extraktion.....</i>	22
3.6.2	<i>HPLC-Ausrüstung.....</i>	23
3.6.3	<i>Identifizierung der phenolischen Verbindungen.....</i>	25
3.6.4	<i>Kalibrierung.....</i>	26
3.6.5	<i>Quantitative Auswertung der HPLC-Analysen.....</i>	26
4	ERGEBNISSE ERDBEERE.....	27
4.1	Identifizierungen der konstitutiven Phenylpropanoide und Flavonoide.....	27
4.1.1	<i>Catechin und Procyanidin B₃.....</i>	27
4.1.2	<i>Ellagitannine.....</i>	28
4.1.3	<i>Anthocyane.....</i>	28
4.1.4	<i>Flavonole und Ellagsäure.....</i>	29
4.1.5	<i>Hydroxymizsäuren.....</i>	30
4.2	Identifizierung der durch Prohexadion-Ca Behandlung induzierten Flavonoide.....	31
4.3	Modifikation des Phenylpropanoid- und Flavonoidstoffwechsels von Erdbeerfrüchten durch Prohexadion-Ca und Milsana.....	33
4.3.1	<i>Beeinflussung des Phenylpropanoidstoffwechsels durch Prohexadion-Ca während der Blüte und der Fruchtentwicklung von Botrytis-resistenten Erdbeer-Klonen.....</i>	34
4.3.2	<i>Beeinflussung des Phenylpropanoidstoffwechsels durch Prohexadion-Ca während der Blüte und der Fruchtentwicklung Sorte ‚Mara des Bois‘.....</i>	37
4.3.3	<i>Beeinflussung des Phenylpropanoidstoffwechsels durch Prohexadion-Ca und Prohexadion-Ca/Milsana Behandlung während der Blüte und der Fruchtentwicklung Sorte ‚Elsanta‘..</i>	41
4.3.4	<i>Sorten- und Klonenunterschiede.....</i>	45
4.3.5	<i>Botrytis Bonitur.....</i>	46
4.3.6	<i>Diskussion.....</i>	49

5	ERGEBNISSE WEIN	58
5.1	Modifikationen des Phenylpropanoidstoffwechsels der Weinrebe (<i>Vitis vinifera</i> L.) durch Prohexadion-Ca.....	58
5.1.1	<i>Alternations of flavonoid biosynthesis in young grapevine (Vitis vinifera L.) leaves, flowers and berries induced by the dioxygenase inhibitor prohexadione-Ca.....</i>	59
5.1.2	<i>Der Einfluss von Prohexadion-Ca in Kombination mit den Pflanzenstärkungsmitteln Milsana und Myco-Sin auf den Flavonoidstoffwechsel der Weinblätter (Vitis vinifera L.).....</i>	82
5.1.3	<i>Diskussion.....</i>	85
6	ZUSAMMENFASSENDE GESAMTDISKUSSION	87
7	ZUSAMMENFASSUNG	94
8	SUMMARY	96
9	LITERATURVERZEICHNIS	98
10	ANHANG	112

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

4CL	4-Cumarat: Coenzym A Ligase
ANS	Anthocyanidinsynthase
BBCH	B iologische B undesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Bundessortenamt und CH emische Industrie
C4H	Zimtsäure 4-Hydroxylase
CHI	Chalkonisomerase
CHS	Chalkonsynthase
CRD	Chemical reaction detection
DAD	Diodenarraydetektor
DC	Dünnschichtchromatographie
DFR	Dihydroflavonol 4-Reduktase
DMAZA	p-Dimethylaminozimtaldehyd
Et al.	Et alli (und anderen Menschen)
F3'5'H	Flavonoid 3'5'-Hydroxylase
F3'H	Flavonoid 3'-Hydroxylase
FGT	UDP-Glucose: Flavonoid 3-O-glucosyltransferase
FHT	Flavanon 3-Hydroxylase
FNR	Flavanonreduktase
FLS	Flavonolsynthase
HPLC	High pressure liquid chromatography
LANR	Anthocyanidinreduktase
LAR	Leucoanthocyanidinreduktase
MeOH	Methanol
PAL	Phenylalaninammoniumlyase
R _f	related to front
RF	Response factor
RT	Retention time
STS	Stilbensynthase
TS	Trockensubstanz

1. EINLEITUNG

Die Gesunderhaltung der Pflanzen ist eine der wichtigsten Aufgaben im praktischen Pflanzenbau. Die Suche nach resistenten Genotypen sowie die Entwicklung umweltverträglicher Pflanzenschutzmaßnahmen ist deshalb von großer Bedeutung. Bei Weinreben und Erdbeeren verursacht das Auftreten von Grauschimmel (*Botrytis cinerea*) dramatische Ertrags- und Wertverluste des Ernteguts. Im Gegensatz zu den reifen Früchten wurde bei jungen, unreifen Früchten beider Kulturen eine Resistenz gegen *Botrytis cinerea* beobachtet. In der Literatur werden zahlreiche Faktoren diskutiert, die für diese temporale Resistenz verantwortlich sein könnten (**HUTH et al. 1980, HILL et al. 1981, SCHERER et al. 1982, BAVARESCO et al. 1997, DI VENERE et al. 1988, JERSCH et al. 1989, JEANDET et al. 2002, PEZET et al. 2003a, GABLER et al. 2004**). Dabei werden für beide Kulturen phenolische Stoffe als Resistenzfaktoren beschrieben.

Bei der Erdbeere ist die *Botrytis*-Resistenzzüchtung mit inter- und intraspezifischen Hybridisierungen aufgrund ihres unterschiedlichen Chromosomensatzes (diploid bzw. oktaploid) beschränkt (**HANCOCK 1999**). Dagegen sind inter- und intraspezifische Kreuzungen innerhalb der Gattung *Vitis* unbegrenzt möglich. Trotzdem muss der *Vinifera*-Anteil im Genom einer zugelassenen Sorte laut Sortengesetzgebung mindestens 90 Prozent betragen (**EIBACH 1999, KNOTT et al. 1999**). Auf diese Weise entstand die *Botrytis*-resistente Sorte ‚Regent‘, die bereits für die Qualitätsweinproduktion zugelassen wurde. Dennoch möchten viele Winzer und Konsumenten nicht völlig auf traditionelle Sorten verzichten.

Die gentechnischen Ansätze zur Resistenzsteigerung bei der Erdbeere und Weinrebe befinden sich noch in einem sehr frühen Entwicklungsstadium. Neben der klassischen Resistenzzüchtung sowie molekularen Ansätzen mit transgenen Pflanzen wird die Resistenzinduktion als weitere Methode zur Steigerung der Resistenz in der Pflanze gesehen. In diesem Zusammenhang fielen phenolische Stoffe als von außen modifizierbare pflanzliche Abwehrstoffe, welche an der Resistenz der Pflanze beteiligt sind (**TREUTTER 2005**), besonders ins Auge. Für eine gezielte Resistenzinduktion durch phenolische Stoffe als neue Strategie im Pflanzenschutz gegen *Botrytis cinerea*, ist es notwendig, detaillierte Kenntnisse über den Phenylpropanoidmetabolismus der Weinrebe und der Erdbeere zu gewinnen.

Heutige biochemische und molekularbiologische Methoden bieten viele Möglichkeiten, um die Funktionen der ausgewählten Substanzen aufzuklären. So ist es durch verschiedene gentechnische Methoden möglich geworden, einzelne Gene zu regulieren oder gar völlig auszuschalten. Dadurch entstehen Veränderungen im Pflanzenmetabolismus, die neue

Kenntnisse über Struktur und Funktion der Gene erbringen könnten. Aufgrund sozio-ökonomischer Gründe ist eine Alternative zur Gentechnik sowohl für die Forschung als auch für die Praxis vorteilhaft.

Aufgrund seiner Struktur wirkt Prohexadion-Ca als Inhibitor Ketoglutarat abhängiger Dioxygenasen (**RADEMACHER 2000**), was bei verschiedenen Pflanzarten zu Veränderungen im Phenylpropanoidmetabolismus führen kann (**RÖMMELT et al. 1999b, RÖMMELT et al. 2003a, RÖMMELT et al. 2003b, GOSCH et al. 2003**). In dieser Arbeit wurde versucht, mit Hilfe von Prohexadion-Ca, eine Alternative zu gentechnischen Methoden zu finden, und zwar durch Modifizierung der Phenylpropanoidmuster während der Entwicklung der Reproduktionsorgane der Weinrebe und Erdbeere. Es wurde untersucht, in wie weit es möglich ist, den Phenolstoffwechsel, als möglichen Grund der bestehenden Resistenz in der grünen Frucht, von außen zu steuern und für die reifen Früchte nutzbar zu machen. Außerdem sollten mit diesen Modifikationen die bisherigen Kenntnisse über den Phenolstoffwechsel der Weinrebe und auch der Erdbeere erweitert werden. Durch analytische Methoden wurden die aufgetretenen Modifikationen quantitativ und qualitativ erfasst und mit bisherigen molekularbiologischen und enzymologischen Ergebnissen verglichen.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1 Taxonomische Einordnung der Weinrebe und der Erdbeere

Abteilung: <i>Spermatophyta</i>	Abteilung: <i>Spermatophyta</i>
Unterabteilung: <i>Angiospermae</i>	Unterabteilung: <i>Angiospermae</i>
Klasse: <i>Dicotyledone</i>	Klasse: <i>Dicotyledone</i>
Ordnung: <i>Rhamnales</i>	Ordnung: <i>Rosales</i>
Familie: <i>Vitaceae</i>	Familie: <i>Rosaceae</i>
Gattung: <i>Vitis</i> ($x=19$)	Gattung: <i>Fragaria</i> ($x=7$)
Art: <i>Vitis vinifera</i> L.	Art: <i>Fragaria x ananassa</i> Duch.

Tab.1: Taxonomie der Weinrebe und der Erdbeere

Taxonomisch gesehen gehört die Weinrebe zur Familie der *Vitaceae* (Rebengewächse).

Planchon (1877) teilte die Gattung *Vitis* in zwei Untergattungen: *Euvitis* ($x=19$) und *Muscadinia* ($x=20$). Art *Vitis vinifera* L. gehört zur Untergattung *Euvitis* die weiter in zwei Unterarten geteilt ist: *Vitis vinifera* L. ssp. *sativa* (die sortenreichen europäischen Kulturreben) und *Vitis vinifera* L. ssp. *silvestris* (Europäische Wildrebe). Die Kulturrebe ist diploid und stark heterozygot (**MIROŠEVIĆ 1993**).

Die Erdbeere gehört zur Familie der Rosengewächse (*Rosaceae*), Gattung *Fragaria* ($x=7$).

Der einfache Chromosomensatz besteht bei allen Erdbeerarten aus 7 Chromosomen. Die verschiedenen Arten bzw. Hybriden weisen einen doppelten (diploid) bis zehnfachen (dekaploid) Chromosomensatz auf. Die am häufigsten vorkommende Wildform ist *F. vesca*, die in Europa heimische Walderdbeere. Sie besitzt 14 Chromosomen und zählt zu den diploiden Arten. Die Gartenerdbeere (*Fragaria x ananassa* Duch.) weist einen oktaploiden (achtfachen) Chromosomensatz auf. Sie entstand als Zufallshybride aus den oktaploiden Arten *Fragaria chiloensis* L. und *Fragaria virginiana* Duch. (**HANNOCK 1999**).

2.2. Biosynthese phenolischer Stoffe (nach Forkmann und Heller 1999)

2.2.1 PAL (Phenylalaninammoniumlyase)

Im Shikimisäureweg werden einfache Kohlenhydrat-Vorstufen aus der Glycolyse (Phosphoenolpyruvat) und dem Pentosephosphatweg (Erythrose-4-phosphat) in aromatische Aminosäure Phenylalanin umgewandelt. Durch die PAL wird aus Phenylalanin durch Abspaltung von NH_3 *trans*-Zimtsäure gebildet und damit steht Phenylalanin nicht mehr für die Proteinbiosynthese zur Verfügung. PAL benötigt keine Kofaktoren und katalysiert den ersten Schritt des Phenylpropananoid-Biosynthesewegs. Das Enzym befindet sich an

einem Scheideweg zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel. Die PAL, zeigt unter Einwirkung abiotischer wie biotischer Stressoren in vielen Pflanzen eine erhöhte Aktivität (**TREUTTER 2005**). Im weiteren Verlauf der Phenylpropanoidbiosynthese wird die *trans*-Zimtsäure durch die Zimtsäure 4-Hydroxylase (C4H), welche als membrangebundene, Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenase charakterisiert ist, zur *p*-Cumarsäure umgesetzt. Die *p*-Cumarsäure wird durch 4-Cumarat: CoA Ligase in einer Mg^{2+} /ATP abhängigen Reaktion aktiviert. Dabei entsteht *p*-Cumaroyl-CoA.

2.2.2 CHS/CHI (Chalkonsynthase/Chalkonisomerase)

Der $C_6C_3C_6$ -Grundkörper der Flavonoide entsteht durch sukzessive Kondensation von einem Molekül *p*-Cumaroyl-CoA mit drei Molekülen Malonyl-CoA zum Naringenin-Chalkon (4,2',4',6'-Tetrahydroxychalkon) unter Abspaltung von drei Molekülen CO_2 und 4 Molekülen Coenzym-A (CoA). Katalysiert wird diese Reaktion durch das Enzym Chalkonsynthase (CHS), das Schlüsselenzym der Flavonoid-Biosynthese. Neben dem bevorzugten Substrat *p*-Cumaroyl-CoA können auch weitere Hydroxyzimtsäure-CoA-Ester, Kaffeoyle-CoA und Feruloyle-CoA, als Substrate der Chalkonsynthase dienen. Durch die anschließende Zyklisierung der Chalkone durch Chalkonisomerase (CHI) entstehen Flavanone, in erster Linie Naringenin. Chalkonisomerase benötigt keine Cofaktoren.

2.2.3 STS (Stilbensynthase)

In *planta* konkurriert die STS mit der CHS um die gemeinsamen Substrate. Die beiden Enzyme sind mit einer etwa 70%-igen Identität der Sequenzen auf Proteinebene eng verwandt. Höchstwahrscheinlich entwickelte sich die heutige STS mehrfach unabhängig in verschiedenen Pflanzenfamilien aus der CHS (**SCHRÖDER et al. 1988**).

Die Reaktionen sind bis zu dem Tetraketid-Intermediat nach den drei Kondensationsreaktionen mit Malonyl-CoA identisch. Erst danach unterscheiden sie sich in der Faltung zu einem neuen aromatischen Ringsystem. Bei der Ringbildung zum Stilben Resveratrol wird die endständige Carboxyl-Gruppe als Kohlendioxid (CO_2) abgespalten; dies findet bei der Reaktion mittels CHS nicht statt (**AUSTIN et al. 2004**). Die Expression einer STS konnte bisher in *Arachis hypogaea*, (**SCHÖPPNER UND KINDL 1984**) *Pinus sylvestris* (**SCHANZ et al. 1992**) und in Arten der *Vitaceae* nachgewiesen werden (**SPARVOLI et al. 1994, JEANDET et al. 2002**).

2.2.4 F 3'H (Flavonoid 3'-hydroxylase) und F 3'5'H (Flavonoid 3'5'-hydroxylase)

Modifikationen durch Substituierung des B-Rings werden in Anwesenheit von Flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H) bzw. 3'5'-Hydroxylase, beide Cytochrom P450-abhängige Monooxygenasen, durchgeführt. Diese können den B-Ring von Flavanonen, Dihydroflavanolen,

Flavonolen hydroxylieren. Die Hydroxylierung des B-Rings bestimmt Farbe, Stabilität und Antioxidative Wirkung von Flavonoiden.

2.2.5 FHT (Flavanon 3-Hydroxylase)

Eine 3 β -Hydroxylierung der Flavanone durch die 2-Oxoglutaratabhängigen Dioxygenase Flavanon 3 β -Hydroxylase (FHT) führt zu den korrespondierenden Dihydroflavonolen. Die FHT ist eine Dioxygenase, die drei Co-Faktoren benötigt: 2-Oxoglutarat, Fe²⁺ und Ascorbat. Abkürzung FHT leitet sich von **Flavanone Hydroxylase Three** ab, im englischen Sprachraum findet man auch die Abkürzung F3H.

2.2.6 FLS (Flavonolsynthase)

Bei der FLS handelt es sich wie bei der FHT um eine 2-Oxoglutarat, Fe²⁺, Ascorbat abhängige Dioxygenase. Sie katalysiert die Einführung einer Doppelbindung zwischen dem C₂- und dem C₃-Atom. Dabei wird am C₂-Atom zunächst eine Hydroxylgruppe eingeführt und anschließend Wasser abgespalten und somit Dihydroflavanole in Flavonole konvertiert werden.

2.2.7 DFR (Dihydroflavonol 4-reduktase)

Die DFR katalysiert die Reduktion der Ketogruppe am C₄-Atom des Heterozyklus der Dihydroflavanole, wodurch die Flavan-3,4-diole gebildet werden, die aufgrund ihrer Farblosigkeit auch als Leucoanthocyanidine (leuco = weiß) bezeichnet werden.

Bei dem Enzym handelt es sich um eine NADP⁺/NADPH abhängige Oxidoreduktase.

2.2.8 LAR (Leucoanthocyanidinreduktase) und ANR (Anthocyanidinreduktase)

LAR und ANR sind beide NADP⁺/NADPH abhängige Oxidoreduktasen. LAR katalysiert in Anwesenheit von NADPH die Reduktion von Leucoanthocyanidine (Flavan-3,4-diole) zu Flavan 3-olen. Ausgehend von den Anthocyanidinen wird durch die Anthocyanidinreduktase das Flavan 3-ol Epicatechin gebildet (**XIE UND DIXON 2005**).

2.2.9 ANS (Anthocyanidinsynthase)

Bei der ANS handelt es sich wie bei der FHT und FLS um eine α -Ketoglutarat, Fe²⁺, Ascorbat abhängige Dioxygenase. Sie transformiert Leucoanthocyanidine in Anthocyanidine. Nach neusten Erkenntnissen von **WELLMANN et al. (2006)** kann die ANS auch Catechin oxidieren und zur Synthese von Cyanidin oder einem neuartigen Catechin-Dimer führen. Dieses Enzym wird auch Leucoanthocyanidindioxygenase (LDOX) genannt (**ABRAHAMS et al. 2003**).

2.2.10 UFGT (UDP-Glucose: Flavonoid-3-O-glucosyltransferase und OMT (O-Methyltransferase)

Die Glykosylierung der Flavonoide ist ein wichtiger Modifikationsschritt. Dadurch kommt es einerseits zu einer Erhöhung der Löslichkeit des Moleküls in Wasser, andererseits ist die Glykosylierung die Grundvoraussetzung für die nachfolgende Acylierung des Zuckerrests mit organischen Säuren. Bei den Anthocyanen ist die Glykosylierung ein essentieller Bestandteil der Biosynthese, da die gebildeten Anthocyanidine chemisch instabil sind. Erst durch Übertragung eines Zuckerrests auf die Hydroxylgruppe der Position 3 kommt es zur Bildung der unter physiologischen Bedingungen stabilen Anthocyane.

O-Methyltransferasen (OMT) katalysieren die Methylgruppen-Übertragung. Die Methylierung von Hydroxylgruppen verschiebt das Absorptionsmaximum in Richtung kürzerer Wellenlängen und ergibt eine Farbvertiefung im roten Bereich.

Leucoanthocyanidinreduktase (LAR), Anthocyanidinreduktase (ANR) (**TANNER et al. 2003, BOGS et al. 2005, PFEIFFER et al. 2006**) und Anthocyanidinsynthase (ANS) (**WELLMANN et al. 2006**) sind an der Bildung der monomeren Flavan 3-ole beteiligt. Der Mechanismus ihrer Polymerisierung ist noch immer ungeklärt.

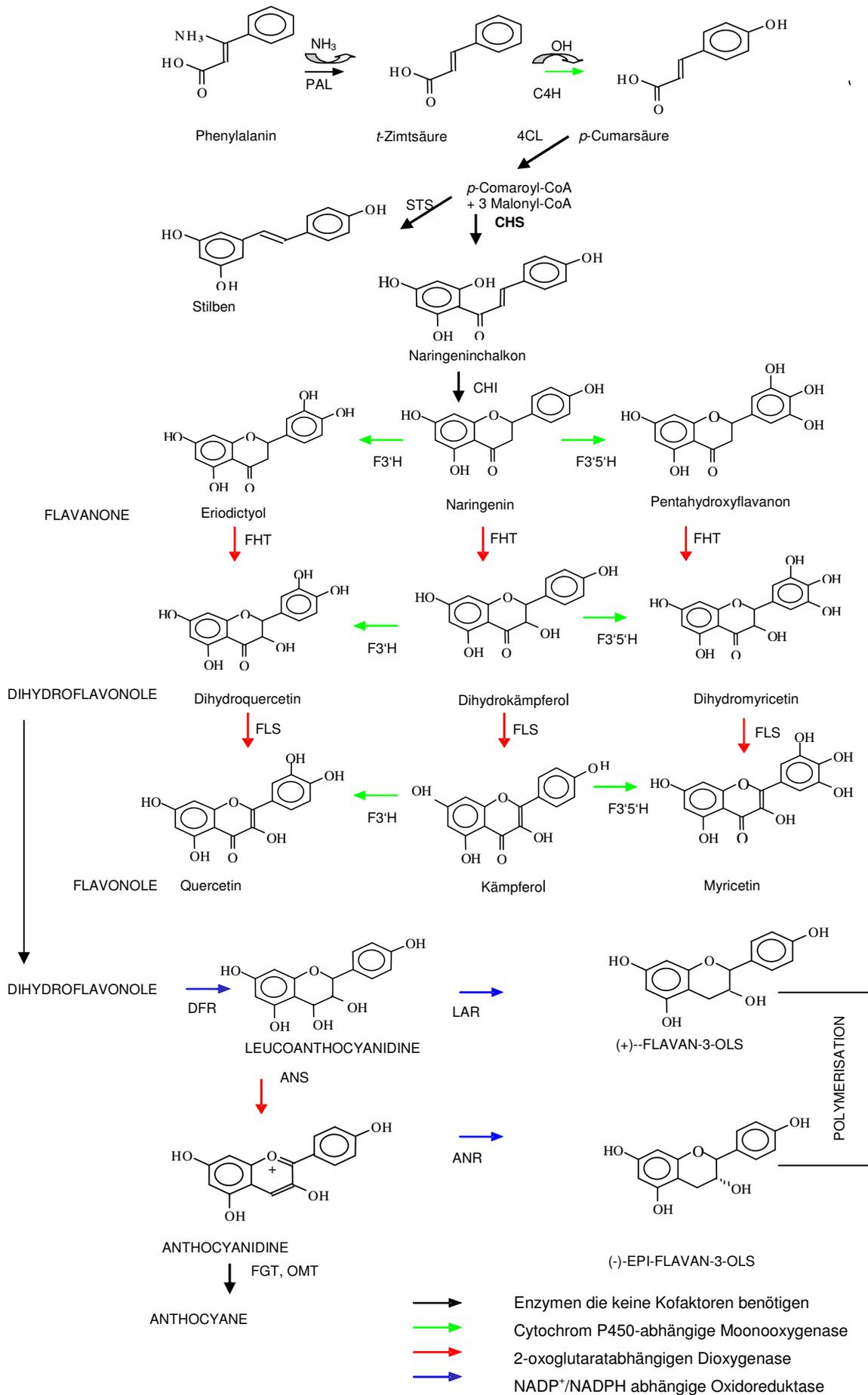


Abb.1: Biosynthese der Flavonoide und Stilbene

2.3 Phenolische Verbindungen in der Weinrebe

Hydroxyzimtsäuren der Weinbeeren sind weitgehend im Saft gelöst. Freie Phenolkarbonsäuren lassen sich sehr selten nachweisen (**RITTER 1994**). Sie sind in der Regel oft verestert und lange Zeit wurde angenommen, dass Ester der Kaffeesäure mit Chinasäure, die in den meisten anderen Früchten dominieren, auch in den Trauben vorhanden wären. **RIBERÉAU-GAYON** nahm (**1965**) anhand seiner papierchromatographischen Trennungen an, dass in Weinbeeren eine Veresterung der Hydroxyzimtsäure mit Weinsäure stattfindet (**zitiert WÜRDIG UND WOLLER 1989**). (**1978**) trennten und isolierten **SINGLETON** erstmals Cafarsäure (Ester der Kaffeesäure mit Weinsäure) und Coutarsäure (Ester der Cumar-säure mit Weinsäure) (**zitiert WÜRDIG UND WOLLER 1989**). **BARANOWSKI UND NAGEL (1981)** beschrieben erstmals die Fertarsäure (Ester der Ferulasäure mit Weinsäure) in ‚Rieslingstrauben‘ und wiesen darauf hin, dass Hydroxyzimtsäureglucoside in Trauben, die von manchen Autoren beschrieben wurden, nicht vorhanden sind.

Der Gehalt an Hydroxyzimtsäuren in Wein ist vor allem von der Rebsorte und der Verarbeitungstechnologie abhängig (**VRHOVŠEK 1998**).

Das Cafar-/Coutarsäure-Verhältnis kann zur taxonomischen Einteilung der Rebsorten herangezogen werden (**RITTER et al. 1994**). Die Untersuchungen von **POUR NIKFARDJAM (2001)** haben gezeigt, dass eine taxonomische Einteilung der Rebsorten anhand ihres Cafar-/Coutarsäure-Verhältnis eher ungünstig ist, weil das Verhältnis zwischen diesen beiden Substanzen in den Trauben durch die verschiedenen Verarbeitungsschritte signifikant verändert werden kann.

Unter den **Hydroxybenzoesäuren** erfährt Salicylsäure (2-Hydroxybenzoesäure) immer größeres Interesse als Induktor von sogenannter systemisch erworbenen Resistenz (SAR) (**POUR NIKFARDJAM et al. 1999**). Es wurde auch nachgewiesen, dass Salicylsäure die Expression der *PAL* induzieren kann (**WEN et al. 2005**). Gallussäure, Protocatechusäure, *p*-Hydroxybenzoesäure, Vanillinsäure und Syringasäure wurden als weitere Hydroxybenzoesäuren in *Vitis vinifera* beschrieben (**FERNANDEZ DE SIMON et al. 1992**).

Die **Anthocyanzusammensetzung** in Trauben wurde auch zur taxonomischen Einteilung der Rebsorten herangezogen. Die Sorten der ‚Burgunder-Gruppe‘ unterscheiden sich in ihrer Anthocyanzusammensetzung grundsätzlich von allen anderen Rebsorten, weil sie keine acylierten Anthocyane besitzen (**WENZEL et al. 1987**). **WENZEL et al. (1987)** und **BALDI et al. (1995)** identifizierten in verschiedenen *Vitis-vinifera*-Sorten 3-Glucoside, 3-Acetylglucoside und 3-*p*-Cumaroylglucoside von Delphinidin, Cyanidin, Petunidin, Päonidin und Malvidin. **BALDI et al. (1995)** fanden in *Vitis*-Sorten auch 3,5-Diglucoside von Delphinidin und Malvidin.

Flavonole kommen in der Weintraube (**OSZMIANSKI et al. 1990, GÖTZ et al. 1999, PENA NEIRA et al. 2004**) und im Wein (**OSZMIANSKI et al. 1988, GOLDBERG et al. 1996, BRANDES et al. 2001, POUR NIKFARDJAM 2001**) am häufigsten als Quercetinglykoside vor. In Blättern fanden **WEBER et al. (1995)** Quercetinglucuronide als zellwandgebundene Flavonole. **PENA-NEIRA et al. (2004)** identifizierten Kämpferol-Derivate in der Beerenhaut und **OSZMIANSKI et al. (1988)** Myricetin. Kämpferol Derivate wurden nur in den Blüten identifiziert (**DOWNEY et al. 2003a**). In Samen und Pulpe fehlen Flavonole während diese in Knospen, Ranken, Infloreszenzen, Antheren, Blättern und der Beerenhaut wichtige Funktionen als UV-Schutz, Copigmente, Radikalfänger und beim Pollenschlauchwachstum ausüben (**DOWNEY et al. 2003a**).

Die Monomeren (+)-Catechin und (-)-Epicatechin stellen als Diastereomere die wichtigsten Vertreter der **Flavanole** dar. Die Proanthocyanidine sind die Oligomeren oder Polymeren von Flavan-3-olen (**XIE UND DIXON 2005**). Soweit sich die Polymeren ausschließlich aus (+)-Catechin- und (-)-Epicatechin-Einheiten zusammensetzen, spricht man von Procyanidinen. Im Wein wurden die Monomeren (+)-Catechin und (-)-Epicatechin (**OSZMIANSKI et al. 1988, CARANDO et al. 1999, REVILLA UND RYAN, DELGADO et al. 2004**), die Procyanidin-Dimere B₁, B₂ (**OSZMIANSKI et al. 1988, CARANDO et al. 1999**) B₃ und B₄, und die -Trimere C₁ und T₂ (**CARANDO et al. 1999**) identifiziert. In Traubenkernen wurden die Monomere Catechin und Epicatechin (**PENA-NEIRA et al. 2004, SOUQUET et al. 1996, de FREITAS et al. 1999**), Epicatechingallat (**SOUQUET et al. 1996, de FREITAS et al. 1999**), Epigallocatechingallat (**SOUQUET et al. 1996**), die Dimeren B₁, B₂, B₄ (**de FREITAS et al. 1999, PENA-NEIRA et al. 2004**), und B₆-B₈ (**de FREITAS et al. 1999**) und das Trimer C₁ (**de FREITAS et al. 1999**) nachgewiesen.

FULEKI und DA SILVA (1997) konnten das Procyanidin B₁ als Hauptkomponente der Stiele und Schalen und Procyanidin B₂ als Hauptkomponente der Kerne nachweisen. **de FREITAS et al. (1999)** beschrieben B₁ auch als Hauptdimer der Beerenhaut.

Glycoside von Flavanolen wurden bisher nicht beschrieben, Gallatester können jedoch auftreten (**POUR NIKFRADJAM 2001, WATERHOUSE 2002**).

Dihydroflavonole Astilbin (Dihydroquercetin 3-rhamnosid) und Engeletin (Dihydrokämpferol 3-rhamnosid) (**TROUSDALE & SINGELTON 1983**) wurden als konstitutive Verbindungen der Trauben beschrieben.

2.4 Phenolische Verbindungen in der Erdbeere

Die Untersuchungen von **HÄKKINEN UND TÖRRÖNEN (2000)** zeigten das **Benzoessäurederivat** Ellagsäure als phenolische Hauptkomponente in den Früchten der Gattung *Fragaria*.

Sie kommt in freier Form vor, häufiger kommt sie jedoch in Form von Ellagitanninen vor (**TÖRRÖNEN et al. 2002, WILINER et al. 2003**). Der gesamte Gehalt an Ellagsäure änderte sich während des Wachstums und der Reife der Erdbeeren. Ihr Anteil am Gesamtphenolgehalt war in den grünen Früchten am höchsten (**WILINER et al. 2003, KOSAR et al. 2004**). **KOSAR et al. (2004)** unterscheiden während der Entwicklung der Erdbeerfrüchte vier Stadien: grünes Stadium, rosa Stadium, weißes und reifes Stadium. Im grünen Stadium war der Gehalt an Ellagsäure in Früchten 0,45 - 2,20 mg/100 mg, im rosa Stadium 0,12 - 2,08 mg/100 mg und im reifen Stadium 0,22 - 0,19 mg/100 mg. Die großen Schwankungen im Ellagsäuregehalt (0,16 - 2,07 mg/g TS) (**WILINER et al. 2003**) wurden auch durch unterschiedliche Extraktionsmethoden hervorgerufen (**DANIEL et al. 1989**). Gallussäure wurde als weitere Benzoessäure beschrieben. Sie kommt in freier Form (**BREITFELLNER et al. 2002**) und als Gallatester (**MÄÄTTÄ-RIIHINEN et al. 2004**) in Erdbeerenfrüchten vor.

Auch der Gehalt an anderen phenolischen Verbindungen ändert sich während der physiologischen Entwicklung der Erdbeeren. Die Konzentration des **Flavanols** Catechin (**ISHIMARU et al. 1995, TÖRRÖNEN et al. 2002, BREITFELLNER et al. 2002, BREITFELLNER et al. 2003, AUGER et al. 2004, MÄÄTTÄ-RIIHINEN et al. 2004, SEERAM et al. 2006, ALMEIDA et al. 2007**) reduziert sich während der Reife (**DI VENERE et al. 1998**). Epicatechin wurde nur selten nachgewiesen (**BREITFELLNER et al. 2002, BREITFELLNER et al. 2003, FOSSEN et al. 2004**). **Anthocyane** werden erst im weißen und rosa Stadium identifiziert (**DI VENERE et al. 1998, KOSAR et al. 2004**). Das Hauptanthocyan in Erdbeeren ist Pelargonidin-3-glucosid (**VERSARI et al. 1997, DI VENERE et al. 1998, GARCIA-VIQUERA et al. 1998, KOSAR et al. 2004, MÄÄTTÄ-RIIHINEN et al. 2004**), als weitere Anthocyane wurden Pelargonidin-3-galactosid, Cyanidin-3-glucosid (**VERSARI et al. 1997, DI VENERE et al. 1998, GARCIA-VIQUERA et al. 1998, KOSAR et al. 2004**) und Pelargonidin-3-rutinosid (**DI VENERE et al. 1998**) identifiziert. Auch dimere Anthocyane, die an Flavanole gebunden sind, wurden in Erdbeeren nachgewiesen (**FOSSEN et al. 2004**). Die Erdbeeren besitzen keine Aktivität einer F3`5`-Hydroxylase und können deswegen keine Delphinidin-Derivate bilden (**ELOMAO et al. 1994 zitiert in DENG et al. 2001**). Die Anthocyane sind die dominanten phenolischen Verbindungen in reifen Früchten (**TÖRRÖNEN et al. 2002, KOSAR et al. 2004**).

Der Gehalt der **Hydroxyzimtsäure** *p*-Cumarsäure steigt zusammen mit dem Gehalt an Anthocyanen ab dem rosa Stadium bis zur Reife deutlich an (**KOSAR et al. 2004**). Als Derivate wurden *p*-Cumaroylglucose (**MÄÄTTÄ-RIIHINEN et al. 2004**) und *p*-Cumarsäureglucosid (**SEERAM et al. 2006**) identifiziert. Mengenmäßig dominiert in Erdbeerenfrüchten *p*-Cumaroylglucose-Ester, während das 4-Glucosid nur in Spuren vorhanden ist (**HERMANN 1989**). Eine neue Untersuchung zeigte, dass auch Zimtsäure- und Sinapinsäureglucose-Ester in Erdbeerfrüchten vorliegen und die Konzentration der Glucose-Ester von Zimtsäure, *p*-Cumarsäure und Kaffeesäure während der Fruchtreife ansteigt

(LUNKENBEIN et al. 2006). BREITFELLNER et al. (2003) beschrieben Kaffeesäure als konstitutive Verbindung der Erdbeerfrüchte.

11% am Gesamtgehalt an phenolischen Verbindungen in Erdbeeren nehmen die **Flavonole** ein (HÄKKINEN UND TÖRRÖNEN 2000). Als Flavonole in Früchten wurden Quercetin- und Kämpferol-Derivate (HÄKKINEN UND TÖRRÖNEN 2000, BREITFELLNER et al. 2002, TÖRRÖNEN et al. 2002, BREITFELLNER et al. 2003, KOSAR et al. 2004, MÄÄTTÄ-RIIHINEN et al. 2004, CORDENUNSI et al. 2005, SEERAM et al. 2006) identifiziert. In höheren Konzentrationen kommen Quercetin-Derivate (Quercetin 3-glucosid und Quercetin 3-galactosid) vor und nur in Spuren Kämpferol-Derivate (MÄÄTTÄ-RIIHINEN et al. 2004, CORDENUNSI et al. 2005). KOSAR et al. (2004) stellten während der Reife konstante Flavonolgehalte fest, dagegen beobachteten DI VENERE et al. (1994) abnehmende Gehalte während der Reife. **Procyanidine** treten in der Erdbeere als Catechin-Dimere B₃ und B₆ auf (ISHIMARI et al. 1995).

In reifen Erdbeerfrüchten wurde das **Dihydrochalkon** Phloridzin in einer Konzentration von 1,9 -4,6 mg/100 g TS nachgewiesen (HILT et al. 2003).

2.5 Die Infektion von Blüten und Früchte durch *Botrytis cinerea*, dem Erreger des Grauschimmels

Die Blüten von Weinreben (*Vitis vinifera* L.) und Erdbeeren (*Fragaria x ananassa* Duch.) spielen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Grauschimmel (*Botrytis cinerea*) (McCLELLAN et al. 1973, SCHERER et al. 1982, HILL et al. 1981, JERSCH et al. 1989, BOFF et al. 2003, KELLER et al. 2003).

Verschiedene Blütenteile wie Pistille, Petalen, Sepalen und Stamina können infiziert werden und damit Quellen für direkte Fruchtinfectionen (BRISTOW et al. 1986, BOFF et al. 2003, KELLER et al. 2003) oder latente Blüteninfektionen darstellen (McCLELLAN et al. 1973, JERSCH et al. 1989, KELLER et al. 2003, PEZET et al. 2003a). Eine direkte Infektion der Früchte durch die Epidermis ist sehr selten, weil der Pilz nicht in der Lage ist, die intakte Epidermis zu durchdringen (HILL et al. 1981). Deshalb sind die Blüten das bevorzugte Organ für den Befall durch *Botrytis cinerea* bei der Erdbeere (SCHERER et al. 1982, BRISTOW et al. 1986, JERSCH et al. 1989, BOFF et al. 2003) und der Weinrebe (McCLELLAN et al. 1973, KELLER et al. 2003, PEZET et al. 2003a).

GABLER et al. (2004) zeigten, dass die Eigenschaft der Epidermis eine wichtige Rolle bei der *Botrytis*-Resistenz spielen kann. BOFF et al. (2003) haben untersucht, inwieweit die Entfernung von Petalen in verschiedenen Entwicklungsstadien der Erdbeere den *Botrytis*-Befall beeinflussen kann. Dabei wurde festgestellt, dass die Entfernung von Petalen den

Botrytis-Befall reduziert. Die zum Zeitpunkt des Entwicklungsstadiums an der grünen Frucht durchgeführte Entfernung der Petalen war nach **BOFF et al. (2003)** am effektivsten. Auch die Entfernung von Sepalen und Stamina, nach der Befruchtung reduzierte den *Botrytis*-Befall von reifen Erdbeerfrüchten (**BRISTOW et al. 1986**).

Bei feuchtwarmer Witterung (**BULGER et al. 1987**) durchwächst der Pilz die befallenen Blütenteile und dringt vom Stielende aus in den Blütenboden ein, wo er lange Zeit latent bleibt. Eine weitere Pilzentwicklung ist erst mit beginnendem Reifeprozess möglich (**SCHERER et al. 1982, JERSCH et al. 1989, PEZET et al. 2003a**). **SCHERER et al. (1982)** bezeichnen dieses Phänomen als Stadienresistenz, die in jungen grünen Früchten am stärksten ausgeprägt ist und mit zunehmender Entwicklung bis zur völligen Reife bei Wein (**HILL et al. 1981, PEZET et al. 2003a**) und Erdbeere kontinuierlich abnimmt (**SCHERER et al. 1982, JERSCH et al. 1989**). **HILL et al. (1981)** schließen allerdings aus, dass die Eigenschaften von Kutikula und Epidermis in verschiedenen Entwicklungsstadien der Weinrebe für diese Resistenz ausschlaggebend sind. Resistenzfaktoren gelangen nach **HILL et al. (1981)** erst zur Wirkung, nachdem der Pilz in die Epidermis eingedrungen ist. Als mögliche Resistenzfaktoren werden konstitutive Substanzen (Phytoanticipine) oder postinfekti- onell elicierte, *de novo* synthetisierte Substanzen (Phytoalexine) betrachtet.

2.6. Stilbene (Phytoalexine) als Resistenzfaktoren

Eine Bildung von Phytoalexinen wurde in Erdbeerfrüchten bisher noch nicht nachgewiesen (**SCHERER et al. 1982, JERSCH et al. 1989, FILIPPONE et al. 1999**). In der Weinrebe kommen Stilbene als induzierbare phenolische Verbindungen vor (**JEANDET et al. 2002**). Diese können durch verschiedene abiotische Stressoren wie UV-Licht (**JEANDET et al. 1991, DOUILLET-BREUIL et al. 1999, ADRIAN et al. 2000, BAIS et al. 2000, PEZET et al. 2003a**) und Aluminiumchlorid (**ADRIAN et al. 1996**) sowie biotische Stressoren wie Befall durch *Botrytis cinerea* (**LANGCAKE UND PRYCE 1976, BLAICH UND BACHMANN 1980, JEANDET et al. 1991, JEANDET et al. 1995, BAVARESCO et al. 1997, CICHEWICZ et al. 2000, ROLDAN et al. 2003, KELLER et al. 2003**) und *Plasmopara viticola* (**LANGCAKE UND PRYCE 1976, PEZET et al. 2004**) induziert werden.

Das erste identifizierte Stilben in der Weinrebe war **Resveratrol** (3,5,4-Trihydroxystilben) (**LANGCAKE UND PRYCE 1976**), das auch als Vorstufe für andere Stilbene fungiert: **Pterostilben** (3,5-Dimethylresveratrol) (**LANGCAKE et al. 1979**), **Piceid** (Resveratrol-Glucosid) (**WATERHOUSE et al. 1994**) und die **Viniferine**, die Dehydrodimeren des Resveratrols (**PRYCE et al. 1977, LANGCAKE 1981**). Die Biosynthese von Stilbenen (**JEANDET et al. 1991, BAVARESCO et al. 1997**) wie auch die Genexpression der *STS* (**BAIS et al. 2002**)

sind bei *Vitis-vinifera*-Sorten weniger ausgeprägt als bei anderen *Vitis*-Arten. Da Stilbene antimikrobielle Eigenschaften besitzen (**LANGCAKE UND PRYCE et al. 1976**, **STEIN UND BLAICH 1985**, **HOOS UND BLAICH 1988**, **ADRIAN et al. 1997**), kann dies ein Grund für die erhöhte Krankheitsanfälligkeit von *Vitis-vinifera*-Sorten sein. Es wurde beobachtet, dass das in Weinreben in geringer Konzentration vorkommende Pterostilben eine höhere antimikrobielle Aktivität als andere Stilbene aufweist (**ADRIAN et al. 1997**). Eine mögliche Ursache dafür kann die Methylierung des Phenolrings sein (**SCHULTZ et al. 1990**).

Die Biosynthese von Stilbenen nimmt wie auch die *Botrytis*-Resistenz der Trauben während des Wachstums und der Reife kontinuierlich ab (**JEANDET et al. 1991**, **BAVARESCO et al. 1997**, **JEANDET et al. 1995**, **BAIS et al. 2002**, **PEZET et al. 2003a**, **ROLDAN et al. 2003**). Diese Tatsache weist darauf hin, dass Stilbene eine wichtige Funktion beim Abwehrmechanismus der Weinrebe gegen *Botrytis cinerea* haben können (**BAVARESCO et al. 1997**, **JEANDET et al. 2002**, **PEZET et al. 2003a**). **KELLER et al. (2003)** untersuchten die Rolle der Stilbene in Blüten von Weinreben in Bezug auf eine *Botrytis cinerea* Infektion. Es wurde nachgewiesen, dass die Blüten selbst fähig sind, Stilbene zu bilden. Die Bildung von Resveratrol wurde dabei erst nach einer Infektion mit *Botrytis cinerea* festgestellt, wobei nur die *trans*-Form gefunden wurde. Die Akkumulation von Resveratrol konnte allerdings den Befall mit *Botrytis cinerea* nicht reduzieren. Das Resveratrolglucosid Piceid konnte als konstitutiv vorkommende Substanz identifiziert werden. **GABLER et al. (2004)** fanden eine Induktion der Stilbene nach einer Inokulation mit *Botrytis cinerea* nur in Beeren von anfälligen und mittelmäßig resistenten Rebsorten. In hochgradig resistenten Sorten konnten keine Stilbene induziert werden (**GABLER et al. 2004**).

Die Aktivität lytischer Enzyme wie Laccase und anderer Polyphenoloxidasen von *Botrytis cinerea* ist essentiell für seine Pathogenität, weil diese Enzyme in der Lage sind, die Phytoalexine zu detoxifizieren und zu inaktivieren (**VANETTEN et al. 1989**, **SBAGHI et al. 1996**). So wurde in *Botrytis cinerea* eine Stilbene oxidierende Laccase identifiziert (**MARBACH et al. 1984**, **HOOS UND BLAICH 1988**, **ADRIAN et al. 1998**, **BREUIL et al. 1998**, **PEZET et al. 1998**, **BREUIL et al. 1999**, **CICHEWICZ et al. 2000**). **PEZET et al. (2003b)** identifizierten als Oxidationsprodukt von Resveratrol mittels Laccase das ϵ -Viniferin, wohingegen **BREUIL et al. (1998)** ein Resveratrol-*trans*-Dehydrodimer fanden. Eine erhöhte Infektion mit *Botrytis cinerea* kann zu einer Abnahme der Resveratrolkonzentration in den Weintrauben führen, wenn die Aktivität der Stilben-Oxidase von *Botrytis* so hoch ist, dass die Neubildung durch die Stilbensynthase kompensiert wird (**JEANDET et al. 1995**). Bei geringer ausgeprägtem Befall ist die Biosynthese von Resveratrol in der Haut infizierter Beeren größer als der Abbau durch *Botrytis*, wodurch es zu einer Akkumulation des Stilbens kommt (**ROLDAN et al. 2003**). Daraus schließen **ROLDAN et al. (2003)**, dass der Resveratrolgehalt als Maß für den Befall durch *Botrytis cinerea* dienen kann.

Der Rückgang des Stilbengehalts mit beginnender Traubenverfärbung kann nach **JEAN-DET et al. (1995)** auf die Konkurrenz der Enzyme Stilben- und Chalkonsynthase um das gemeinsame Ausgangsprodukt *p*-Coumaroyl-CoA zurückgeführt werden. Es wird angenommen, dass die Bildung der Stilbene durch Induktion mit biotischen und abiotischen Stressoren hervorgerufen wird. In nicht induzierten Blättern können keine Stilbene nachgewiesen werden (**BLAICH UND BACHMANN 1980, LISWIDOWATI et al. 1991**). **PEZET et al. (2003a)** untersuchten die Stilben-Produktion in Trauben nach UV-Licht-Behandlung und schlossen aus dem Induktionspotential für die Biosynthese von Resveratrol auf die Produktion von Abwehrstoffen in der Weinbeere. Dabei zeigte sich, dass die resistente Sorte ‚Gamay‘ mehr Stilbene produzieren konnte als die anfällige Sorte ‚Gamaret‘. **ROLDAN et al. (2003)** und **ADRIAN et al. (2000)** fanden Stilbene auch in nicht befallenen Trauben, wobei nicht ausgeschlossen werden kann, dass diese nicht durch eine latent vorhandene Infektion mit *Botrytis cinerea* induziert wurden.

2.7 Konstitutive phenolische Stoffe (Phytoanticipine) als Resistenzfaktoren

HUTH (1980) benannte die Proanthocyanidine (PA) als unspezifische Enzym-Inhibitoren, die in der Lage sind, hydrolytische Enzyme des eingedrungenen Erregers zu hemmen und damit seine weitere Entwicklung zu unterbinden. Proanthocyanidine können die Polygalacturonase (**HILL et al. 1981, SCHERER et al. 1982, JERSCH et al. 1989, DI VENERE et al. 1998**) und die Stilben-Oxidase von *Botrytis cinerea* (**PEZET et al. 1988, GÖTZ et al. 1999**) hemmen. Deswegen wurde auch untersucht, ob Proanthocyanidine für den latenten Zustand von *Botrytis cinerea* in Blüten von Erdbeere und Weinrebe von Bedeutung sein können.

SCHERER et al. (1982) und **DI VENERE et al. (1998)** postulieren, dass die Stadienresistenz von Erdbeerfrüchten gegenüber *Botrytis cinerea* überwiegend von der Menge der vorhandenen Proanthocyanidine bestimmt wird, die mit zunehmender Entwicklung der Früchte kontinuierlich abnimmt. **JERSCH et al. (1989)** zeigten mit histologischen Untersuchungen eine ungleichmäßige Verteilung der Proanthocyanidine in den Erdbeerfrüchten. Über dem Fruchtboden, um den Blütenboden und in der Epidermis wurden hohe Konzentrationen detektiert, während das übrige Gewebe einen sehr geringen Proanthocyanidingehalt aufwies. Die hohe Konzentration von Proanthocyanidinen in den Blütenboden inaktiviert die Hydrolase von *Botrytis cinerea*, so dass sich der Pilz nicht weiter entwickeln kann und latent bleibt. Erst wenn die Proanthocyanidine mit zunehmender Reife polymerisieren und damit unwirksam werden, kann sich der Pilz weiter entwickeln (**JERSCH et al. 1989**). Der Gesamtgehalt an Proanthocyanidinen in jungen grünen Früchten ist laut Untersuchungen

von **SCHERER et al. (1982)** vergleichbar mit dem in reifen Früchten, aber die Hemmung der Polygalacturonase von *Botrytis cinerea* nimmt mit zunehmender Entwicklung der Früchte deutlich ab. Deswegen sehen **JERSCH et al. (1989)** nur die „aktiven“ Proanthocyanidine als Ursache der für die Unterbindung der Entwicklung von *Botrytis cinerea*. Ein zunehmender Polymerisationsgrad im Verlauf der Reife führt zum Verlust ihrer biologischen Aktivität (**HUTH 1980**).

HILL et al. (1981) wiesen in der Beerenhaut von jungen unreifen Weinbeeren Substanzen nach, die mazerierende Enzyme von *Botrytis cinerea* hemmen können und ebenfalls als Proanthocyanidine identifiziert wurden. Mit weiterer Beerenentwicklung nimmt die Anfälligkeit für *Botrytis cinerea* stetig zu, während der Gehalt an Proanthocyanidinen kontinuierlich abnimmt. Auf Grund dieser negativen Korrelation zwischen dem Gehalt an Proanthocyanidinen und der Anfälligkeit werden die Proanthocyanidine als präformierte Resistenzfaktoren der Weinrebe gegen *Botrytis cinerea* betrachtet.

PEZET et al. (2003a) untersuchten die Proanthocyanidine als konstitutive fungistatische Verbindungen von Weinbeeren. Deren Gehalt nahm mit zunehmender Reife ab und die niedrigste Konzentration wurde beim Farbumschlag erreicht. Der Gehalt an Proanthocyanidinen war außerdem in einer untersuchten resistenten Sorte („Gamaret“) höher als in einer anfälligen Sorte („Gamay“), zudem zeigten die Proanthocyanidine der resistenten Sorte eine stärker ausgeprägte Hemmung der Enzymaktivitäten von *Botrytis cinerea*. Deswegen sehen **PEZET et al. (2003a)** die Proanthocyanidine als wichtige Faktoren für die *Botrytis*-Resistenz der Weinrebe.

Nicht nur die Stilbene und die Proanthocyanidine, sondern auch andere phenolische Stoffe können die Entwicklung von *Botrytis cinerea* beeinflussen.

KELLER et al. (2003) wiesen darauf hin, dass bei der Traube der Blütenboden das bevorzugte Organ für eine *Botrytis cinerea* Infektion ist, weil diese Bereiche einen sehr geringen Gehalt an phenolischen Verbindungen wie Hydroxycinnamtsäure-Derivaten und Flavonol-Glykosiden aufweisen, die ebenso in der Lage sind, die Stilbenoxidase von *Botrytis cinerea* zu hemmen (**GÖTZ et al. 1999**). **VIRET (2004)** zeigte in einer histologischen Studie, dass Blütenböden die primären Penetrationsstellen für *Botrytis* sind.

Catechin als konstitutive phenolische Verbindung wurde aufgrund seiner antimikrobiellen Eigenschaften sehr oft als Resistenzfaktor beschrieben (**SCALBERT 1991, HAKULINEN et al. 1999, YAMAMOTO et al. 2000, del RIO et al. 2003**). **GABLER et al. (2004)** konnten allerdings keinen Zusammenhang zwischen dem Catechingehalt und der Resistenz der Rebe gegen Grauschimmel finden.

2.8 Phenolstoffwechselmodifikatoren

Prohexadion-Ca (als Regalis® vermarktet) wurde als Wachstumsregulator von der BASF zur Hemmung des vegetativen Wachstums beim Reis entwickelt. Seit dem 10.04.2002 ist der Einsatz von Regalis in Deutschland zur Bekämpfung sekundärer Infektionen durch Feuerbrand (*Erwinia amylovora*) in Apfel genehmigt. Wirkstoff von Regalis ist das Acylcyclohexadion Prohexadion-Ca, das strukturell dem 2-Oxoglutarat ähnlich ist und somit 2-Oxoglutarat abhängige Dioxygenasen kompetitiv hemmen kann (**RADEMACHER 2000**). In verschiedenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine Applikation von Regalis die Feuerbrandanfälligkeit (*Erwinia amylovora*) beim Apfel (*Malus domestica*) (**RÖMMELT et al. 1999b, YODER et al. 1999**) und bei der Birne (*Pyrus communis*) (**COSTA et al. 2001, RÖMMELT et al. 2003a**) reduziert. Eine direkte Wirkung auf den Erreger *Erwinia amylovora* konnte nicht festgestellt werden (**RADEMACHER 2000**). Als Ursache dieses resistenzinduzierenden Effekts von Regalis werden die Veränderungen der Flavonoid-Biosynthese diskutiert (**RÖMMELT et al. 1999b, RÖMMELT et al. 2003a, RÖMMELT et al. 2003b**). Es wurde ein modifiziertes Flavonoidmuster beobachtet, welches auf der Hemmung 2-oxoglutaratabhängiger Dioxygenasen im Flavonoidbiosyntheseweg beruht. Als neu akkumulierende Flavonoide wurden im Apfel die 3-Deoxyflavane Luteoliflavan und Luteoliflavan 5-glucosid sowie die Flavanone Eriodictyol 7-glucosid und 6“-*O-trans-p*-Cumaroyleriodictyol 3'-glucosid identifiziert, der Gehalt an konstitutiven Flavonoiden wie Flavan 3-olen und Flavonolen wurde reduziert (**RÖMMELT 2002**). Als 3-Deoxyflavonoide kommen 3-Deoxyanthocyanidine in *Gesneriaceen* vor (**FORKMANN UND HELLER 1999**), in *Sorghum* wurden sie von **SNYDER UND NICHOLSON (1990)** als Phytoalexine beschrieben. Der Mechanismus wurde aufgeklärt: 3-Deoxycatechine entstehen nach Hemmung der FHT, die unter normalen Umständen Flavanone umsetzt, durch FNR Aktivität aus Eriodictyol (**HALBWIRTH et al. 2002**). **FISCHER et al. (2003)** konnten nachweisen, dass in *Malus* und *Pyrus* die DFR eine FNR-Aktivität ausübt. Als instabiles Zwischenprodukt wird Luteoforol gebildet, das starke antimikrobielle Eigenschaften besitzt (**SPINELLI et al. 2005**), jedoch wird dieses in einer durch LAR katalysierten Reaktion (**PFEIFFER et al. 2006**) schnell zu Luteoliflavan metabolisiert, welches allerdings selbst keine antibakterielle Wirkung zeigt (**RÖMMELT 2002**).

Es wurde demonstriert, dass Milsana die Produktion phenolischer Verbindungen in glykosylierter Form stimuliert (**DAAYF et al. 1995, DAAYF et al. 1997**). Die Akkumulation dieser Stoffe wurde mit der Resistenz von Gurken gegen den Mehltauerreger *Sphaerotheca fuliginea* in Verbindung gebracht. **FOFANA et al. (2002)** zeigten dass die induzierte Resistenz von Gurken gegen Mehltau mit erhöhten mRNA-Werten und Enzymaktivitäten der Chalkonsynthese (CHS) und Chalkonisomerase (CHI) korrelierte sowie mit der Akkumulation

verschiedener Flavonoidverbindungen in behandelten Pflanzen. Auch Myco-Sin ist in der Lage, den Phenolstoffwechsel zu beeinflussen (**RÖMMELT et al.1999a, STRISSEL 2004**).

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 BBCH Skalierung

Probenahmen und Behandlungs- Termine wurden in der Regel nach BBCH Phasen (**B**io-
logische **B**undesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, **B**undessortenamt und **C**hemische
Industrie) (**MEIER et al.1994**).

3.1.1 BBCH-Codierung der phänologischen Entwicklungsstadien der Erdbeere nach MEIER et al. (1994)

Makrostadium 5: Entwicklung der Blütenanlagen

- 55 Erste Blütenanlagen werden am Rosettengrund sichtbar
- 56 Achse des Blütenstandes beginnt sich zu strecken
- 57 Erste, noch geschlossene Blütenknospen sichtbar
- 58 Frühes Ballonstadium: Erste Blüten im Ballonstadium
- 59 Ballonstadium: Mehrzahl der Blüten im Ballonstadium

Makrostadium 6: Blüte

- 60 Erste Blüten (Primär- oder A-Blüte) offen
- 61 Beginn der Blüte: etwa 10% der Blüten geöffnet
- 65 Vollblüte: B- und C-Blüten geöffnet; erste Blütenblätter fallen ab
- 67 Abgehende Blüte: Mehrzahl der Blütenblätter abgefallen

Makrostadium 7: Fruchtentwicklung

- 71 Blütenboden deutlich aufgewölbt
- 73 Samen deutlich auf dem Fruchtgewebe erkennbar
(Nüsschenstadium)

Makrostadium 8: Fruchtreife

- 81 Beginn der Fruchtreife: Mehrzahl der Früchte «weiß» gefärbt
- 85 Früchte beginnen sich sortentypisch auszufärben
- 87 Hauptpflücke: Mehrzahl der Früchte sortentypisch ausgefärbt
- 89 2. Pflücke: Weitere Früchte sortentypisch ausgefärbt

3.2 Beschreibung der verwendeten Behandlungsmittel

3.2.1 Milsana flüssig® (Schaette)

Bei Milsana handelt es sich um ein Pflanzenstärkungsmittel aus dem Sachalin-Staudenknöterich (*Reynoutria sachalinensis*). Hersteller ist die Dr. Schaette AG, Stahlstrasse 5, 88339 Bad Waldsee, Deutschland.

3.2.2 Myco-Sin® (Schaette)

Bei dem Pflanzenstärkungsmittel Myco-Sin (BBA Nr. LS 4997-0) handelt es sich um eine Mischung aus Tonerde, Schachtelhalmextrakt, Silikaten und Hefezellwandbestandteilen. Auch Myco-Sin wurde von der Dr. Schaette AG entwickelt.

3.2.3 Regalis® (BASF)

Regalis wurde als Wachstumsregulator von der BASF zur Hemmung des vegetativen Wachstums beim Reis entwickelt. Seit dem 10.04.2002 ist der Einsatz von Regalis in Deutschland zur Bekämpfung sekundärer Infektionen durch Feuerbrand (*Erwinia amylovora*) in Apfel genehmigt. Wirkstoff von Regalis ist das Acylcyclohexadion Prohexadion-Ca, das strukturell dem 2-Oxoglutarat ähnlich ist (Abb.2) (RADEMACHER 2000).

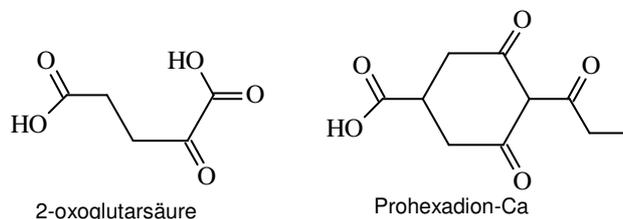


Abb.2: Strukturähnlichkeit von 2-oxoglutarinsäure und Prohexadion-Ca

3.3. Sorten Beschreibung

Weinsorten

3.3.1 Regent'

Diese Rotweinsorte gilt als pilztolerante Neuzüchtung. Sie entstammt einer Kreuzung aus ‚Diana‘ (‚Silvaner‘ x ‚Müller-Thurgau‘) und der französischen Hybride ‚Chambourcin‘, deren Zusammensetzung unklar ist, die aber wohl Erbanteile der amerikanischen Wildarten *Vitis riparia* und *V. rupestris* trägt. Somit ist ‚Regent‘ aus botanischer Sicht als Hybridsorte zu bezeichnen, da sie aber keine phänologischen Unterschiede zu traditionellen Sorten zeigt, ist sie vom Bundessortenamt 1996 als *V.-vinifera*-Sorte zugelassen.

In seiner *Botrytis*festigkeit ist ‚Regent‘ als mittel bis hoch einzustufen, wobei zu berücksichtigen ist, dass diese zum Teil auch durch die raschere Reife bedingt ist (**EIBACH 1999, KNOTT et al. 1999**).

3.3.2 ‚Müller-Thurgau‘

Nach neueren Erkenntnissen ist ‚Müller-Thurgau‘ eine Kreuzung aus ‚Riesling‘ und ‚Königliche Mädchentraube‘. In ihren Resistenzeigenschaften gilt sie als hoch empfindlich gegenüber *Botrytis cinerea* (**SCHWAB UND KNOTT 2005**).

3.3.3 ‚Grauburgunder‘

Auch als ‚Ruländer‘, oder ‚Pinot Gris/Grigio‘ bekannt, geht diese Sorte aus der Kombination ‚Traminer‘ x ‚Schwarzriesling‘ (‚Müllerrebe‘) hervor. Ihre grau- bis blauroten Beeren enthalten nur sehr wenig Anthocyan, weshalb sie als Weißweinsorte gilt. Sie weist geringe Krankheitsanfälligkeit auf, ihre Anfälligkeit gegenüber *Botrytis cinerea* ist aber hoch, was auf den dichten Beerenstand zurückzuführen ist (**SCHWAB UND KNOTT 2005**).

Erdbeersorten

3.3.4 ‚Elsanta‘

Die Sorte ‚Elsanta‘ wurde von L. M. Wassenaar in Wageningen aus ‚Gorella‘ x ‚Holiday‘ gezüchtet, besitzt seit 1982 Sortenschutz. Sie ist eine sehr ertragreiche, mittelspätreifende Sorte. Sie besitzt eine hohe Anfälligkeit gegen *Botrytis cinerea* (**NAUMANN UND SEIPP 1989**).

3.3.5 ‚Mara des Bois‘

Diese remontierende Sorte wurde von Jacques Marionnet in Frankreich aus ‚Genta‘ x ‚Ostara‘ gezüchtet und besitzt seit 1994 Sortenschutz. Die Sorte ist anfällig gegen *Botrytis cinerea* (**MASNY et al. 2005**).

3.3.6 Klone ‚II/29‘ und ‚91/13/3‘

Die beiden Klone sind Weihenstephaner Selektionen des Züchters Hermann Schimelpfeng, mittelspät reifend und zeigen sehr geringe Anfälligkeit gegen *Botrytis cinerea*.

3.4. Versuche mit Erdbeeren

3.4.1 Versuch Dürnast und Blumenstraße

In den beiden Versuchsanlagen Dürnast des Lehrstuhls für Zierpflanzenbau und Blumenstraße des Fachgebiets Obstbau wurde zwischen Mai und August 2004 der erste Erdbeerversuch durchgeführt. Am Standort Blumenstraße sollte eine Grauschimmelinfection (*Botrytis cinerea*) bewusst erzielt werden. Deshalb wurde hier kein Pflanzenschutz betrieben und eine Überkopfbewässerung gewählt. Für den Versuchsansatz in der Versuchsanlage in Dürnast sollte hingegen eine Infektion mit Grauschimmel vermieden werden. Deshalb wurden wöchentlich Pflanzenschutzmaßnahmen (Rovral®1,0 %, Euparen® 2,5 %) durchgeführt. Um einer Grauschimmelinfection vorzubeugen, wurde außerdem eine Tröpfchenbewässerung installiert, um die Früchte möglichst vor Grauschimmelfördernder Feuchtigkeit zu schützen. Für den Versuch wurden die beiden Sorten ‚Mara des Bois‘ und ‚Elsanta‘ und die beiden Klone ‚91/13/3‘ und ‚11/29‘ des Fachgebiets Obstbau verwendet.

Bei den Klonen ‚91/13/3‘ und ‚11/29‘ sowie der Sorte ‚Mara des Bois‘ wurden zwei Behandlungen gewählt: Kontrolle (Wasser) und Prohexadion-Ca (0,2 %). Bei der Sorte ‚Elsanta‘ wurde zusätzlich eine Kombinationsbehandlung mit Prohexadion-Ca (0,2 %) und Milsana (1,2 %) durchgeführt. Im Vorfeld des Versuches wurden verschiedene phänologische Blüten- bzw. Fruchtentwicklungsstadien nach der BBCH-Codierung festgelegt, bei deren Erreichen der Mehrzahl der Blüten beziehungsweise der Früchte die Behandlungen durchgeführt wurden. Dies war im Einzelnen Makrostadium 6 „Blüte“ (BBCH 65), im Makrostadium 7 „Fruchtentwicklung“ (BBCH 71 und 73) und im Makrostadium 8 „Fruchtreife“ (BBCH 81, 89). Es wurden zwei Prohexadion-Ca-Behandlungen, mit je einem Tag Wartezeit zwischen den Applikationen, ausgeführt. Zwei nach der letzten Behandlung erfolgte die Probenahme. Genauso wurde bei der Kontrollvariante mit der Wasserbehandlung verfahren. ‚Mara des Bois‘ wurde zusätzlich vor der Blüte (BBCH 59) mit Prohexadion-Ca behandelt.

Bei der Kombinationsbehandlung wurde am Tag nach der zweiten Prohexadion-Ca-Behandlung Milsana appliziert. Die Probenahme erfolgte auch in diesem Fall zwei Tage nach der letzten Behandlung. Bei den verschiedenen Probenahmeterminen wurden die einzelnen Blüten und Früchte den jeweiligen Entwicklungsstadien zugeordnet und gleiche Stadien als Mischprobe analysiert.

Das geerntete Material wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.4.2 Einfluss des Zeitpunkts der Prohexadion-Ca Behandlung vor bzw. während der Blüte auf den Phenolstoffwechsel der Erdbeer-Sorte 'Elsanta' (Versuch 2005)

Im Jahr 2005 wurde ein Versuch durchgeführt, der klären sollte, wie weit der Zeitpunkt der Behandlung mit Prohexadion-Ca vor der Blüte bzw. während der Blüte die Wirkung von Prohexadion-Ca auf die Catechin-Biosynthese beeinflusst.

Die Erdbeer-Sorte ‚Elsanta‘ wurden mit 0,2 % Prohexadion-Ca behandelt. 15 Pflanzen wurden vor der Blüte (BBCH 59) und während der Blüte (BBCH 65) behandelt. Nach der Behandlung wurden die Stadien (BBCH 65, BBCH 71 und BBCH 73 gesammelt und untersucht.

3.5. Versuche mit der Weinrebe

3.5.1 Kombinationsbehandlungen Prohexadion-Ca (Regalis), Myco-Sin und Milsana

Im Juni 2004 wurde ein Versuch mit Kombinations-Behandlungen von Prohexadion-Ca und den Pflanzenstärkungsmitteln Myco-Sin und Milsana durchgeführt. 3 Sorten und (‚Grauburgunder‘, ‚Müller Thurgau‘ und ‚Regent‘) wurden getestet. Pro Variante (Tab.2) wurden 3 Triebe markiert. In früheren Versuchen (unveröffentlicht) wurde festgestellt, dass die in Myco-Sin enthaltenen Tonminerale bei gleichzeitiger Ausbringung mit Prohexadion-Ca dieses binden und inaktivieren. Daher wurden die Pflanzen zunächst mit Prohexadion-Ca (0,2%) behandelt und erst am darauf folgenden Tag die Behandlungen mit Wasser, Myco-Sin und Milsana (0,5%) durchgeführt. Drei Tage nach Versuchsbeginn wurden die Blätter der behandelten Pflanzen geerntet. Dabei wurden die gleichen Blattaltersstufen von drei Trieben zu einer Mischprobe vereinigt.

Variante	Behandlung
Kontrolle	Wasser
Prohexadion-Ca	Prohexadion-Ca (0,2 %)
ProCa + Myco-Sin	Prohexadion-Ca (0,2 %)/ Myco-Sin (1 %)
ProCa + Milsana	Prohexadion-Ca (0,2 %)/ Milsana (0,5 %)

Tab.2 : Durchführung des Kombinationsversuchs Prohexadion-Ca, Myco-Sin und Milsana

3.6 Analytik der phenolischen Inhaltsstoffe

3.6.1 Extraktion

Die Zerkleinerung der Blätter, grünen Erdbeeren und grüne Trauben erfolgte in der Schwingmühle, 5 Minuten lang bei 20 Hz. 100 mg Trockensubstanz wurden in 500 µl Methanol, das mit 0,1 mg / ml 6-Methoxyflavon als internem Standard versetzt war, 30 Minu-

ten im eisgekühlten Ultraschallbad extrahiert. Danach wurden die Proben 10 Minuten bei -10 °C, 10000 U / min zentrifugiert und der Überstand wurde für die HPLC-Analyse verwendet.

Reife Erdbeeren und Trauben hatten einen hohen Zuckergehalt, der einen nicht zu vernachlässigenden Störfaktor bei der Gefriertrocknung, der Probenaufbereitung und der Extraktion darstellt. Die Zerkleinerung der Schwingmühle war nicht in möglich. Deshalb wurden diese Proben in Methanol, das mit 0,05 mg / ml Flavon als Standard versetzt war, mit dem Ultra-Turrax homogenisiert (1 g Probe / 10 ml Methanol). 500 µl des Überstands wurden zur Trockne eingeeengt und in 100 µl Methanol wieder aufgenommen und für die HPLC-Analyse verwendet.

3.6.2 HPLC-Ausrüstung

Die Trennung und quantitative Bestimmung der phenolischen Verbindungen erfolgte mit einer Kombination aus HPLC mit UV-Detektion (280 nm) und einer Nachsäulenderivatisierung (CRD) mit dem Reagens p-Dimethylaminozimtaldehyd (**TREUTTER et al. 1994**). Die HPLC in Verbindung mit DAD und CRD erlaubt einen besseren Einblick in die Substanzgruppe der Phenolen. Die Bestimmung der Flavanole ist wegen ihrer relativ geringen molaren Extinktion bei einer UV-Detektion bei 280 nm stark eingeschränkt.

Gradient programm		HPLC Bedingungen
Zeit(min)	%B	
0	0	Fließmittel A:Ameisensäure
5	2,5	Fließmittel B:Methanol
15	2,5	Fließmittel C:DMAZA
30	5	Pumpe A: 422 Master Kontron Instruments
40	5	Pumpe B: 422 Master Kontron Instruments
65	10	Pumpe C: GP40 Dionex
105	20	Detektor 280 nm: Detektor432 Kontron Instruments
150	30	Detektor 640 nm: Detektor 432 Kontron Instruments
165	40	DAD:Hewlett Packard 1040A/M
180	50	Säule: Phenomex, Hyperclone 3 µl 150 x 4,6 mm ODSC C18
195	90	Injektionsvolumen: 10 µl
215	90	Reaktor: gestricktre PTFE-Kapillare Länge Innedurchmesser
230	0	Fluss: 0,6 ml/min
255	Ende	

Tab.3: HPLC-Bedingungen und Gradient Programm von System 1, die für Analytik der Erdbeer-Proben benutzt wurden (Versuch Blumenstraße und Versuch Dürnast).

Gradient programm:		HPLC Bedingungen
Zeit(min)	%B	
0	0	Fließmittel A: Ameisensäure
5	2,5	Fließmittel B: Methanol
15	2,5	Fließmittel C: DMAZA
30	5	Pumpe A: 422 Master Kontron Instruments
40	5	Pumpe B: 422 Master Kontron Instruments
65	10	Pumpe C: GP40 Dionex
105	20	Detektor 280 nm: Detektor432 Kontron Instruments
150	30	Detektor 640 nm: Detektor 432 Kontron Instruments
165	40	DAD:Hewlett Packard 1040A/M
180	50	Säule: Phenomex, Hyperclone 3 µl 150 x 4,6 mm ODSC C18
195	90	Injektionsvolumen: 10 µl
215	90	Reaktor: gestrickte PTFE-Kapillare Länge Innendurchmesser
230	0	Fluss: 0,6 ml/min
255	Ende	

Tab.4: HPLC-Bedingungen und Gradient Programm von System 2, die für Analytik der Erdbeeren (Versuch 2005) benutzt wurden.

Gradient programm:		HPLC Bedingungen
Zeit(min)	%B	
0	0	Fließmittel A: Ameisensäure
5	5	Fließmittel B: Methanol
10	10	Fließmittel C: DMAZA
15	10	Pumpe A: 422 Master Kontron Instruments
35	15	Pumpe B: 422 Master Kontron Instruments
55	15	Pumpe C: Gynkotec Modell 300C
70	20	Detektoren: Diodenarray-Detektor, Bio Tek Kontrom 540+, λ=200-600 nm
80	20	Detektor 640nm: Detektor 432 Kontron Instruments
95	25	Säule: Phenomex, Hyperclone 3µl 150 x 4,6mm ODSC C18
125	30	250 mm x 4,0 mm; Nucleosil 120-3 C18
145	50	Injektionsvolumen: 10µl
160	90	Reaktor: gestrickte PTFE-Kapillare Länge Innedurchmesser
175	90	Fluss: 0,5ml/min
195	Ende	

Tab.5: HPLC-Bedingungen und Gradient Programm von System 2, die für Analytik der Weinrebe Proben benutzt wurden.

3.6.3 Identifizierung der phenolischen Verbindungen

Zur Identifizierung wurden Retentionszeiten (RT) und UV/Vis-Absorptionsspektren (sowie R_F-Werte (Dünnschichtchromatographie) mit den Eigenschaften von authentischen Standards verglichen. Waren keine Vergleichssubstanzen verfügbar, wurden die Peaks anhand der Spektren und der Farbreaktionen mit diagnostischen Reagenzien zugeordnet.

3.6.3.1 Dünnschichtchromatographie

Als stationäre Phasen wurden Kieselgel oder Zellulose (Macherey-Nagel) verwendet. Als Laufmittel für die Kieselgel-Platten diente Toluol : Aceton : Ameisensäure (3 : 6 : 1) und für die Zellulose-Platten Butanol : Essigsäure: Wasser (BAW, 4:1:2,2). Auf eine 20 x 10 cm große Platte wurden in einem Abstand von 1 cm vom Rand der Längsseite in einem gleichmäßigen Abstand von 1 cm die Proben mit 5, 10 oder 20 µl Mikropipetten aufgetragen. Die aufgetragenen Proben waren methanolische Gesamtextrakte oder einzelne Fraktionen des Gesamtextraktes, die mittels HPLC in 2 Minuten-Intervallen aufgetrennt wurden. Diese aufgefangenen Fraktionen wurden in der Vakuumzentrifuge eingengt, in Methanol aufgenommen und anschließend auf die DC-Platten aufgetragen.

3.6.3.2 Reagenzien

- DMAZA Reagenz für die Nachsäulenderivatisierung: 1% DMAZA Lösung in einem Gemisch aus Methanol und Schwefelsäure (11 : 1,v:v)
- DMAZA für DC: 1% DMAZA Lösung in Gemisch von Ethanol und 6N HCl (1 : 1,v:v)
- Naturstoffreagenz für DC: 1 g Naturstoffreagenz und 5 g Polyethylenglycol in 100 ml Methanol

3.6.3.3 Hydrolyse

Verschiedene enzymatische Hydrolysen mit Tannase, β -Glucosidase, Driselase bzw. Galactosidase wurden durchgeführt und die entstehenden Aglyka mit den oben beschriebenen Methoden näher charakterisiert.

Die Proben wurden dazu zur Trockne eingeeengt und jeweils 0,1 mg in 300 μ l Na-Acetatpuffer (0,1M, pH 4,6) aufgenommen. Anschließend wurden 1 mg Enzym zugegeben. Die Hydrolyse wurde im Wasserbad bei 37°C, 17h durchgeführt. Die hydrolysierten Proben wurden mit Ethylacetat / Wasser ausgeschüttelt, um die freigesetzten Zucker von den Aglyka zu trennen. Die getrennten Phasen wurden abermals zur Trockene eingeeengt und für die Identifizierung in Methanol bzw. Wasser aufgenommen.

3.6.4 Kalibrierung

Zur Bestimmung der Responsefaktoren wurden Konzentrationsreihen von Standards in der HPLC bestimmt. Anhand der Eichkurven wurde der lineare Wertebereich ermittelt.

3.6.5 Quantitative Auswertung der HPLC-Analysen

Zur Quantifizierung von phenolischen Verbindungen wurden Standardsubstanzen verwendet. Waren keine Standardsubstanzen erhältlich, wurde die Quantifizierung mit einer chemisch und strukturell möglichst nahe verwandten Referenzsubstanz durchgeführt.

Mit Hilfe von *Response*-Faktoren (RF) kann aus der Peakfläche mit folgender Formel (Abb.7) die Konzentration einer bestimmten phenolischen Substanz direkt berechnet werden. Die Bezugsgröße stellt die Trockensubstanz dar:

$$c(i) = \frac{RF(i) \times A(i)}{RF(iS) \times A(iS)} \times MF \times c(iS)$$

Abb.3: Formel für die quantitative Auswertung der HPLC-Analysen

Abkürzungen:

- i: Einzelpeak
- IS: interner Standard (6-Methoxyflavon bzw. Flavon)
- c: Konzentration
- A: Peakfläche
- RF: Responsefaktor = Konzentration / Peakfläche
- MF: Multiplikationsfaktor (bezieht die Konzentration auf 1 g TS)

4. ERGEBNISSE ERDBEERE

4.1 Identifizierungen der konstitutiven Phenylpropanoide und Flavonoide

4.1.1 Catechin und Procyanidin B₃

Die Besonderheit der Catechine und Proanthocyanidine ist ihre spezifische Reaktion mit DMAZA (*p*-Dimethylaminozimtaldehyd). Da Flavanole bei einer Wellenlänge von 280 nm nur geringe molare Extinktion zeigen und oftmals von anderen Substanzen überlagert werden, erfolgte eine Nachsäulenderivatisierung mit DMAZA, um Flavanole durch das entstandene Kondensationsprodukt selektiv bei 640 nm erfassen zu können. Dabei wurde Procyanidin B₃ früher (RT=27,4) als Catechin (RT=34,2) detektiert.

Auf DC Platten können die nach dem Besprühen mit DMAZA entstehenden blauen Flecken den Flavanolten zugeordnet werden. Catechin zeigte dabei einen höheren R_f Wert (54,9) als Procyanidin B₃ (26,7).

Die Form der UV-Spektren sowie das Absorptionsmaximum waren bei beiden Substanzen identisch (Abb. 4). Co-Chromatographie mit Vergleichssubstanzen bestätigen das Vorliegen des monomeren Catechins und des Catechin-Dimers Procyanidin B₃ (Abb.5).

Procyanidin B₃ wurde als Hauptvertreter der Procyanidine in Erdbeeren beschrieben (**ISHIMARU et al. 1995**).

Über Catechin als dominierendes Flavan-3-ol in Erdbeeren berichten verschiedenen Autoren (**ISHIMARU et al. 1995**, **DI VENERE et al. 1998**, **AUGER et al. 2000**, **BREITFELLNER et al. 2003**, **ALMEIDA et al. 2007**).

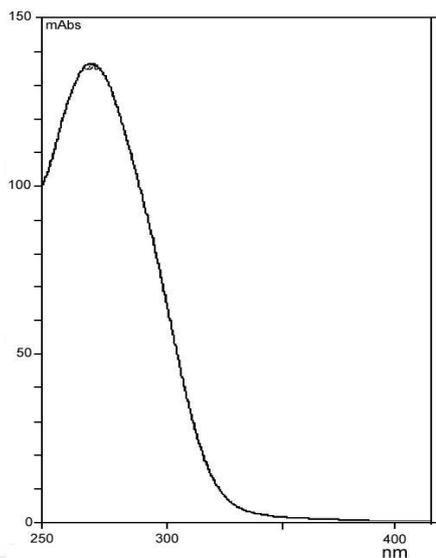


Abb.4: UV-Spektrum von Flavanolen (λ_{max}=274)

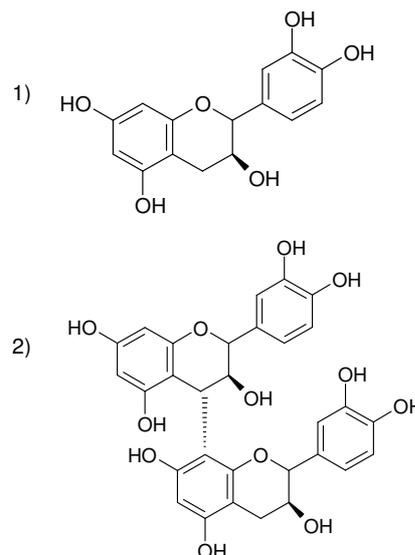


Abb.5: Strukturformeln von Catechin (1) und Procyanidin B₃ (2)

4.1.2 Ellagitannine

Ellagitannine sind Ester von Hexahydroxydiphensäure und einem oder mehreren Polyolen, meistens D-Glucose (Abb.6).

Der Peak der als Ellagitannin identifiziert wurde, zeigte das Absorptionsmaximum bei 252 nm (Abb.6). Das Spektrum ist ähnlich wie das von **MULLEN et al. (2002, 2003)** beschriebene Spektrum von Ellagitannin. Bei Betrachtung der DC-Cellulose Platten unter UV-Licht zeigt die Substanz dieselbe Farbe wie Ellagsäure, weist jedoch einen niedrigeren R_f -Wert auf, was auf eine oligomere Struktur hinweist.

Werden Ellagitannine mit Säure oder Base hydrolysiert, wandelt sich die Hexahydroxydiphensäure in Ellagsäure um (**CLIFFORD UND SCALBERT 2000**).

Nach saurer Hydrolyse des getesteten Peaks wurde die Ellagsäure identifiziert.

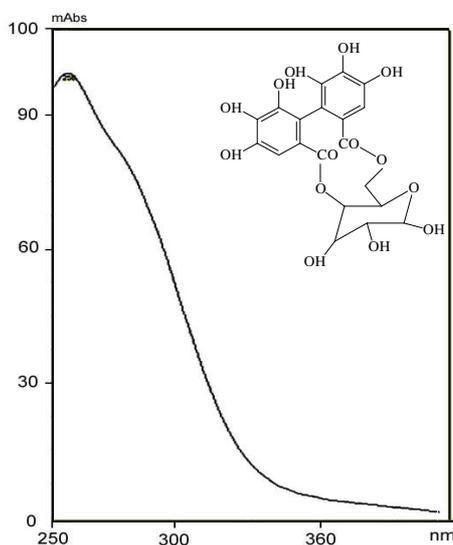


Abb.6: UV-Spektrum und Strukturformel eines Ellagitannins ($\lambda_{\max}=252$ nm)

4.1.3 Anthocyane

Anthocyane zeigen neben einem Maximum bei 265–275nm eine starke Absorptionsbande im sichtbaren Wellenlängenbereich zwischen 465–560 nm (Abb.7). Nach enzymatischer Hydrolyse mit Tannase wurden die Aglykone Pelargonidin und Cyanidin nachgewiesen (Abb.8).

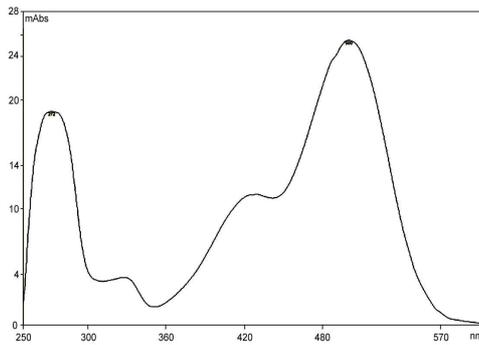


Abb.7: UV-Spektrum von Pelargonidin
($\lambda_{\text{max}}=272,500 \text{ nm}$)

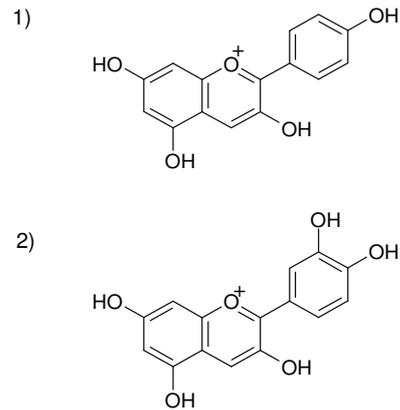


Abb. 8: Strukturformeln von Pelargonidin (1)
und Cyanidin (2)

4.1.4 Flavonole und Ellagsäure

Aufgrund einer Überlagerung von Ellagsäure- und Quercetin- Derivaten konnten die zwei Substanzen nicht immer eindeutig bestimmt und quantifiziert werden. Beide Substanzen zeigten zwei Maxima in den ähnlichen Bereichen (Abb. 9). **MULLEN et al. (2003)** berichten über Schwierigkeiten der Identifikation von Ellagsäure und Quercetin-Derivaten mittels HPLC. Die Quantifizierung von Flavonolen wurde nur in den Proben durchgeführt, die mit Diodenarray-Detektion (System 2) analysiert wurden. Hier war die Detektion bei 320 nm möglich. Anhand ihrer UV-Spektren konnten diese als Quercetin bzw. Kämpferol-Derivate identifiziert werden (Abb.10).

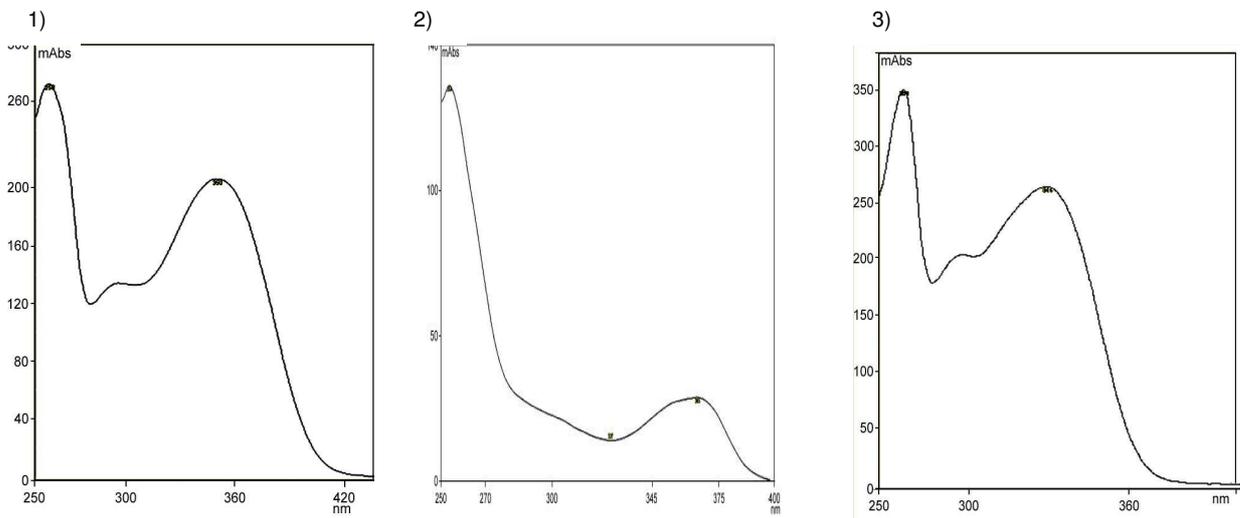


Abb.9: UV-Spektren von Quercetin-Derivaten (1) ($\lambda_{\max} = 256,352$ nm), Ellagsäure-Derivaten (2) ($\lambda_{\max} = 253,365$ nm) und Kämpferol-Derivaten ($\lambda_{\max} = 264,346$ nm) (3)

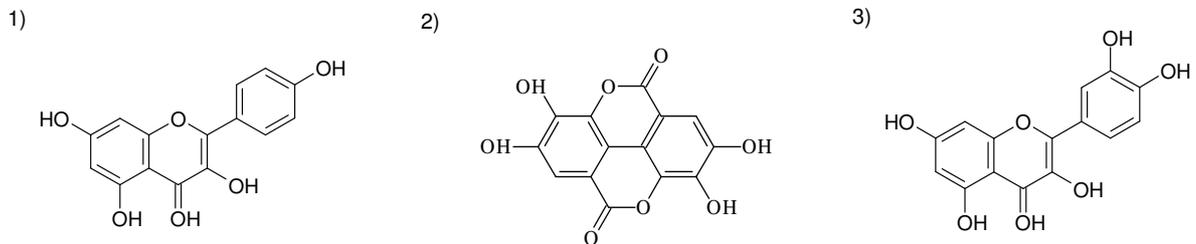


Abb.10: Strukturformeln von Kämpferol (1), Ellagsäure (2) und Quercetin(3)

4.1.5 Hydroxyzimtsäuren

In den reifen Früchten wurde anhand des UV-Spektrums (Abb.11) eine Hydroxyzimtsäure identifiziert (RT=39,9). Nach ihrer enzymatischer Hydrolyse mit Tannase konnte die *p*-Cumarsäure durch Co-Chromatographie mittels HPLC identifiziert werden (RT=65,1). Die Verschiebung der RT nach Hydrolyse wies darauf hin, dass die getestete Substanz eine höhere Polarität als das Aglycon *p*-Cumarsäure aufweist. Die erhöhte Polarität könnte durch eine Glukose-Esterifikation verursacht werden. *p*-Cumaroylglucose wurde in den Erdbeerenfrüchten schon beschrieben (HERMANN 1989, MÄÄTTÄ-RIIHINEN et al. 2004). Von daher wurde vermutet, dass die getestete Substanz mit *p*-Cumaroylglucose (Abb.12) identisch ist.

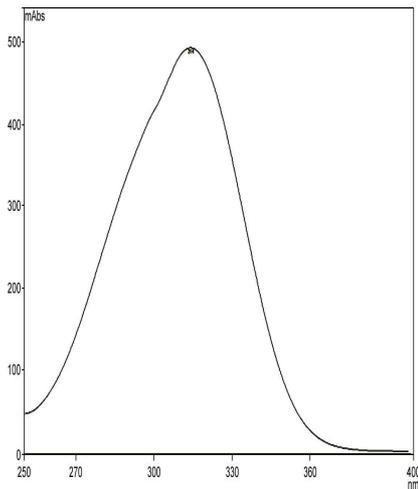


Abb.11: UV-Spektrum von *p*-Cumarsäure-Derivat
($\lambda_{\text{max}} = 324 \text{ nm}$)

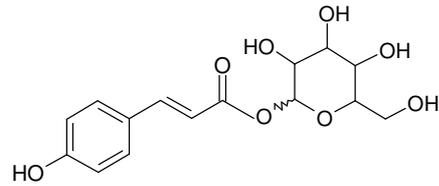


Abb.12: Strukturformel der *p*-Cumaroylglucose

4.2. Identifizierung der durch Prohexadion-Ca Behandlung induzierten Flavonoide

4.2.1 Flavanone und 3-Deoxyflavane

Nach der Prohexadion-Ca Behandlung wurden zwei neue Verbindungen identifiziert: das Flavanon Eriodictyol 7-Glucosid und das 3-Deoxyflavan Luteoliflavan (Abb.14). Eriodictyol 7-Glucosid wurde bei 280 nm detektiert und Luteoliflavan erst bei 640 nm nach der Derivatisierung mit DMAZA. Die UV-Daten, Farbreaktionen und R_f -Werte stimmten mit der von Vergleichssubstanzen überein. Eriodictyol 7-Glucosid erschien rosafarben nach dem Besprühen der Cellulose-Platte mit dem Naturstoffreagenz, während Luteoliflavan eine blaue Färbung nach Besprühen der Kieselgel-Platte mit DMAZA vorweist. Die UV Spektren von beiden Substanzen sind in Abb.13 dargestellt. Nach enzymatischer Hydrolyse des gesamten Extrakts mit Tannase konnte sowohl mittels DC als auch HPLC die Aglycone Eriodictyol und Luteoliflavan nachgewiesen werden. Diesmal wurde Luteoliflavan auch bei 280 nm detektiert. Die Detektion von Luteoliflavan bei 640 nm wurde nach enzymatischer Hydrolyse deutlich induziert. In nicht hydrolysierten Proben wurde mittels DC Luteoliflavan 5-Glucosid identifiziert. Er zeigte niedrigeren R_f -Wert als Luteoliflavan und die flavanoltypische blaue Färbung nach Besprühen der Kieselplatte mit DMAZA. Bei der HPLC-Analyse wurde Luteoliflavan 5-Glucosid sowohl bei 280 als auch bei 640 nm nicht detektiert.

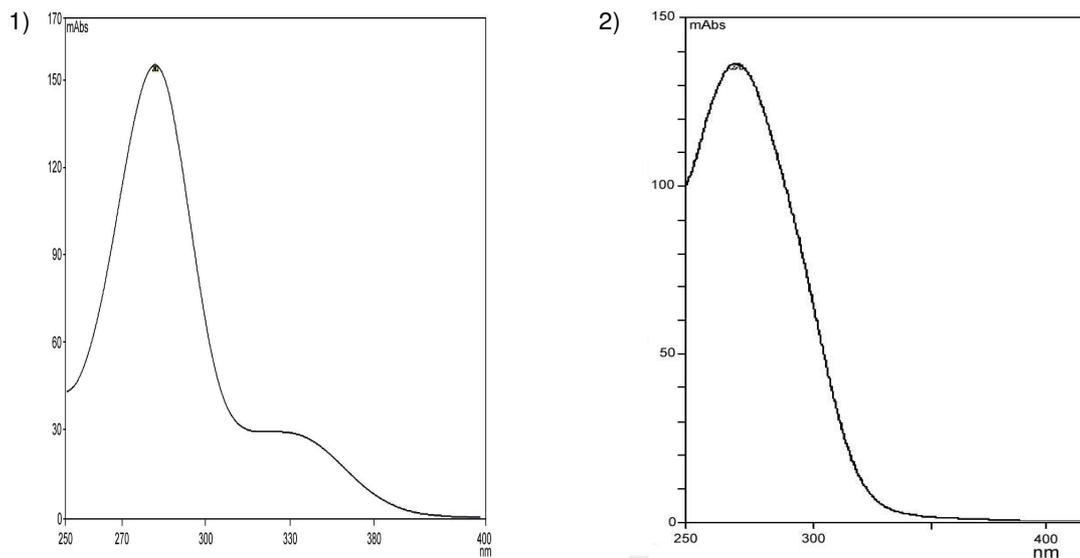


Abb.13: UV Spektren von Eriodictyol 7-Glucosid (1) ($\lambda_{\max} = 282$ nm) und Luteoliflavan (2) ($\lambda_{\max} = 274$

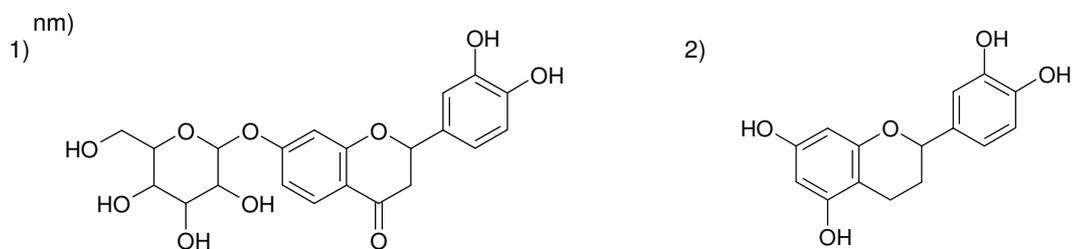


Abb.14: Strukturformeln von Eriodictyol 7-Glucosid (1) und Luteoliflavan (2)

4.3 Modifikation des Phenylpropanoid- und Flavonoidstoffwechsels von Erdbeerfrüchten durch Prohexadion-Ca und Milsana

Es wurde gezeigt, dass eine Applikation von Prohexadion-Ca die Feuerbrandanfälligkeit (*Erwinia amylovora*) beim Apfel (*Malus domestica*) (YODER et al. 1999, RÖMMELT et al. 1999b, RÖMMELT et al. 2003a, RÖMMELT et al. 2003b) und bei der Birne (*Pyrus communis*) (COSTA et al. 2001, RÖMMELT et al. 2003a) reduziert. Eine direkte Wirkung auf den Erreger *Erwinia amylovora* konnte nicht festgestellt werden (RADEMACHER 2000). Als Ursache dieses resistenzinduzierenden Effekts von Prohexadion-Ca werden die Veränderungen in der Flavonoid Biosynthese diskutiert (RÖMMELT et al. 1999b, RÖMMELT et al. 2003a, RÖMMELT et al. 2003b). Es wurde ein modifiziertes Flavonoidmuster beobachtet, welches auf der Hemmung 2-oxoglutaratabhängiger Dioxygenasen im Flavonoidbiosyntheseweg beruht (RADEMACHER 2000).

In verschiedenen Untersuchungen wurde dargestellt, dass Milsana als Resistenzinduktor wirken kann und diese induzierte Resistenz korrelierte mit der Akkumulation von phenolischen Stoffen (DAAYF et al. 1995, DAAYF et al. 1997, FOFANA et al. 2002).

Während der Blüten- und Fruchtentwicklung der Erdbeeren wurden Behandlungen mit Prohexadion-Ca allein bzw. in Kombination mit Milsana durchgeführt (siehe Material und Methoden). Die bisher gewonnenen Ergebnisse mit Prohexadion-Ca (RÖMMELT et al. 1999b, RÖMMELT et al. 2003a, RÖMMELT et al. 2003b) und Milsana (DAAYF et al. 1995, DAAYF et al. 1997, FOFANA et al. 2002) erlaubten die Erwartung eines modifizierten Phenylpropanoidstoffwechsels durch Prohexadion-Ca und Milsana während Wachstum und Reife der Erdbeere. Sowohl anhand dieser Änderungen als auch unter Berücksichtigung des temporären Verlaufs wird untersucht, ob und in welcher Weise der Lebenszyklus von *Botrytis cinerea* durch den Phenylpropanoidstoffwechsel beeinflusst wird. Besondere Beachtung gilt hierbei dem Catechin als Baustein der Procyanidine (XIE UND DIXON 2005), die als bestimmender Faktor für das Phänomen der Stadienresistenz postuliert wurden (SCHERER et al. 1982).

4.3.1 Beeinflussung des Phenylpropanoidstoffwechsels durch Prohexadion-Ca während der Blüte und der Fruchtentwicklung von *Botrytis*-resistenten Erdbeer-Klonen

Die verschiedenen Standorte (Blumenstraße und Dürnast) und die beiden Klone (,II/29' und ,91/13/3') zeigten nach den Auswertungen keine deutlichen Unterschiede und deswegen wurden sie auch als Wiederholungen analysiert. Somit wurden alle dargestellten Werte als Mittelwert von 4 Wiederholungen errechnet (Abb. 15,16).

Eine ähnliche Entwicklung des Gehaltes an Catechin und Procyanidin B₃ wurde während des Wachstums und der Reife der Erdbeer-Klone beobachtet (Abb.15). Die Gehalte erreichten das Maximum in BBCH Stadium 71 und danach nahmen sie ab. Eine starke Abnahme von Catechin wurde in BBCH Stadium 81 festgestellt (Abb.15).

Gehalte an Catechin und Procyanidin B₃ zeigten durch die Prohexadion-Ca Behandlung einen Anstieg in Stadien BBCH 71, 73 und 81, während die Stadien BBCH 65 und BBCH 89 kaum beeinflusst wurden (Abb.15).

Über den gesamten Versuchszeitraum betrachtet erfolgte in allen BBCH Stadien eine Induktion von Eriodictyol 7-Glucosid und Luteoliflavan, nachdem mit dem Wachstumsregulator Prohexadion-Ca behandelt wurde. Das Maximum der Entstehung von den beiden Substanzen verzeichnete das Stadium BBCH 71 (Abb.15). Ein deutlicher Abfall der Akkumulation wurde im BBCH Stadium 81 festgestellt (Abb.15).

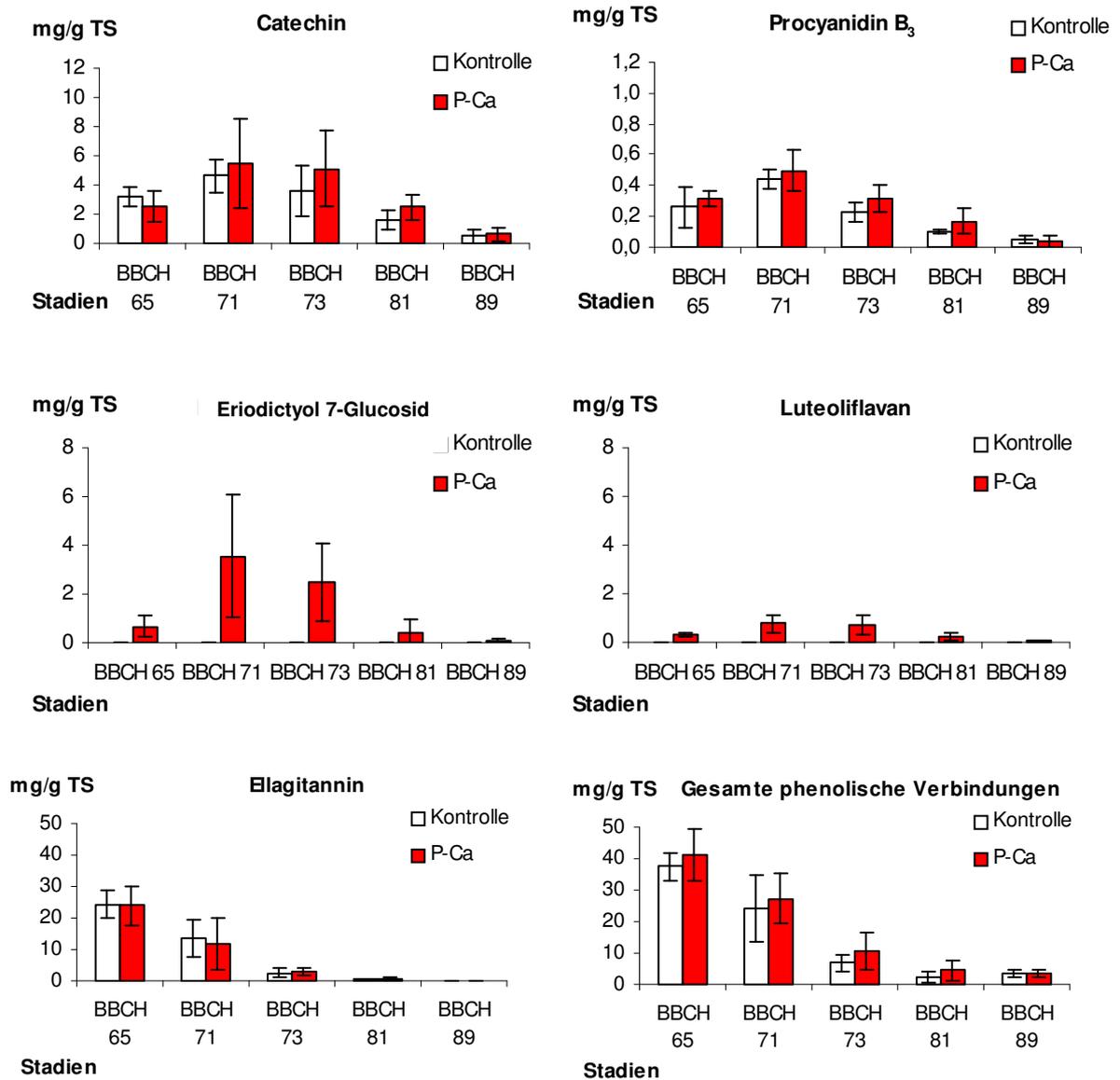


Abb.15: Entwicklung der Konzentrationen von Catechin, Procyanidin B₃, Eriodictyol 7-Glucosid, Luteoliflavan, Ellagitannin und gesamte phenolische Verbindungen in den gegen *Botrytis*-resistenten Erdbeerklonen während ihrer phänologischen Entwicklung ohne (Kontrolle) und mit Prohexadion-Ca (P-Ca) Behandlung.

Die Behandlungen wurden zwei Tage vor der Probenahme jedes Stadiums durchgeführt.

BBCH 65 Vollblüte, BBCH 71 Blütenboden deutlich aufgewölbt, BBCH 73 Nüsschenstadium, BBCH 81 weiße Früchte, BBCH 89 Früchte sortentypisch ausgefärbt

Die Konzentrationen an Ellagitannin verhielten sich mit zunehmender Blüten- und Fruchtentwicklung rückläufig (Abb.15). Bereits in der Vollblüte wurde das Maximum festgestellt. Eine Abnahme wurde im Stadium BBCH 71 und ein drastischer Rückgang im Stadium BBCH 73 beobachtet. Weiter sanken die Gehalte zur BBCH 81 gegen Null. Im Stadium BBCH 89 konnte Ellagitannin nicht mehr nachgewiesen werden. Bei der Prohexadion-Ca Variante traten keine wesentliche Unterschiede auf (Abb. 15).

Die Summe aller phenolischen Stoffe nahmen bis zum Stadium BBCH 81 ab (Abb. 15). Im Übergang von Stadium BBCH 81 zu Stadium BBCH 89 kam es zu keiner deutlichen Ab-

nahme mehr. Nach der Prohexadion-Ca Behandlung war keine Stimulation des Gesamtphenolgehalts zu beobachten (Abb.15).

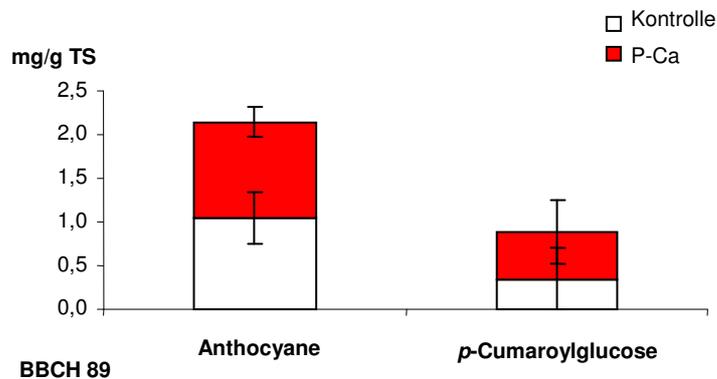


Abb.16: Konzentrationen an Anthocyanen und *p*-Cumaroylglucose in sortentypisch ausgefärbten Früchten (BBCH 89) bei den gegen *Botrytis*-resistenten Erdbeer-Klonen ohne (Kontrolle) und mit Prohexadion-Ca (P-Ca) Behandlung.

Die Behandlungen wurden zwei Tage vor der Probenahme jedes Stadiums (BBCH 65 Vollblüte, BBCH 71 Blütenboden deutlich aufgewölbt, BBCH 73 Nüsschenstadium, BBCH 81 weiße Früchte, BBCH 89 Früchte sortentypisch ausgefärbt) durchgeführt.

Die Anthocyane und *p*-Cumaroylglucose wurden erst im Stadium BBCH 89 identifiziert.

Der Gehalt der Anthocyane (Abb. 16) war durch die Anwendung des Bioregulators nicht beeinflusst. Bei der Betrachtung des Gehalts an *p*-Cumaroylglucose fällt eine leichte Zunahme bei der Prohexadion-Ca Variante auf (Abb. 16).

4.3.2 Beeinflussung des Phenylpropanoidstoffwechsels durch Prohexadion-Ca während der Blüte und der Fruchtentwicklung Sorte ‚Mara des Bois‘

‚Mara des Bois‘ wurde als *Botrytis*-anfällige Sorte beschrieben (MASNY et al. 2005). Hier wurden die Versuche mit und ohne Pflanzenschutzmaßnahme einzeln dargestellt (Abb.17, 18, 19, 20, 21). Der Grund hierfür ist die visuelle *Botrytis*-Bonitur (siehe Kapitel 4.3.5), die bei dem Versuch ohne Pflanzenschutzmaßnahme durchgeführt wurde. Somit können die Daten über den Befall mit *Botrytis cinerea* mit den Daten über die Entwicklung des Phenylpropanoidstoffwechsels während der phänologischen Entwicklung der Erdbeere verglichen werden.

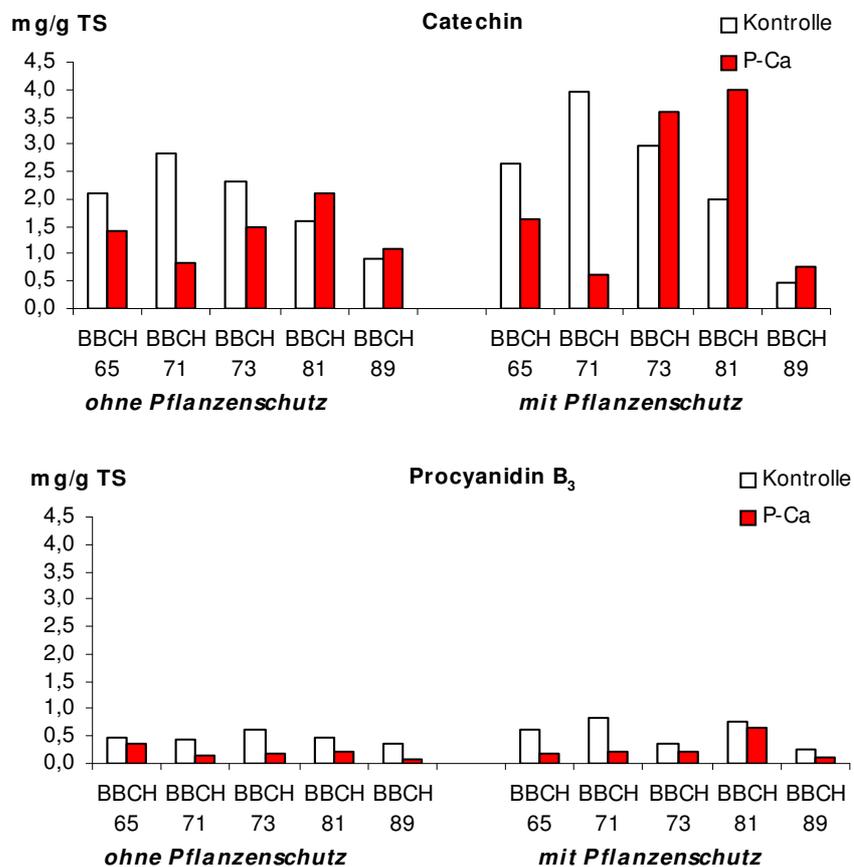


Abb.17: Entwicklung der Konzentrationen von Catechin und Procyanidin B₃ bei der Sorte ‚Mara des Bois‘ während ihrer phänologischen Entwicklung ohne (Kontrolle) und mit Prohexadion-Ca Behandlung (P-Ca). Die erste Behandlung wurde vor der Blüte durchgeführt (BBCH 59- Mehrzahl der Blüten im Ballonstadium).

Weitere Behandlungen wurden zwei Tage vor der Probenahme jedes Stadiums durchgeführt. BBCH 65 Vollblüte, BBCH 71 Blütenboden deutlich aufgewölbt, BBCH 73 Nüsschenstadium, BBCH 81 weiße Früchte, BBCH 89 Früchte sortentypisch ausgefärbt

Der Rückgang des Catechin-Gehaltes nach der Prohexadion-Ca-Behandlung wurde in beiden Versuchen ermittelt (Abb.17). Bei dem Versuch mit zusätzlicher Pflanzenschutzmaßnahme nahm der Gehalt im BBCH Stadium 73 zu. Ab diesem Zeitpunkt bis zum Ende des Versuchs wurde eine Akkumulation bei Prohexadion-Ca Varianten festgestellt. Die Akkumulation war am deutlichsten im BBCH Stadium 81 (Abb.17).

Die Reduktion des Catechin-Gehaltes bei dem Versuch ohne Pflanzenschutzmaßnahme zog sich auch während des BBCH Stadium 73 weiter (Abb. 17). Danach trat eine leichte Stimulation des Catechin-Gehaltes (BBCH 81) auf, die auch bei dem Stadium BBCH 89 nachweisbar war (Abb.17).

Der Catechin-Gehalt bei Kontrollpflanzen entwickelte sich in beiden Versuchen während Reife und Wachstum der Erdbeere gleich: die Gehalte nach der Blüte stiegen bis zum Stadium BBCH 71 an und danach nahmen die Konzentrationen bis zum Ende des Versuchs kontinuierlich ab (Abb.17). Stadien, die zusätzlich mit Fungiziden behandelt wurden, zeigten bis zum BBCH Stadium 81 etwas höhere Catechin Gehalt Werte (Abb.17).

Eine kontinuierliche Abnahme des Gehaltes an Procyanidin B₃ bei beiden Varianten nach der Blüte (BBCH 65) wurde nicht beobachtet (Abb.17). Eine Akkumulation von Procyanidin B₃ durch Prohexadion-Ca Behandlung fand nicht statt (BBCH 81, BBCH 89 im Versuch ohne Pflanzenschutzmaßnahme bzw. BBCH 73, 81, 89 im Versuch mit Pflanzenschutzmaßnahme). Somit verhielt sich Procyanidin B₃ nicht parallel zum Catechin nach der Prohexadion-Ca Behandlung (Abb.17).

Die Prohexadion-Ca Wirkung wurde weiterhin durch Akkumulation von Luteoliflavan und Eriodictyol 7-Glucosid sichtbar (Abb.18). Mengenmäßig gab es keine dominante Akkumulation, weil die beiden induzierten Substanzen über den gesamten Versuchszeitraum eine ähnliche Konzentration zeigten (Abb.18). Ein proportionales Verhältnis zwischen beiden Akkumulationen ist zu erkennen. Bei dem Versuch mit Pflanzenschutzmaßnahme, stiegen die Konzentrationen von Luteoliflavan und Eriodictyol 7-Glucosid nach der Blüte an und erreichten das Maximum im BBCH Stadium 73. Danach nahmen die beiden Konzentrationen ab. In dem Versuch, in dem die *Botrytis*-Bonitur durchgeführt wurde (ohne Pflanzenschutzmaßnahme), wurde die Steigerung im BBCH 73 unterbrochen und das Maximum wurde erst in BBCH Stadium 81 festgestellt (Abb.18).

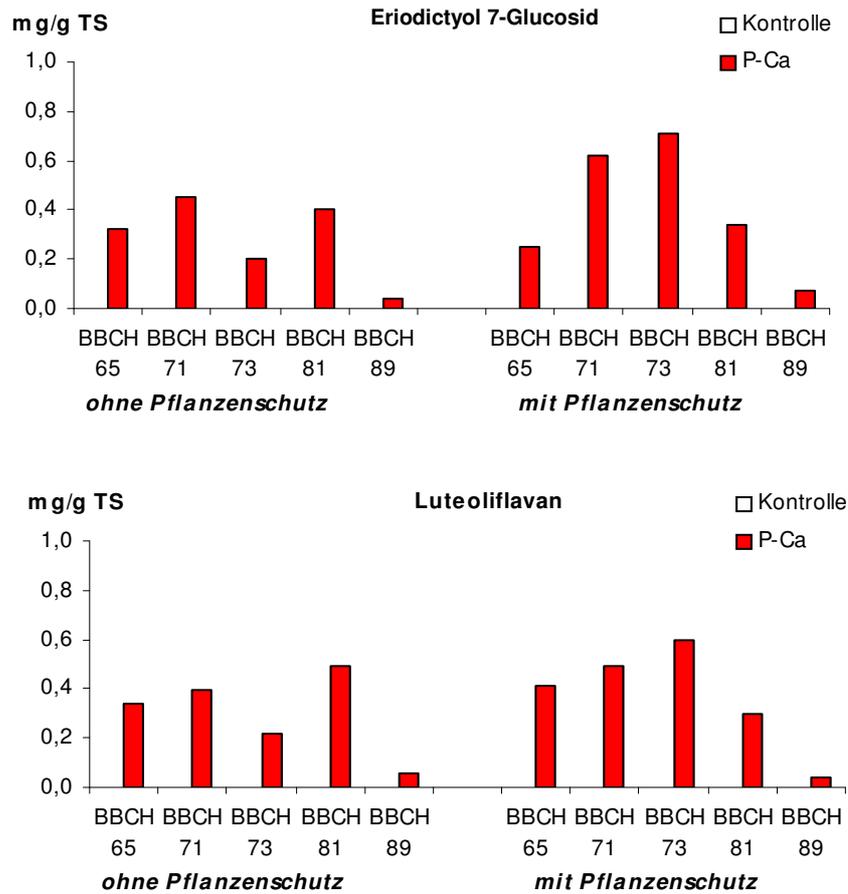


Abb. 18: Entstehung von Eriodictyol 7-Glucosid und Luteoliflavan bei der Sorte ‚Mara des Bois‘ während ihrer phänologischen Entwicklung ohne (Kontrolle) und mit Prohexadion-Ca Behandlung (P-Ca). Die erste Behandlung wurde vor der Blüte durchgeführt (BBCH 59- Mehrzahl der Blüten im Ballonstadium).

Weitere Behandlungen wurden zwei Tage vor der Probenahme jedes Stadiums durchgeführt. BBCH 65 Vollblüte, BBCH 71 Blütenboden deutlich aufgewölbt, BBCH 73 Nüsschenstadium, BBCH 81 weiße Früchte, BBCH 89 Früchte sortentypisch ausgefärbt

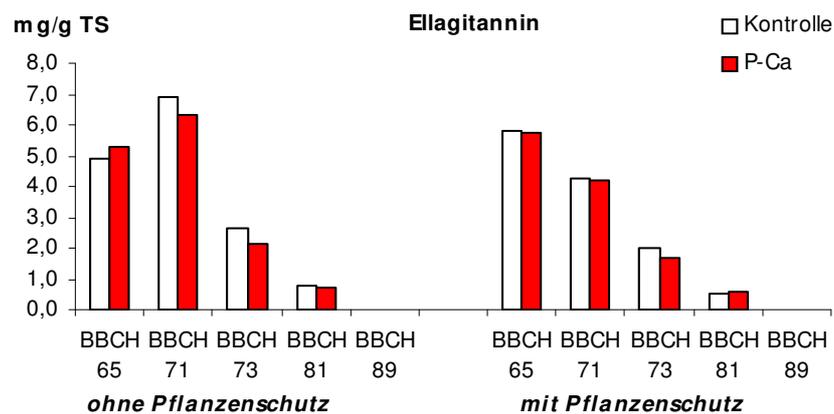


Abb. 19: Einfluss von Prohexadion-Ca auf die Konzentration von Ellagitannin bei der Sorte ‚Mara des Bois‘ während ihrer phänologischen Entwicklung ohne (Kontrolle) und mit Prohexadion-Ca Behandlung (P-Ca). Die erste Behandlung wurde vor der Blüte durchgeführt (BBCH 59- Mehrzahl der Blüten im Ballonstadium).

Weitere Behandlungen wurden zwei Tage vor der Probenahme jedes Stadiums durchgeführt. BBCH 65 Vollblüte, BBCH 71 Blütenboden deutlich aufgewölbt, BBCH 73 Nüsschenstadium, BBCH 81 weiße Früchte, BBCH 89 Früchte sortentypisch ausgefärbt

Während des Wachstums und der Reife der Erdbeere wurde eine deutliche Reduzierung von Ellagitannin in beiden Versuchen im Nüsschenstadium (BBCH 73) festgestellt (Abb.19). Der Unterschiede im Konzentrationsverlauf zwischen den beiden Versuchen wurden nach der Blüte festgestellt (Abb.19). So nahm der Ellagitannin-Gehalt im Standort Blumenstraße (Versuch ohne Pflanzenschutzmaßnahme) im Stadium BBCH 71 zu, während BBCH 71 am Standort Dürnast (Versuch mit Pflanzenschutzmaßnahme) eine Reduzierung zeigte. Die Behandlung mit Prohexadion-Ca hat die Gehalte an Ellagitannin während Wachstum und Reife nicht deutlich verändert. Im Stadium BBCH 89 wurde kein Ellagitannin nachgewiesen (Abb.19).

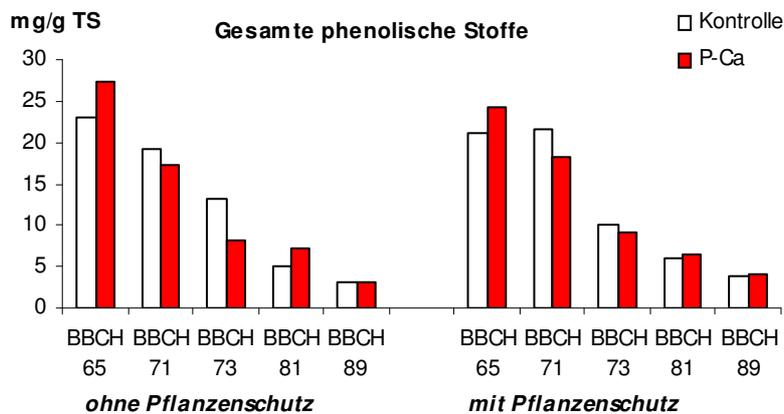


Abb. 20: Entwicklung der Konzentration von gesamten phenolischen Stoffen bei der Sorte ‚Mara des Bois‘ während ihrer phänologischen Entwicklung ohne (Kontrolle) und mit Prohexadion-Ca Behandlung (P-Ca). Die erste Behandlung wurde vor der Blüte durchgeführt (BBCH 59- Mehrzahl der Blüten im Ballonstadium). Weitere Behandlungen wurden zwei Tage vor der Probenahme jedes Stadiums durchgeführt. BBCH 65 Vollblüte, BBCH 71 Blütenboden deutlich aufgewölbt, BBCH 73 Nüsschenstadium, BBCH 81 weiße Früchte, BBCH 89 Früchte sortentypisch ausgefärbt.

Die Konzentrationen an den gesamten phenolischen Stoffen verhielten sich ab Stadium BBCH 71 mit zunehmender Fruchtentwicklung hinweg rückläufig (Abb.20). Die Behandlung mit Prohexadion-Ca führte im Stadium BBCH 73 zu einer nennenswerten Reduzierung (Versuch ohne Pflanzenschutzmaßnahme). Sonst ergaben sich keine größeren Unterschiede zwischen Kontrolle und Prohexadion-Ca Varianten (Abb.20).

4.3.3 Beeinflussung des Phenylpropanoidstoffwechsels durch Prohexadion-Ca und Prohexadion-Ca/Milsana Behandlung während der Blüte und der Fruchtentwicklung Sorte ‚Elsanta‘

Bei der *Botrytis* anfällige Sorte ‚Elsanta‘ wurde eine Milsana Behandlung in Kombination mit Prohexadion-Ca, durchgeführt. Durch *Botrytis*-Bonitur bei dem Versuch ohne Pflanzenschutzmaßnahmen wurde getestet ob diese Kombinationsbehandlung einen resistenz-induzierenden Effekt zeigt (siehe Kapitell 4.3.5). Durch Phenolanalytik wurde beobachtet, ob Milsana als Pflanzenstärkungsmittel die Prohexadion-Ca Wirkung beeinflussen kann.

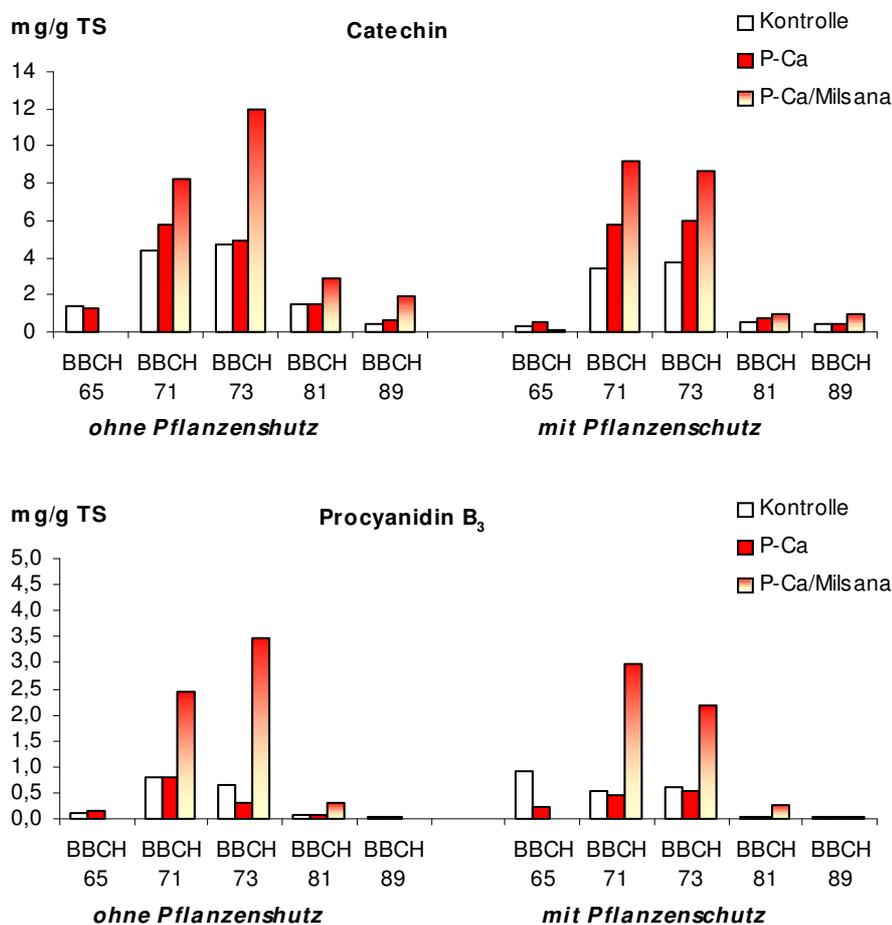


Abb. 22: Einfluss von Prohexadion-Ca (P-Ca) und Kombinationsbehandlung (P-Ca/Milsana) auf die Konzentration von Catechin und Procyanidin B₃ während der Blüte und der Fruchtentwicklung der Sorte ‚Elsanta‘.

Die Behandlungen wurden zwei Tage vor der Probenahme jedes Stadiums durchgeführt.

BBCH 65 Vollblüte, BBCH 71 Blütenboden deutlich aufgewölbt, BBCH 73 Nüsschenstadium, BBCH 81 weiße Früchte, BBCH 89 Früchte sortentypisch ausgefärbt

Ein deutlicher Rückgang des Catechingehaltes und des Gehaltes von Procyanidin B₃ wurde im Übergang von Stadium BBCH 73 zum Stadium BBCH 81 aufgezeigt (Abb.22).

Der Verlauf von Procyanidin B₃ folgte dem Verlauf des Catechingehaltes. Eine Ausnahme zeigte sich im Übergang von Blüte (BBCH 65) zum Stadium Blütenboden deutlich aufgewölbt (BBCH 71) bei dem Versuch mit Pflanzenschutzmaßnahme. Hier stieg der Catechingehalt nach der Blüte an, während der Gehalt an Procyanidin B₃ abnahm (Abb.22).

Die Prohexadion-Ca Behandlung bewirkte eine leichte Induktion der Catechin-Biosynthese in den Stadien BBCH 71 und 73 (Abb.22). Die Induktion ist mehr ausgeprägt bei den Früchten, die zusätzlich mit Pflanzenschutzmittel behandelt wurden. Andere Stadien zeigten keine deutlichen Veränderungen des Catechingehaltes nach der Prohexadion-Ca Wirkung. Zur Beeinflussung der Procyanidin B₃ Konzentration durch Prohexadion-Ca lässt sich keine allgemeingültige Aussage treffen. Während die mit Prohexadion-Ca behandelten Stadien BBCH 73 bei dem Versuch ohne Pflanzenschutzmaßnahme eine leichte Reduktion zeigten, behielten andere Früchten ihr Procyanidin B₃ Niveau nach der Prohexadion-Ca Behandlung bei. Die Blüten (BBCH 65) im Versuch mit Pflanzenschutzmaßnahme zeigten eine durch die Prohexadion-Ca Behandlung verursachte Reduktion der Procyanidin B₃ Konzentration (Abb.22).

Die Kombinationsbehandlung mit Milsana verstärkte deutlich die Induktion der Catechin Biosynthese in den Stadien BBCH 71 und 73 (Abb.22). Zusätzlich wurden hier auch die Konzentrationen an Procyanidin B₃ durch Kombinationsbehandlung gesteigert. Die Induktion von Procyanidin B₃ war in reifen Früchten (BBCH 89) nicht mehr ersichtlich, während sich die Induktion von Catechin bis zum Ende des Versuches (BBCH 89) weiter zog (Abb.22).

Bei der Kombinationsbehandlung konnten Catechin und Procyanidin B₃ zur Vollblüte nicht nachgewiesen werden (Abb.22).

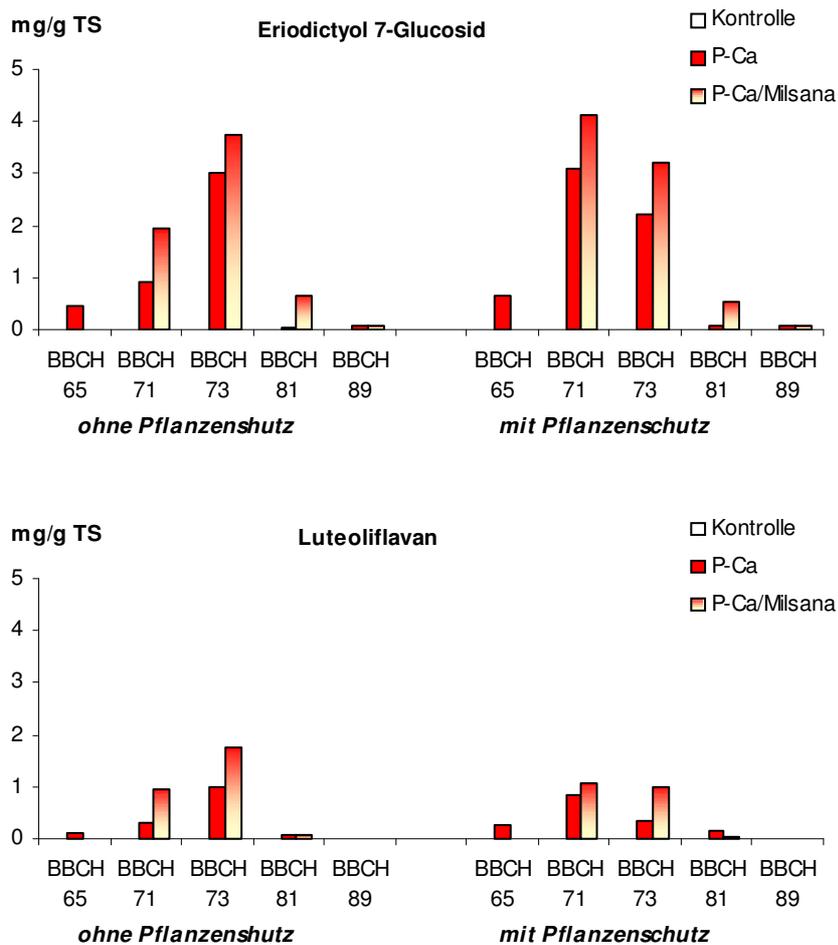


Abb. 23: Einfluss von Prohexadion-Ca (P-Ca) und Kombinationsbehandlung (P-Ca/Milsana) auf die Konzentration von Eriodictyol 7-Glucosid und Luteoliflavan während der Blüte und der Fruchtentwicklung Sorte ‚Elsanta‘.

Die Behandlungen wurden zwei Tage vor der Probenahme jedes Stadiums durchgeführt.

BBCH 65 Vollblüte, BBCH 71 Blütenboden deutlich aufgewölbt, BBCH 73 Nüsschenstadium, BBCH 81 weiße Früchte, BBCH 89 Früchte sortentypisch ausgefärbt

In den grünen Früchten (BBCH 71, 73, 78) erfolgte eine verstärkte Akkumulation von Eriodictyol 7-Glucosid durch die Kombinationsbehandlung mit Milsana (Abb.23). Die am Ende des Versuches verursachte Steigerung von Eriodictyol 7-Glucosid durch die Kombinationsbehandlung wurde nicht mehr beobachtet (BBCH 89) (Abb.23).

Die Bildung von Luteoliflavan wurde am meisten in den Stadien BBCH 71 und 73 durch Milsana unterstützt. In BBCH Stadien 81 waren die Werte von Luteoliflavan sehr niedrig und in den Stadien BBCH 89 wurden sie nicht mehr nachweisbar (Abb. 23).

Während des gesamten Versuchzeitraums dominierte die Eriodictyol 7-Glucosid Bildung über die Luteoliflavan Bildung (Abb. 23).

Bei der Kombinationsbehandlung waren Eriodictyol 7-Glucosid und Luteoliflavan in der Blüte (BBCH 65) nicht nachweisbar (Abb. 23).

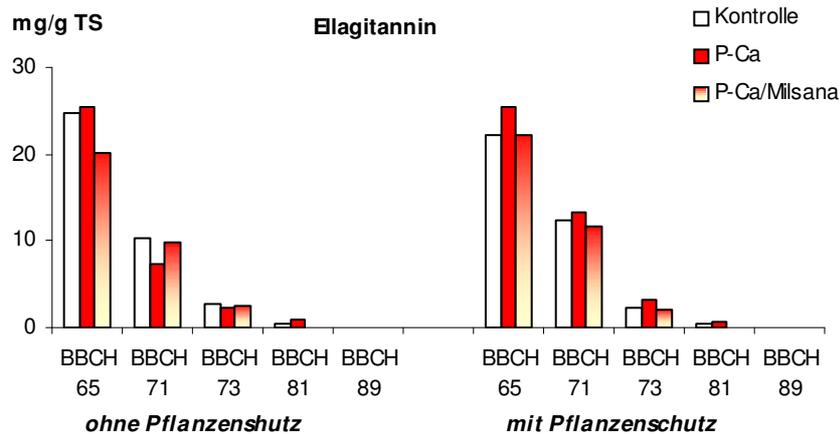


Abb. 24: Einfluss von Prohexadion-Ca (P-Ca) und Kombinationsbehandlung (P-Ca/Milsana) auf die Konzentration von Ellagitannin während der Blüte und der Fruchtentwicklung Sorte ‚Elsanta‘. Die Behandlungen wurden zwei Tage vor der Probenahme jedes Stadiums durchgeführt. BBCH 65 Vollblüte, BBCH 71 Blütenboden deutlich aufgewölbt, BBCH 73 Nüsschenstadium, BBCH 81 weiße Früchte, BBCH 89 Früchte sortentypisch ausgefärbt

Nach der Blüte (BBCH 65) kam es zu einer kontinuierlichen Abnahme des Ellagitanningehaltes (Abb. 24). Im Stadium BBCH 89 wurde Ellagitannin nicht nachgewiesen. Prohexadion-Ca und Milsana wirkten sich offenbar nicht auf die Ellagitannin-Gehalte aus (Abb.24).

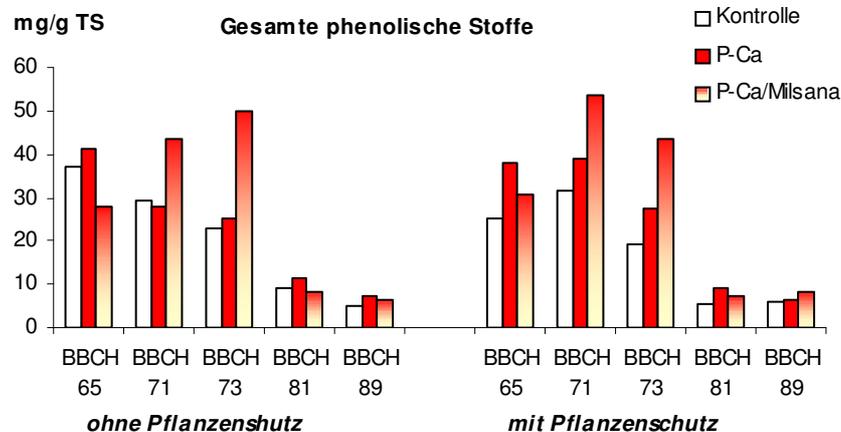


Abb.25: Einfluss von Prohexadion-Ca (P-Ca) und Kombinationsbehandlung (P-Ca/Milsana) auf die Konzentration von gesamten phenolischen Stoffen während der Blüte und der Fruchtentwicklung Sorte. Die Behandlungen wurden zwei Tage vor der Probenahme jedes Stadiums durchgeführt. BBCH 65 Vollblüte, BBCH 71 Blütenboden deutlich aufgewölbt, BBCH 73 Nüsschenstadium, BBCH 81 weiße Früchte, BBCH 89 Früchte sortentypisch ausgefärbt

Durch die Kombinationsbehandlung (P-Ca/Milsana) kam es zu einem Anstieg an den gesamten phenolischen Stoffen in den Stadien BBCH 71 und 73 (Abb.25). Dieser Effekt konnte in späteren Stadien nicht mehr festgestellt werden. Ein deutlicher Rückgang am Gesamtphenolgehalt wurde im Übergang von BBCH 73 zu BBCH 81 aufgezeigt. Die Wirkung der Prohexadion-Ca/Milsana Behandlung ließ ebenfalls in diesem Übergang nach.

Die Prohexadion-Ca Behandlung bewirkte eine leichte Induktion an den gesamten phenolischen Stoffen in allen Stadien in dem Versuch mit Pflanzenschutzmaßnahme außer in den reifen Früchten (BBCH 89). In dem Versuch ohne Pflanzenschutzmaßnahme wurden die phenolischen Stoffe nach der Prohexadion-Ca Behandlung nicht deutlich beeinflusst (Abb.25).

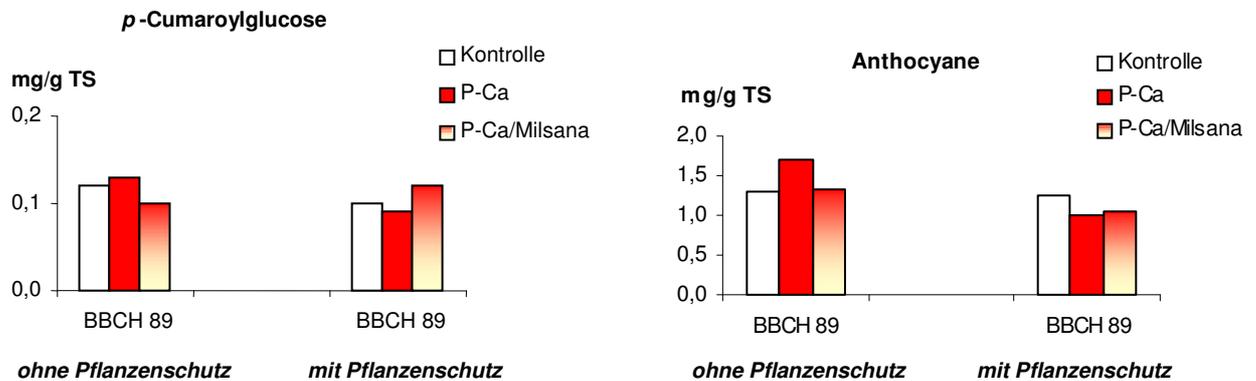


Abb.26: Einfluss von Prohexadion-Ca (P-Ca) und Kombinationsbehandlung (P-Ca/Milsana) auf die Konzentrationen an Anthocyane und *p*-Cumaroylglucose in sortentypisch ausgefärbten Früchte (BBCH 89) Sorte ‚Elsanta‘.

Die Behandlungen wurden zwei Tage vor der Probenahme jedes Stadiums durchgeführt.

BBCH 65 Vollblüte, BBCH 71 Blütenboden deutlich aufgewölbt, BBCH 73 Nüsschenstadium, BBCH 81 weiße Früchte, BBCH 89 Früchte sortentypisch ausgefärbt.

Die Anthocyane und *p*-Cumaroylglucose wurden erst im Stadium BBCH 89 identifiziert.

Die Prohexadion-Ca Behandlung und Kombinationsbehandlung von Prohexadion-Ca und Milsana wirkten sich nicht deutlich auf die Gehalte an *p*-Cumaroylglucose und Anthocyanen aus (Abb.26). Bei dem Versuch ohne Pflanzenschutzmaßnahme war der Gehalt an *p*-Cumaroylglucose durch die Prohexadion-Ca Behandlung leicht erhöht (Abb.26). Dieser Effekt wurde bei dem Versuch ohne Pflanzenschutzmaßnahme nicht beobachtet.

4.3.4 Sorten- und Klonenunterschiede

Catechin kommt in allen Sorten und Stadien in deutlich höherer Konzentration als Procyanidin B₃ vor (Abb. 15, 17, 22). Das Maximum von Catechin lag bei etwa 4mg/g TS. Es wurden keine deutlichen Unterschiede zwischen Sorten und Klonen beobachtet. Der minimale Catechingehalt wurde bei allen Sorten und Klonen im Stadium BBCH 89 festgestellt und lag bei etwa 0,4 mg/g TS, nur bei der Sorte ‚Elsanta‘ (die zusätzlich mit Pflanzenschutzmitteln behandelt wurde), wurde eine höhere Konzentration von 0,89 mg/g TS beobachtet (Abb.22).

Die höchsten Gehalte an Procyanidin B₃ traten in der Sorte ‚Mara des Bois‘ auf (Abb 17.) Die reifen Früchten von ‚Mara des Bois‘ (BBCH 89) besaßen 10-fach mehr Procyanidin B₃

(0,2 mg/g TS) (Abb.17) als die Sorte ‚*Elsanta*‘ (Abb.22) und die Klone (Abb.15). Im Gegensatz dazu waren die Werte an Ellagitannin während der Blüte (BBCH 65) 4-mal niedriger (etwa 5mg/g TS) bei der Sorte ‚*Mara des Bois*‘ (Abb.19) als bei der Sorte ‚*Elsanta*‘ (Abb.24) und den Klonen ‚II/29‘ und ‚91/13/3‘ (Abb.15). Ellagitannin bildet die Hauptkomponente der phenolischen Verbindungen der Erdbeere bis zum Stadium BBCH 89 (Abb.15, 19 ,24). Ein Nachweis von Ellagitannin in den Stadien BBCH 89 wurde nicht belegt (Abb.15, 19, 24).

p-Cumarsäure und Anthocyane wurden nur in den BBCH Stadien 89 nachgewiesen (Abb. 16, 21, 26). Vom Gesamtniveau her ließen sich die Sorten und Klone miteinander vergleichen. Der Anthocyangehalt lag zwischen 1-1,5 mg/g TS (Abb.16, 21, 26). In den reifen Erdbeeren waren Anthocyane vorherrschend. Der *p*-Cumarsäuregehalt bewegte sich zwischen 0,1 bis zum 0,35 mg/g TS (Abb. 16, 21 ,26).

Der Rückgang der gesamten phenolischen Stoffe während der phänologischen Entwicklung der Erdbeere ist ab BBCH Stadium 73 zu beobachten (Abb.15, 20, 25). Beim Vergleich des Gesamtphenolgehaltes wurden die niedrigsten Werte bei der Sorte ‚*Mara des Bois*‘ gemessen (Abb.20).

4.3.5 Botrytis-Bonitur

Zur Feststellung, ob Prohexadion-Ca bzw. Milsana in der Lage sind, die *Botrytis*-Anfälligkeit zu ändern, wurde während des gesamten Versuchzeitraumes eine *Botrytis*-Bonitur durchgeführt (bonitert wurden nur die Pflanzen, die nicht mit Pflanzenschutzmittel behandelt wurden). Obwohl die Bonitur während der gesamten Erdbeerentwicklung ermittelt wurde (VARGA 2005), wurden nur die Ergebnisse von Blüten (BBCH 65) und roten Früchten (BBCH 89) dargestellt. In den Blüten (BBCH 65) findet die Infektion vom *Botrytis cinerea* statt und die Krankheitssymptome werden erst in roten Früchten sichtbar (BBCH 89) (SCHERER et al. 1982, BRISTOW et al. 1986 JERSCH et al. 1989, BOFF et al. 2003).

Während der Bonitur wurde sowohl in der behandelten als auch in der nicht behandelten Variante das Vertrocknen von Blüten festgestellt (Bild 1). Bei Klon ‚91/3/3‘ war das Vertrocknen der Blüte sehr gering und es wurde kein Unterschied zwischen Kontrolle und Prohexadion-Ca Variante erfasst (Abb.29). Etwas mehr vertrocknete Blüte wurde bei Klon II/29 beobachtet (Abb.29). Das Vertrocknen war ausgeprägter bei den mit Prohexadion-Ca behandelten Blüten.

Das höchste Prozent von vertrockneten unbehandelten Blüten wurde bei der Sorte *Mara des Bois* beobachtet (39%) (Abb.26). Nach der Prohexadion-Ca Behandlung war die Vertrocknung von Blüten um 64% erhöht. Die Zunahme von vertrockneten Blüten durch Prohexadion-Ca wurde auch bei der Sorte ‚*Elsanta*‘ beobachtet (von 34 auf 46%), während

bei der Kombinationsbehandlung mit Milsana eine Abnahme von vertrockneten Blüten festgestellt wurde (Abb.26). Die vertrockneten Blüten (Bild 1) wurden gesammelt und der Befall von *Botrytis cinerea* durch Inkubation nachgewiesen (Bild 2).



Bild 1: vertrocknete Blüte



Bild 2: Grauschimmel an vertrockneten Blüten nach der Inkubation

Bei den Klonen wurden sowohl in der behandelten als auch in der nichtbehandelten Variante bis zum Zeitpunkt einer marktrelevanten Erdbeerernte keine Grauschimmelsymptome an den Früchten festgestellt (Abb.28). Die Kontrollfrüchte bei der Sorte ‚Mara des Bois‘ zeigten einen Befall von 6,6%, bei der Prohexadion-Ca Behandlung lag der Befall bei 16,6% (Abb.28).

Bei der Bonitur der Sorte ‚Elsanta‘ waren die unbehandelten Früchte in der Kontrolle zu 34%, die mit Prohexadion-Ca behandelten zu 46% befallen. Die Kombinationsbehandlung von Prohexadion-Ca und Milsana senkte den Befall im Vergleich zur Kontrolle auf 20% (Abb.28).

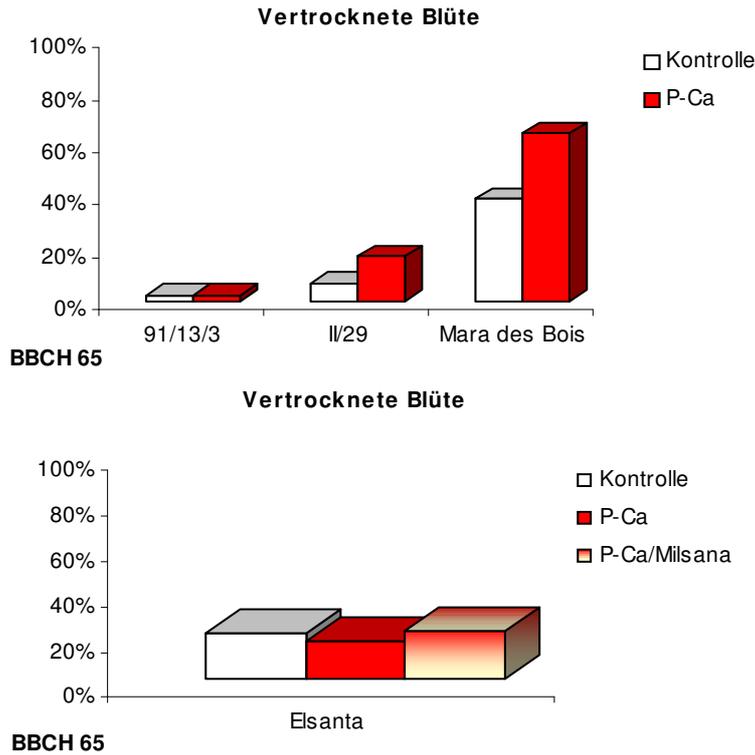


Abb. 27: Prozent der vertrockneten Blüten bei den Klonen ,91/13/3', ,II/29' und Sorten ,Mara des Bois' und ,Elsanta' behandelt mit Wasser (Kontrolle), Prohexadion-Ca (Pro-Ca) und mit Prohexadion-Ca und Milsana (P-Ca/Milsana).

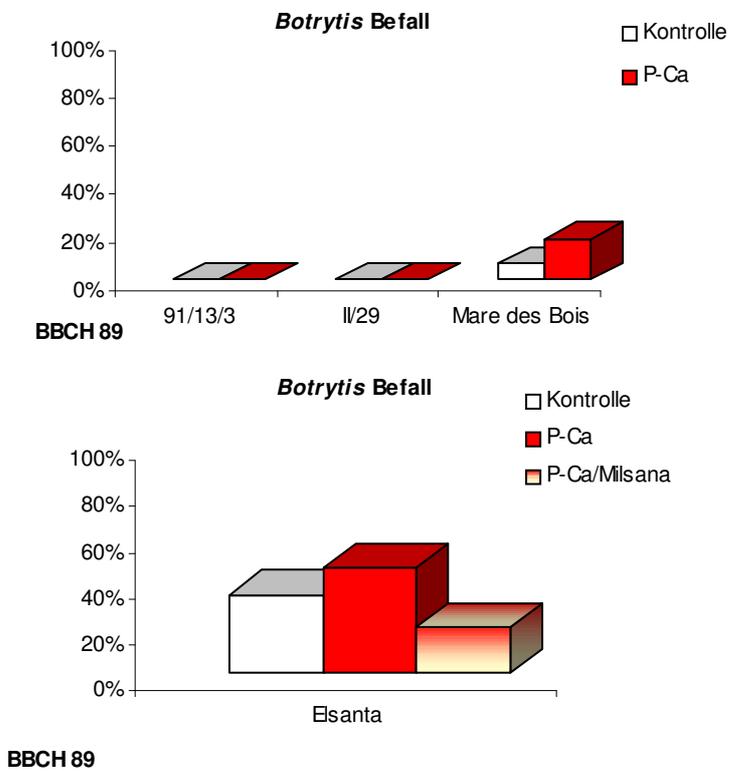


Abb. 28: Botrytis Befall bei der Klonen ,91/13/3', ,II/29' und Sorten ,Mara des Bois' und ,Elsanta' behandelt mit Wasser (Kontrolle), Prohexadion-Ca (Pro-Ca) und mit Prohexadion-Ca und Milsana (P-Ca/Milsana). BBCH Stadium 89 (Früchte sortentypisch ausgefärbt)

4.3.6 Diskussion

Die Dominanz der Pelargonidin-Derivate gegenüber den Cyanidin-Derivaten in roten Früchten (**VERSARI et al. 1997**, **DI VENERE et al. 1998**, **GARCIA-VIQUERA et al. 1998**, **KOSAR et al. 2004**, **MÄÄTTÄ-RIIHINEN et al. 2004**), wie auch die des Catechins in grünen Früchten (Abb. 15, 17, 22) erlauben die Behauptung, dass die Biosynthese der Flavonoide während der Erdbeerentwicklung in zwei verschiedenen Richtungen abläuft (Abb. 29, 30). Der in den Blüten und grünen Erdbeeren stattfindende Weg ist durch eine 3'4'-Hydroxylierung des B-Rings charakterisiert. Da bis jetzt keine F3'H aus Erdbeeren kloniert und charakterisiert wurde, sei es dahingestellt, ob diese Hydroxylierung auf der Ebene der Zimtsäuren oder durch F3'H Aktivität geschieht (Abb. 30). Auffallend hohe Konzentrationen an Catechin in den Blüten und grünen Früchten weisen darauf hin (Abb. 15, 17, 22) dass die Phenylpropanoidbiosynthese hier hauptsächlich zur Catechin-Produktion dient. Der Verlauf seiner Konzentrationen während der Entwicklung der Erdbeere folgte bei allen Sorten einem ähnlichen Muster: Nach der Blüte kam es zu einem Anstieg des Catechingehaltes in BBCH Stadium 71 bzw. BBCH 73 (Abb. 15, 17, 22). Ab dem Übergang von Stadium BBCH 73 zum Stadium BBCH 81 fand eine deutliche Abnahme statt (Abb. 15, 17, 22). Der minimale Catechingehalt wurde bei allen Sorten und Klonen im Stadium BBCH 89 festgestellt. Nach Ergebnissen zur Expression des *LAR*-Gens (**ALMEIDA et al. 2007**), dessen korrespondierendes Enzym in Position 4 die Reduktion von Leukoanthocyanidinen zu Catechinen katalysiert (**TANNER et al. 2003**), zeigte die *LAR* ein zweiphasiges Muster mit einem hohen Expressionniveau in grünen Früchten, einem Abfall im weißem Fruchtstadium und einem erneuten Anstieg beim Farbumschlag. Auch **DEIML (2007)** berichtete über einen Anstieg der *LAR*-Aktivität beim Farbumschlag.

Das erste Maximum deckt sich mit dem hohen Catechingehalt nach der HPLC-Analyse, während das zweite Maximum den sinkenden Catechingehalt in reifenden Erdbeerfrüchten nicht widerspiegelt (Abb. 15, 17, 22). Das zweite Maximum der *LAR*-Aktivität tritt zum Zeitpunkt des Farbumschlag von weiß nach rot auf und deswegen wird vermutet, dass der spätere Anstieg von *LAR* für die Bildung von Cyanidin-Derivaten zuständig ist. Bei dem Enzym *LAR* handelt es sich um eine Oxidoreduktase, die mit NADPH als Cofaktor eine Reduktion, mit NADP⁺ dagegen eine Oxidation katalysiert. Das Gleichgewicht der Reaktion hängt dabei unter anderem vom pH-Wert ab (**FORKMANN UND HELLER 1999**). Weil sich der pH-Wert bei der Reife durch Säureabbau und Akkumulation von Zucker wesentlich ändert (**GOTO-YAMAMOTO et al. 2002**), wäre eine Rückreaktion zu Leucocyanidin in der reifen Frucht denkbar. Durch diese Rückreaktion würde die Funktion von *LAR* während der Anthocyaninsynthese und deren zweiphasiges Genexpressionmuster

während der Erdbeerentwicklung erklärt. Im Gegensatz zum Cyanidin könnte die Entstehung von Pelargonidin-Derivaten als 4'-hydroxylierten Anthocyanen durch *de novo* Synthese von *PAL* bestimmt werden. Die *PAL*-Aktivität (**CHENG et al. 1991, HALBWIRTH et al. 2006**) und *PAL*-Expression (**ALMEIDA et al. 2007**) zeigt einen erneuten Anstieg bei der Fruchtreife. Akkumulationen von *p*-Cumarsäure in reifen Früchten (Abb.16, 21, 26) verweisen darauf, dass die Akkumulation von Pelargonidin-Derivaten als 4'-hydroxylierte Anthocyane durch *de novo* Synthese von *PAL* bestimmt wurden, während Cyanidin-Derivate als Produkte der „alten“ Catechinbiosynthese entstehen (Abb.31).

Quercetin und Kämpferol sind in der Regel die häufigsten Aglyca (**HÄKKINEN UND TÖRRÖNEN, 2000**) in der Erdbeere. Die Konzentration von Kämpferol 3-Glucosid nimmt im Gegensatz zu Quercetin 3-Glucosid reifekorreliert zu (**GRIEBER 2007**). Wie in Material und Methoden erläutert, gab es Schwierigkeiten bei der Flavonol-Identifizierung und Quantifizierung, weil diese oft mit Ellagsäure verunreinigt waren. Daher werden keine Aussagen über Quercetin- und Kämpferol-Derivate während der Erdbeerentwicklung im vorliegenden Versuch getroffen.

Im Versuch 2005 wurde eine andere Säule zur Quantifizierung von Kämpferol- und Quercetin-Derivaten verwendet. Die Ergebnisse zeigten, dass Blüten und grüne Früchte viel mehr Quercetin als Kämpferol akkumulieren (Abb.29). Deswegen wird vermutet, dass die positive Korrelation von Kämpferol mit der *de novo* Synthese von *PAL* während der Fruchtreife durch Pelargonidin-Synthese verursacht wurde, während die Abnahme von Quercetinglukosiden in Zusammenhang mit dem abnehmenden Catechin-Gehalt steht (Abb.31). Hier stellt sich die Frage, ob in den reifen Früchten durch pH-Änderung Leucocyanidin weiter durch Rückreaktion von DFR zu Dihydroquercetin oxidiert werden kann. Die *DFR*-Genexpression (**MOYANO et al. 1998, ALMEIDA et al. 2007**) und *DFR*-Enzymaktivität (**HALBWIRTH et al. 2006**) verhalten sich auch zweiphasig. Damit würden Cyanidin und Quercetin genau wie Pelargonidin und Kämpferol parallel während der Anthocyan synthese verlaufen, um eine korrespondierende Copigmentierung (**WINKEL-SHIRLEY 2001**) zu kontrollieren. Unterschiedliche Flavonolmuster im Verlauf der Fruchtentwicklung beobachteten auch **JAAKOLA et al. (2002)** bei Heidelbeeren. Über die *FLS*-Aktivität in der Erdbeer-Blüte wurde nicht berichtet. **DOWNEY et al. (2003a)** beschrieben zwei Anstiege der Flavonolsynthese in Weinreben. Der erste findet in der Blüte, der zweite während der Reife statt. Weil die Blüte sehr hohe Konzentrationen an Flavonolen zeigen (Abb.29), kann vermutet werden, dass rund um die Blüte der Erdbeere auch die erste Hauptperiode der Flavonolsynthese stattfindet und dass von daher die *FLS*-Aktivität in diesen Stadien sehr hoch ist. Der Anstieg von Flavonolen rund um die Blüte und Reife deutet darauf hin, dass Flavonole eine Rolle bei der Befruchtung spielen (**LODISH et al. 1995, zitiert in DOWNEY et al. 2003a**).

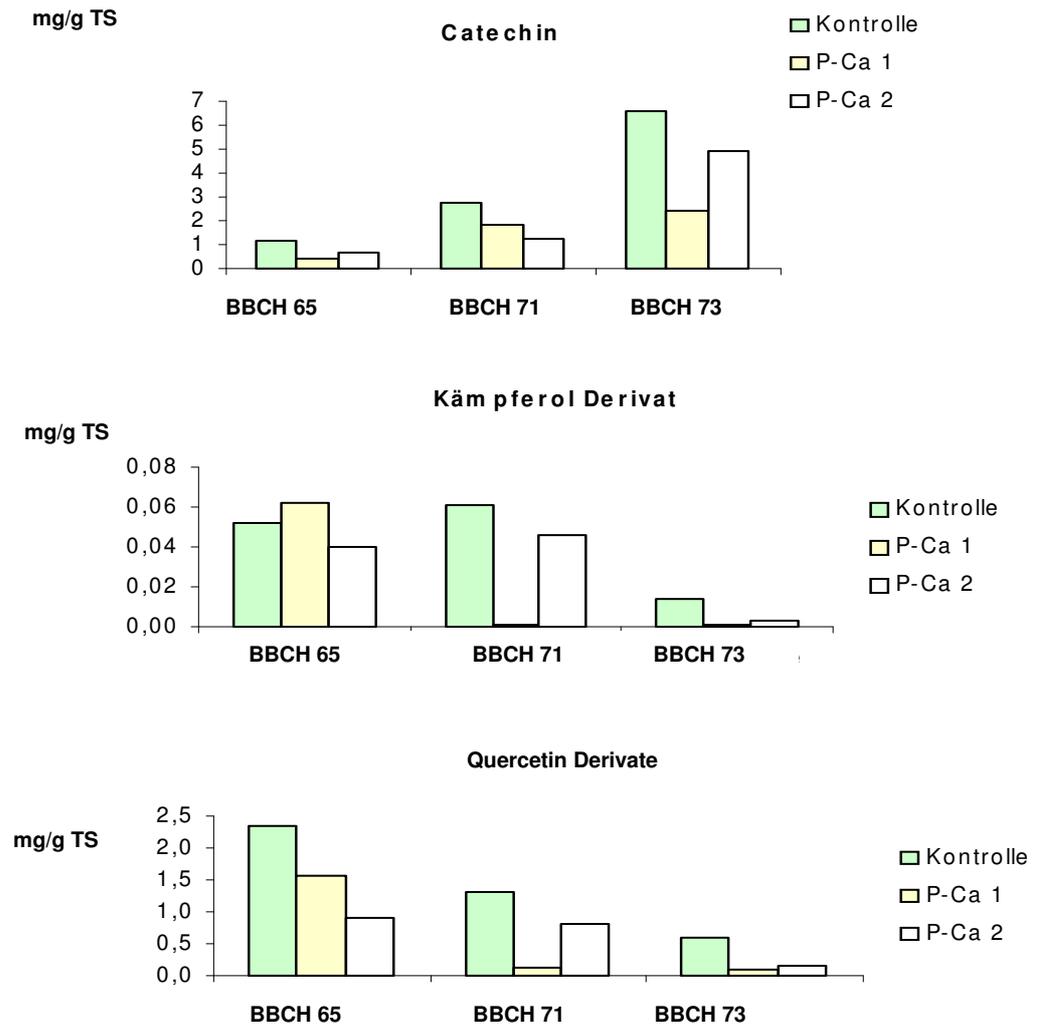


Abb. 29: Entwicklung der Catechin und Flavonol Gehalte nach Prohexadion-Ca Behandlung vor (P-Ca 1) und während der Blüte (P-Ca 2)

Nach der Prohexadion-Ca Wirkung wurden die Gehalte an Flavonolen reduziert (Abb.29). Zu der Abnahme der Flavonole kam es nach erfolgreicher Hemmung der FLS Aktivität als 2-oxoglutaratabhängigem Enzym (**FORKMANN UND HELLER 1999**) durch Prohexadion-Ca Behandlung.

WELLMANN et al. (2006) zeigten mit rekombinanter ANS aus *Gerbera*, dass diese auch eine Oxidation von Catechin und dessen anschließende Dimerisierung katalysieren kann. **ALMEIDA et al. (2007)** fanden hier ähnlich wie bei der LAR ein zweiphasiges Genexpressionmuster mit einer rückläufigen Transkription in grünen Früchten und einem Anstieg zum Zeitpunkt des Farbumschlages von weiß nach rot. Der spätere Anstieg dient zur Bildung von Anthocyanen aus Leucocyanidin, während die Rolle der ANS in grünen Früchten unklar bleibt, da Epicatechin(-untereinheiten) und Anthocyane im vorliegenden

Versuch nicht nachgewiesen wurden. Deswegen wird vermutet, dass die Aktivität der ANS in grünen Früchten zur Bildung von Procyanidin B₃ dient.

Weil Epicatechin als konstitutive Verbindung in Erdbeeren beschrieben wurde (**BREITFELLNER et al. 2002**, **BREITFELLNER et al. 2003**, **FOSSEN et al. 2004**), ist es nicht auszuschließen, dass ANS in grünen Früchten durch Cyanidinsynthese indirekt für die Epicatechin-Bildung zuständig ist, da Epicatechin nach **XIE UND DIXON (2005)** aus Cyanidin mittels ANR entsteht.

Der Procyanidin B₃-Verlauf ist ähnlich dem des Catechins nach der Prohexadion-Ca Behandlung (Abb.15, 22) . Eine Ausnahme wurde bei der Sorte ‚*Mara des Bois*‘ (Abb.17) festgestellt. Hier gab es keine spätere Induktion von Procyanidin B₃ obwohl der Catechin-Gehalt induziert wurde.

Zur Catechinsynthese ist Enzym FHT nötig, das wiederum 2-oxoglutaratabhängig ist (**FORKMANN UND HELLER 1999**). Die Akkumulation von Eriodictyol 7-Glucosid (Abb.15, 18, 23) nach Prohexadion-Ca- Einwirkung weist darauf hin, dass FHT tatsächlich durch Prohexadion-Ca gehemmt wurde.

Nimmt man an, dass die ANS für die Procyanidin B₃-Dimerisation zuständig ist, kommt eine regelmäßige Abnahme von Procyanidin B₃, die in einer kompetitiven Hemmung der ANS als 2-oxoglutaratabhängigem Enzym (**RADEMACHER 2000**) durch Prohexadion-Ca begründet ist, nicht in Betracht. Grund hierfür ist, dass der Biosyntheseweg bis zur Catechin-Bildung empfänglicher für die Wirkung von Prohexadion-Ca ist und damit alle Änderungen in der Procyanidin B₃-Akkumulation nach der Prohexadion-Ca Behandlung indirekt durch die Catechinsynthese hervorgerufen wurden. Die Procyanidin B₃-Biosynthese läuft so lange parallel zur Catechinsynthese, bis das Enzym, das für die Procyanidin-Dimerisation zuständig ist, nicht durch die Catechinbildung übersättigt ist. Deswegen festgestellte Catechin Induktion nach der Prohexadion-Ca Behandlung bei der Sorte ‚*Mara des Bois*‘ (Stadien BBCH 73 und BBCH 81) wurde nicht mit Procyanidin B₃ Induktion verfolgt (Abb.17).

Die Akkumulation von Eriodictyol 7-Glucosid und Luteoliflavan in mit Prohexadion-Ca behandelten Stadien kann direkt auf die Hemmung der FHT als 2-oxoglutaratabhängigem Enzym durch Prohexadion-Ca zurückgeführt werden (Abb.15, 18, 23). Das konstitutiv vorhandene Aglycon Eriodictyol kann nicht weiter zu Dihydroquercetin metabolisiert werden. So wird es durch FNR-Aktivität, möglicherweise besitzt die DFR genau diese, wie **FISCHER et al. (2003)** für Apfel und Birne nachwiesen, in Luteoforol, und später durch LAR-Aktivität (**DEIML 2007**) in Luteoliflavan (3-Deoxycatechin) umgewandelt.

Die parallele Bildung von Eriodictyol und Luteoliflavan folgte der Catechin-Akkumulation nach der Prohexadion-Ca-Behandlung während der Erdbeerentwicklung (Abb 15, 23). Eine Ausnahme wurde bei ‚*Mara des Bois*‘ festgestellt (Abb.18). Hier wurde in den

Stadien BBCH 71 und BBCH 73 eine negative Korrelation zwischen Catechin-Akkumulation und Entstehung von Luteoliflavan und Eriodictyol 7-Glucosid festgestellt. Auch dominierte die Bildung von Eriodictyol 7-Glucosid zuerst nicht über die Luteoliflavan-Bildung (Abb.18). Das weist darauf hin, dass die Eriodictyol-Bildung und damit die FHT-Aktivität durch die Catechin-Biosynthese bestimmt wurde. Eine Reduzierung der LAR-Aktivität ging einher mit der Verminderung anderer Enzymaktivitäten, die am Biosyntheseweg zum Catechin beteiligt sind, und damit also auch der FHT-Aktivität. Im gesamten Versuch lag der Luteoliflavangehalt nur geringfügig über dem Gehalt an Eriodictyol 7-Glucosid (Abb.15, 18, 23). Die Abwesenheit von Luteoliflavan-Glucosid in allen Proben ist kritisch zu sehen, weil die Glycolisierung von Luteoliflavan in anderen Arten (**RÖMMELT et al. 2003b**, **PETEREK 2004**) beschrieben wurde. Nach enzymatischer Hydrolyse mit Tannase nahm die Konzentration des Aglykons Luteoliflavan deutlich zu. Daher und wegen des Problems bei der Flavonolglykosid-Identifizierung und Quantifizierung wurde angedacht, die Bestimmung und die Auswertungen von Flavonoiden erst nach Hydrolyse durchzuführen, um einen besseren Überblick über die Veränderungen im Phenolstoffwechsel durch Prohexadion-Ca-Behandlung zu bekommen. Folglich wurden Aussagen über Glycosylierungen ausgeschlossen.

Über Afzelechin- und Gallocatechinwerte in Erdbeeren wurde keine aktuelle Literaturstelle gefunden. Auch die Tatsache, dass die Aglycone Naringenin und Pentahydroxyflavanon in den behandelten Erdbeeren nicht nachgewiesen wurden, deutet noch einmal darauf hin, dass die Biosynthese in Früchten hauptsächlich in Richtung Catechin fließt. Daher war auch die Abwesenheit von 3-Deoxygallocatechin und 3-Deoxyafzelechin nach Hemmung der FHT nicht zu erwarten.

Milsana unterstützte den Prohexadion-Ca-Effekt in einer verstärkten Catechin-Induktion (Abb. 22), Eriodictyol 7-Glucosid- und Luteoliflavan-Akkumulation (Abb.23). Demzufolge kam es zu einer Erhöhung der Summe aller phenolischer Stoffe (Abb.25). Somit kann spekuliert werden, dass Milsana in der Lage ist, die PAL-Aktivität zu erhöhen und damit den ganzen Stoffwechsel zu verstärken. Durch die verstärkte PAL-Aktivität wurden andere Enzyme induziert und damit die Prohexadion-Ca-Wirkung innerhalb der Flavonoidbiosynthese erhöht. Allerdings demonstrierten **DAAYF et al. (1995)**, **FOFANA et al. (2002)** und **MICHALEK et al. (2005)** einen induzierenden Effekt von Milsana auf den Flavonoidstoffwechsel. Auch **DEIML (2007)** beobachtete eine verstärkte Induktion der *ANR* bei der Kombinationsbehandlung mit Prohexadion-Ca.

Prohexadion-Ca allein bewirkte in Untersuchungen von **PETEREK (2004)** in Birne keine Veränderungen in der PAL-Aktivität. Dies erklärt, dass bei der Prohexadion-Ca-Behandlung die Menge der neu synthetisierten Verbindungen die Veränderungen in den konstitutiv vorhandenen phenolischen Substanzen kompensierte und sich so in der

Summe in der Regel keine große Änderung ergab (Abb 15, 20, 25). Die Ausnahme bildet Stadium BBCH 73 (Abb.20) bei ‚Mara des Bois‘, in dem eine Reduzierung in der Summe der phenolischen Stoffe auftrat, die durch die Reduzierung von Catechin und verminderte Eriodictyol 7-Glucosid Akkumulation verursacht wurde.

Ellagitannin wurde nicht durch Prohexadion-Ca und Milsana-Behandlung beeinflusst (Abb.15, 19, 24). Dies impliziert, dass die Biosynthese von Ellagitannin außerhalb des Flavonoidstoffwechsels stattfindet. Auch wurde keine deutliche Reduzierung der Anthocyane nach der Prohexadion-Ca-Behandlung festgestellt, obwohl die ANS als 2-oxoglutaratabhängige Dioxygenase ein Wirkort für Prohexadion-Ca sein kann (Abb.16, 21, 26). Vor dem Farbumschlag stiegen die Expressionen (**MOYANO et al. 1998, ALMEIDA et al. 2007**) und Aktivitäten (**HALBWIRTH et al. 2006**) der meisten Flavonoidgene bzw. Enzyme an (Abb 31.).

Auch die PAL-Aktivität (**CHENG et al. 1991, HALBWIRTH et al. 2006**) und PAL-Expression (**ALMEIDA et al. 2007**) zeigte einen direkten Zusammenhang mit der Anthocyansynthese. Obwohl der Phenylpropanoidstoffwechsel vor der Anthocyansynthese wieder in Gang kommt, konnte die Wirkung von Prohexadion-Ca auf reife Früchte nicht gezeigt werden. So konnte eine geringfügige Catechinakkumulation und eine sehr schwache Biosynthese von Luteoliflavan und Eriodictyol 7-Glucosid gezeigt werden. Der Grund für die lediglich geringen Unterschiede liegt wohl darin, dass die letzten Pro-Ca-Applikation, die Enzyme zur Zeit des Farbumschlags der Erdbeeren, die neu exprimiert wurden, nicht getroffen hat. Der eventuelle richtige Zeitpunkt und Konzentration der Applikation von Prohexadion-Ca vor der Reife, sollte weiter untersucht werden. Es kann sein dass die zweite Flavonoid-Phase sehr schnell passiert und damit ist die Anwendung von Prohexadion-Ca vor der Reife beschränkt, weil von außen nicht möglich ist festzustellen, wann die Genexpression *in planta* stattfindet. Das kann der Grund sein, wieso Prohexadion-Ca allein die *Botrytis*-Resistenz bei der anfälligen Sorte nicht induzieren kann (Abb. 28) und gleichzeitig der Nachteil von Prohexadion-Ca als Werkzeug für *Botrytis*-Resistenzforschung während der Erdbeerreife.

Die Ergebnisse der *Botrytis*-Bonitur zeigten, dass nur in der Reife Symptome von Grauschimmel auftraten (Abb 28).

Obwohl an vertrockneten Blüten nach der Inkubation Grauschimmel vorhanden war, könnte es sein, dass dieser erst sekundär nach dem Absterben als Saprophyt auftrat (Abb.27). Ein Grund für das Vertrocknen könnte auch die Prohexadion-Ca-Behandlung sein.

Grüne Früchte zeigten keine *Botrytis*-Symptome und damit Resistenz, die **SCHERER et al. (1982)** als Stadienresistenz bezeichneten. Ein resistenzinduzierter Effekt wurde nur bei der Kombinationsbehandlung festgestellt, während Prohexadion-Ca den *Botrytis*-Befall

unterstützte (Abb.28). Damit erfüllt Milsana das Pflanzenstärkungsmittel–Kriterium, die Widerstandsfähigkeit von Pflanzen gegen Schadorganismen zu erhöhen. Ein Wirkungsprinzip von Pflanzenstärkungsmitteln ist die Induktion von Stoffwechselwegen. Die erhaltenen Ergebnisse zeigen eine Induktion der Catechinbiosynthese durch Kombinationsbehandlung mit Prohexadion-Ca in den reifen Früchten (Abb. 22.) Diese Induktion war am stärksten ausgeprägt in grünen Früchten, die allerdings ohnehin eine *Botrytis*-Resistenz zeigten (Abb.28). Damit wurde die Beurteilung von Catechin als Ursache für induzierte Resistenz bei der Kombinationsbehandlung erschwert. Auch das in reifen Früchten durch Kombinationsbehandlung induzierte Catechin erreichte nicht die Werte von resistenten grünen Früchten. Deshalb ist die Verwendung von Prohexadion-Ca in Kombination mit Milsana (mit Erstmalbehandlung während der Blüte!) als transiente Methode in der *Botrytis*-Resistenzforschung bedenklich. Eine Prohexadion-Ca-Behandlung vor der Blüte bewirkte eine Reduzierung von Catechin in grünen Früchten bei der Sorte ‚Mara des Bois‘ (Abb.17). Obwohl die Konzentrationen im Bereich der reifenden Erdbeeren lagen, zeigten die grüne Früchte keine *Botrytis*-Symptome. Deswegen lassen die gemessenen Catechin-Konzentrationen keinen direkten Zusammenhang mit dem *Botrytis*-Befall erkennen. Hier hätte Prohexadion-Ca als transiente Werkzeug für *Botrytis*-Resistenzforschung eine mögliche Anwendung.

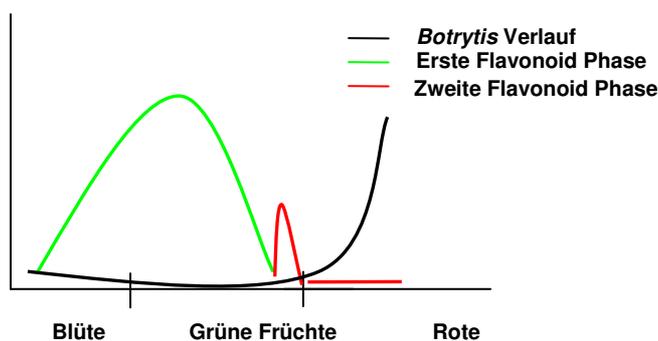


Abb. 30: *Botrytis* und Flavonoidstoffwechsel Verlauf während Erdbeerentwicklung

Wie auch in anderen Früchten ist der Reifeprozess der Erdbeerfrucht charakterisiert durch vielfältige Parameter (Verminderungen des pH-wertes, Zucker-Akkumulation, Anstieg der löslichen Verbindungen in der Frucht, Veränderungen in Fruchtform und Textur) und deswegen ist die Beurteilung von Resistenzfaktoren nur auf Ebene des Flavonoidstoffwechsels schwierig. Die Strategie, die Resistenz der Erdbeere gegen *Botrytis cinerea* durch die Erhöhung der Catechin-Konzentrationen in reifen Früchten zu erreichen, erscheint also wenig erfolgsversprechend. Es konnte festgestellt werden, dass manche Blüten bei der Sorte ‚Elsanta‘ (Abb. 22) keine Flavonoide und damit auch keine Prohexadion-Ca Wirkung aufweisen. Deshalb war davon auszugehen, dass die Flavonoidbiosynthese bzw. Catechinsynthese während der Blüte einsetzt. Die Inhaltsstoffana-

lyse der Sorte ‚*Mara des Bois*‘ zeigte, dass die frühzeitige Prohexadion-Ca-Behandlung die Catechinproduktion in den Blüten reduzieren kann (Abb. 17). Gleichzeitig wurde eine verstärkte Vertrocknung der Blüte durch Prohexadion-Ca Behandlung bei ‚*Mara des Bois*‘ beobachtet (Abb. 27). Würde man annehmen, dass die Vertrocknung der Blüte durch die primäre Infektion von *Botrytis cinerea* verursacht wurde, könnte die Catechin Akkumulation eine entscheidende Rolle bei der Infektion der Blüte spielen. Bis zu dem Zeitpunkt, in dem sich die Catechin Biosynthese nicht etabliert, erfolgte wohl die *Botrytis*-Infektion der Blüte. Möglicherweise sind deshalb die Blüten die bevorzugten Organe für die *Botrytis*-Infektion. Ob sich *Botrytis* weiterentwickelt, hängt vermutlich von der Catechindynamik in der Blüte an. Bevor Catechin ein bestimmtes Niveau in der Blüte erreicht, ist offenbar die Weiterentwicklung von *Botrytis* möglich. Diese Weiterentwicklung wurde durch die Vertrocknung der Blüte manifestiert. Daher verursachte möglicherweise die Reduzierung des Catechingehalts bei ‚*Mara des Bois*‘ eine Zunahme der Vertrocknung der Blüte nach der Prohexadion-Ca Behandlung. Aus den oben dargestellten Gründen wäre eine induzierte Flavonoid bzw Catechin Biosynthese vor der Blüte eine neue Strategie (durch die Vermeidung der Infektion), um die Resistenz der Erdbeere gegen *Botrytis cinerea* zu erreichen.

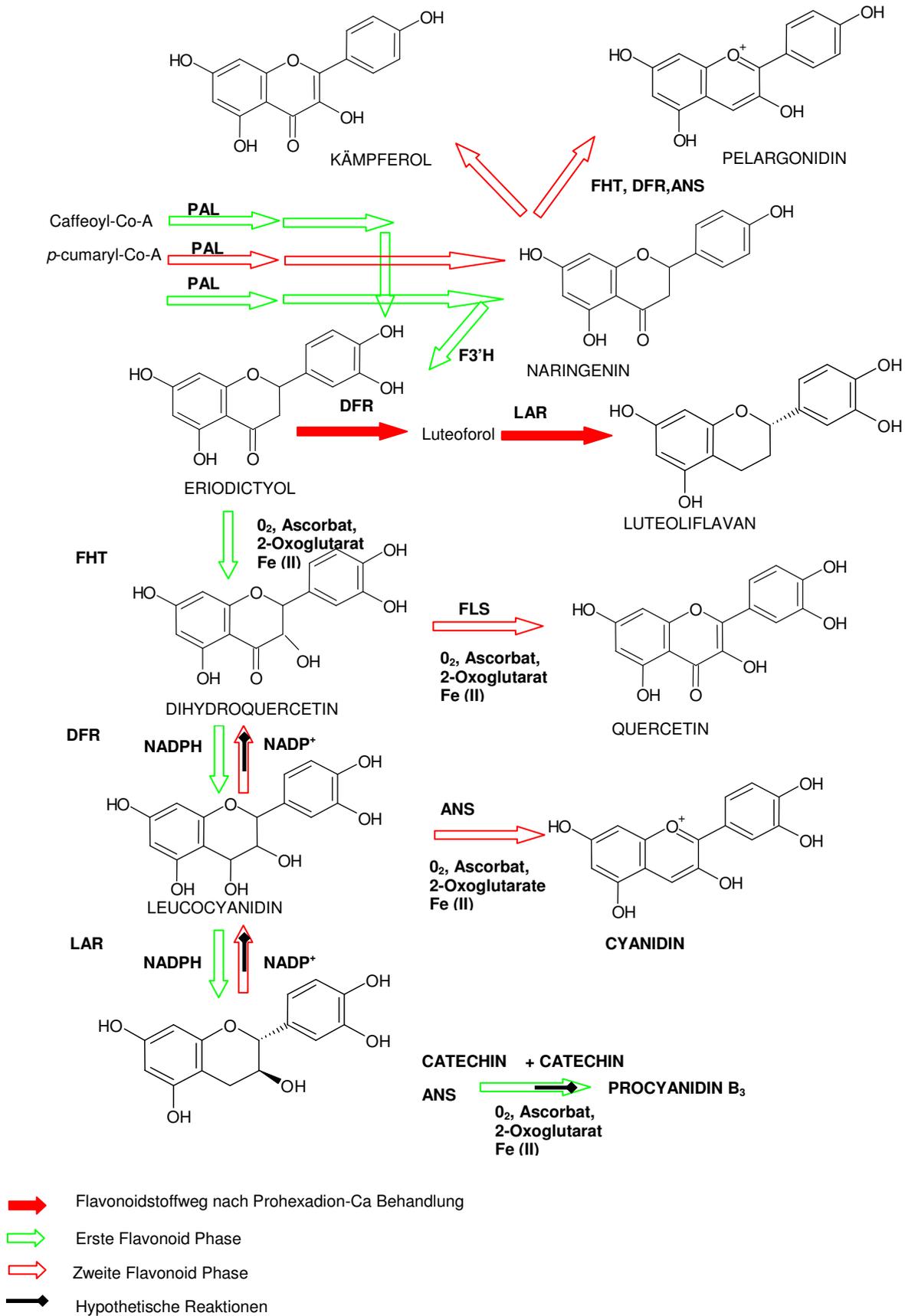


Abb. 31: Hypothetische Darstellung des Flavonoidstoffwechsels während der Erdbeerfruchtentwicklung

5. Ergebnisse Wein

5.1 Modifikationen des Phenylpropanoidstoffwechsel der Weinrebe (*Vitis vinifera* L.) durch Prohexadion-Ca

Im Weinbau ist das Auftreten von *Botrytis cinerea* neben dem Echten und dem Falschen Mehltau eine der verheerendsten Krankheiten. Aus der Literatur geht davor, dass junge Blüten und reifende Beeren traditioneller *Vitis vinifera*-Sorten anfällig gegenüber *Botrytis cinerea* sind, während dazwischen eine Phase der Resistenz liegt (HILL et al. 1981, BAVARESCO et al. 1997, DI VENERE et al. 1988, PEZET et al. 2003a, GABLER et al. 2004). Dieses Stadium der Latenz von *Botrytis cinerea* bzw. die Phase der Resistenz der grünen Trauben wird analog zu JERSCH et al. (1989), die einen ähnlichen Sachverhalt bei der Erdbeere beschrieben, als Quieszenz bezeichnet. Als Ursachen dieser temporären Resistenz werden oft phenolische Inhaltsstoffe angesehen (GOETZ et al. 2003, PEZET et al. 2003a), vor allem Stilbene (STEIN UND BLEICH 1985, BAVARESCO et al. 1997, JEANDET et al. 2002).

Wie bei den Erdbeeren, wurde versucht, durch Prohexadion-Ca den Flavonoidstoffwechsel zu modifizieren. Dabei diene Prohexadion-Ca als abiotischer Modifikator der Flavonoidbiosynthese und als Werkzeug zur Aufklärung von Stoffwechselwegen. Es sollte auch untersucht werden, ob durch die Beeinflussung der Biosynthese die Resistenz gegen *Botrytis cinerea* induziert werden kann, abhängig vom Gewebetyp und von temporären Veränderungen des Flavonoidmetabolismus während der Traubenentwicklung.

Durch Kombinationsbehandlungen mit Milsana und Myco-Sin bei den Weinblättern wurde getestet, ob die Pflanzenstärkungsmittel in der Lage sind, die Prohexadion-Ca Wirkung zu verbessern.

Weil keine Sortenunterschiede festgestellt wurden, wurden die Sorten als Wiederholungen ausgewertet.

5.1.1 Der Einfluss von Prohexadion-Ca auf den Flavonoidstoffwechsel von Blüten, Blättern und Trauben der Weinrebe (*Vitis vinifera* L.)

Eine ausführliche Beschreibung des Versuchs wurde bereits veröffentlicht (**PUHL et al. 2008**).

Alterations of flavonoid biosynthesis in young grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaves, flowers and berries induced by the dioxygenase inhibitor prohexadione-Ca

IVA PUHL, FLORIAN STADLER, DIETER TREUTTER

Center of Life and Food Sciences Weihenstephan, Technische Universität München
Fachgebiet für Obstbau, Alte Akademie 16, D-85350 Freising, Germany

*To whom correspondence should be addressed, Tel: +49-8161713753.

Fax: +49-8161715385. E-Mail: dieter.treutter@wzw.tum.de

***J. Agric. Food Chem.*, 56 (7), 2498–2504**

Abstract

Prohexadione-Ca is a structural mimic of 2-oxoglutarate and according to this property, it is able to inhibit dioxygenase enzymes, which require 2-oxoglutarate as a co-substrate. Such enzymes are involved in flavonoid biosynthesis and, therefore, prohexadione-Ca treatment leads to alterations in the flavonoid metabolism in grapevine tissues. Due to the fact that phenolic compounds often are responsible for enhanced plant resistance, modification of the phenylpropanoid metabolism using elicitation can be considered as a new potential strategy in plant protection.

The phenolic compounds were analyzed by HPLC combined with chemical reaction detection. Tissue treatment induced the accumulation of unusual flavonoids, which were identified as derivatives of pentahydroxyflavanone, eriodictyol, and luteoliflavan. Concentrations of constitutive flavonoids were also affected by the bioregulator treatment. The alterations of the flavonoid profiles are discussed with respect to substrate preferences of relevant enzymes.

Keywords

Dioxygenase, pentahydroxyflavanone, eriodictyol, flavanone, flavonol, luteoliflavan

INTRODUCTION

The bioregulator Regalis® (BASF Ludwigsburg, Germany) reduces fruit set and berry weight of grapevine (1) by inhibition of the biosynthesis of hormonally active gibberellin (2). Its active ingredient prohexadione-Ca is a structural mimic of 2-oxoglutarate and according to this property it is able to inhibit dioxygenase enzymes which require 2-oxoglutarate as cosubstrate (2). Such enzymes are not only involved in gibberellin but also in flavonoid biosynthesis (3) and, hence, prohexadione-Ca is able to alter flavonoid metabolism. Thereby, novel flavonoids are formed which were previously identified as 3-deoxycatechins in young leaves of apple (4, 5), pear (6), and in grapevine

leaves (7). The alteration of flavonoid composition is proposed to be related to enhanced resistance of several crop plants (5, 6, 7, 8, and 9). Prohexadione-Ca itself does not possess any antimicrobial activity but its application leads to a reduction of infection caused by the bacterium *Erwinia amylovora* in apples (4, 10) and pears (11). Many studies suggest that phenolic compounds can be involved in plant resistance as antimicrobial compounds (12, 13, 14, and 15) or as mechanical barriers (16, 17, 18, and 19).

All these observations may animate to use prohexadione-Ca as an inducer of resistance-related compounds in any plant. Due to the fact that several enzymes of the flavonoid pathway may be inhibited by the bioregulator and considering that enzymes may possess different substrate affinities (20), detailed knowledge on the qualitative and quantitative changes in the composition of phenolic compounds in individual plants is a prerequisite for the assessment of the bioregulator with respect to resistance induction. In this paper we describe the alteration of flavonoid biosynthesis in grapevine leaves, flowers and berries induced by the bioregulator prohexadione-Ca.

MATERIAL AND METHODS

Plant material

Young shoots from 6-year-old potted plants of cultivars 'Müller Thurgau', 'Regent' and 'Pinot Gris' showing about 10 unfolded leaves were sprayed with 500 ppm prohexadione-Ca in water until dripping wet.

From each plant, 9 young leaves from three different shoots were harvested at day 1, day 3, and day 6 after treatment. Three leaves were combined and analyzed as one mixed sample (n=9 per harvest date).

In a further experiment, 3-year-old potted plants of the same cultivars were cultivated in a greenhouse without controlled temperature and without supplementary light. The

inflorescences were sprayed twice with 500 ppm prohexadione-Ca, before bloom and at the end of flowering. At each sampling date, inflorescences or bunches (6 replicates), respectively, per treatment were harvested according to growth stages from bloom to 80 days after flowering. From already developed berries, the skins were separated from the pulp using tweezers. For both experiments, an equal set of plants was sprayed with water.

All samples to be tested were frozen in liquid nitrogen directly after sampling, stored at -20°C and, finally, were lyophilized.

Extraction of phenolic compounds for analytical HPLC

For the extraction of phenolic compounds, lyophilized leaves, inflorescences, from which the stems were removed, and berries were ground in a ball mill. Young flowers and berries were used as a whole (0, 5, 22 and 48 days after flowering) and from 48, 50 and 80 days after flowering, the skins were analyzed. The fine powder (100 mg) was extracted with 500 µl methanol (100 %) containing 6-methoxyflavone as an internal standard for 30 min in a cooled ultrasonic water bath. This sample was then centrifuged for 10 min x 10000 g at 4°C and the supernatant was directly used for analytical HPLC. The recovery of the internal standard was 90 % +/- 12.

Analytical HPLC

Phenolic compounds were separated on a column (150 x 4 mm) prepacked with Hyperclone ODS, 3 µm particle size, following a stepwise gradient, using mixtures of solvent A (formic acid, 5 % in water) and solvent B (methanol) from 95:5 (A/B) to 10:90 (A/B) with a flow rate of 0.5 ml/min using the following gradient: 0-5 min, isocratic, 5% B; 5-15 min, 5-10% B; 15-30 min, isocratic, 10% B; 30-50 min, 10-15% B; 50-70 min, isocratic, 15% ; 70-85 min, 15-20% B; 85-95 min, isocratic, 20% B; 95-110 min, 20-25% ; 110-140 min, 25-30% B; 140-160 min, 30-40% B; 160-175 min, 40-50% B; 175-190 min, 50-90% B. Hydroxycinnamic acids and flavonols (glycosides of quercetin) were detected at 280 nm, whereas the flavanols (catechin and luteoliflavan)

and proanthocyanidins were estimated at 640 nm after post-column derivatisation with DMACA (4-dimethylaminocinnamic aldehyde) (21). Peak identification was conducted by their UV absorbance spectra and by comparison with authentic standards: flavonols isoquercitrin, rutin, quercitrin (Roth), flavanones eriodictyol, eriodictyol 7-glucoside (Extrasynthèse), procyanidins B₂, B₃, B₄ (previously isolated, 22), hydroxycinnamic acids caftaric and coutaric acid, flavanols catechin, luteoliflavan and luteoliflavan 5-glucoside (formerly isolated, 5). Pentahydroxyflavanone was kindly provided by G. Forkmann.

Quantification was performed using response factors of standards. Catechin, luteoliflavan and luteoliflavan 5-glucoside were calculated as catechin, proanthocyanidins as procyanidin B₂, pentahydroxyflavanone as eriodictyol, and pentahydroxyflavanone derivatives as eriodictyol 7-glucoside. Caftaric acid and coutaric acid were quantified using the response factors of their corresponding hydroxycinnamic acids caffeic acid and p-coumaric acid, respectively.

Preparative scale extraction

53 g of lyophilized and pulverised grapevine leaves treated with prohexadione-Ca were extracted 3-times with 300 ml 80% MeOH. The combined extracts were evaporated in vacuo to 300 ml and further extracted 6-times each with 300 ml petrol. The volume of the MeOH phase (1200 ml) was reduced, diluted with water and 6-times extracted each with 200 ml EtOAc. EtOAc extracts were evaporated to dryness, resuspended in water, and lyophilized yielding a residue of 2.9 g.

Gel-chromatography on a column of Sephadex LH-20

The dry residue was dissolved in 15 ml EtOAc and further purified by gel-chromatography on a column of Sephadex LH-20 using ethanol as solvent. 120 fractions were collected in portions of 10 ml and combined according to their photometric extinction and properties on TLC. Fractions 13 to 17 were combined to fraction no. 4 and used for the identification of compounds 2, 3 and 4. Fractions 18 to 23 were com-

bined to fraction no. 5 and used for the identification of flavanone 1. Combined fractions were evaporated to dryness, resuspended in water and lyophilized. Fractions no. 4 (31 mg) and no. 5 (93 mg) were redissolved in MeOH and further purified with analytical HPLC. During five HPLC runs from each fraction, postcolumn eluates were collected within two minutes intervals. According to their retention times, HPLC fractions were combined, concentrated to dryness and used for further identification using TLC and hydrolysis.

Enzymatic hydrolysis

For enzymatic hydrolysis, the purified compounds were evaporated and redissolved in NaOAc-buffer (pH 4.6, 0.1 M). The enzymes β -glucosidase (Sigma), driselase (Sigma) or tannase (Sigma) were added, respectively, and the reaction mixtures were kept at 37 °C for 17 h. The reaction was stopped with MeOH and extracted three times with EtOAc. The combined EtOAc extracts were evaporated to dryness and redissolved in MeOH for TLC and HPLC-analysis. The aqueous phases were used for the analysis of the sugar moieties.

TLC

Flavanones were separated on cellulose plates developed with n-BuOH: HOAc: H₂O (4:1:2.2 v/v/v). The compounds were visualized under UV-light after spraying with a methanolic solution (1 %) of Naturstoffreagenz A (Roth, Karlsruhe, Germany). Catechins were separated on silica gel plates developed with toluene: Me₂CO: HCO₂H; 3:6:1 (v/v/v) and were visualized by spraying with a solution of DMACA (1% in 6M HCl: EtOH; 1:1 v/v)

Analysis of sugar moieties

HPLC-sugar analysis was performed on a DIONEX BioLC-System equipped with a GP 40 gradient pump, an analytical column type Carbo Pac-100 (250 mm x 4 mm) and with an electrochemical detector ED40 (pulsed amperometric). Sugars were eluted with 10 mM NaOH (1 ml/min) within 20 Min.

Statistical analysis

For statistical analysis, a pairwise comparison was performed by the non-parametrical Mann-Whitney-test using “Minitab 14 – statistical software”. The P-values are listed in tables 1 to 5.

RESULTS

Profiles of constitutive phenolic compounds in leaves and berries

Hydroxycinnamic acids (Figs. 1 and 2) are mainly represented by trans-caffeoyltartaric and trans-p-coumaroyltartaric acid. Flavonols from the leaves were identified as the quercetin derivatives isoquercitrin, rutin, and quercitrin (Fig. 1). Total amounts of flavonols are much lower in flowers and berries (Fig. 2) than in leaves (Fig. 1) where they represent the principal class of flavonoids. In flowers and berries, isoquercitrin was the only constitutive flavonol found. In flowers and green berries, proanthocyanidins are present at higher concentrations (Fig. 2) than in leaves (Fig. 1). A decline in the quantity of proanthocyanidins was observed in the skins of ripening berries (Fig. 2).

Effect of Prohexadione-Ca treatment on constitutive phenylpropanoid composition of grapevine leaves and berries

As shown in Figs. 1 and 2, the changes in hydroxycinnamic acids and flavonols after prohexadione-Ca treatment show a similar behaviour, namely a reduction after three days following application onto leaves and with beginning of berry development (22 days after flowering), respectively (Fig. 2). Herein, this effect lasted until the last stage sampled, i.e. about 11 weeks after the last treatment. Catechin contents in leaves were not affected by prohexadione-Ca (Fig. 1). During flower ageing and berry development, they were slightly reduced (Fig. 2). Values strongly declined in skins of ripening berries (Fig. 2). Proanthocyanidins tended to behave in a similar way as catechin (Figs. 1 and 2).

Identification of newly formed compounds

HPLC analyses of extracts from leaves, flowers and berries treated with prohexadione-Ca revealed six additional compounds in total. Compounds 1, 2, 3, and 4 were stepwise purified by using Sephadex LH-20. Compounds 2, 3, and 4 were eluted from Sephadex LH-20 in the fractions between 180 and 230 ml ethanol and compound 1 with further 50 ml. The UV spectra of these compounds indicated the presence of flavanones. After enzymatic hydrolysis with tannase, driselase and β -glucosidase, the aglycones from flavanone 1 and flavanone 2 were identified as pentahydroxyflavanone, whereas the aglycones from flavanones 3 and 4 were identified as eriodictyol in comparison with authentic standards by UV absorbance, TLC and HPLC. Analyses of the sugar moieties from flavanone 1 and 3 revealed glucose whereas analysis of the aqueous phase from flavanones 2 and 4 failed. Therefore, flavanone 1 was identified as pentahydroxyflavanone glucoside. The position of the sugar remains unclear. UV, HPLC, and TLC properties of flavanone 3 were related to authentic standard eriodictyol 7-glucoside. Using analytical HPLC, flavanone 4 (eriodictyol derivate) was not detected in leaves and, therefore, it was quantified only in flowers and berries. Compounds 5 and 6 were detected at 640 nm after post-column chemical reaction with DMACA which classifies them as flavanols (21). Using TLC and HPLC, these compounds were identified as the 3-deoxycatechin luteoliflavan and luteoliflavan 5-glucoside (only in treated flowers and berries), respectively, in accordance with authentic samples previously isolated from apple leaves and identified using NMR-spectroscopy (5).

Induction of newly formed flavonoids after prohexadione-Ca treatment

In the prohexadione-Ca treated tissues, an accumulation of flavanones and 3-deoxyflavanoids was obtained (Figs. 3 and 4). In the leaves, the time course showed a progressive accumulation of flavanones and luteoliflavan until day 6 after treatment (Fig. 3). The longer lasting study of the berries exhibited an increase of both flavanones and 3-deoxyflavans (luteoliflavan and luteoliflavan 5-glucoside) until day 22 after treatment which declined afterwards (Fig. 4).

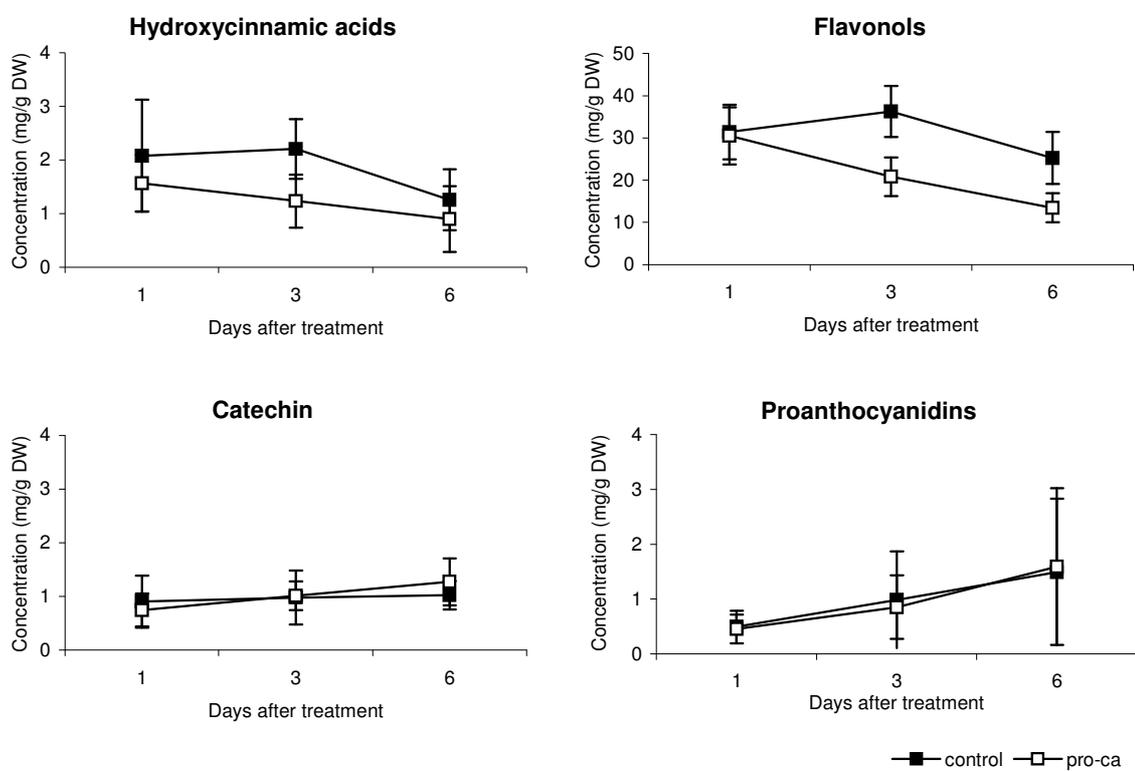


Figure 1: Changes in constitutive phenolic profiles (mg/g dry weight) in grapevine leaves after prohexadione-Ca treatment (pro-ca, 500 ppm) at day 1, 3, and 6 after treatment: hydroxycinnamic (sum of caftaric and coutaric acid), flavonols (sum of rutin, quercitrin, isoquercitrin), catechin and proanthocyanidins (sum of B₂, B₃, B₄)
The vertical lines represent the standard deviation from the mean of 9 replicates. Significant differences and P-values are indicated in Tables 1 and 2.

	Days after treatment		
	1	3	6
Hydroxycinnamic acids	14.4	0.10*	5.57
Flavonols	42.99	0.04*	0.07*
Catechin	53.65	37.57	14.47
Proanthocyanidins	82.47	53.63	92.96

*significant at 95 % level

Table 1: P-values of non-parametric Mann-Whitney test for comparison of leaf control against leaf prohexadione-Ca treatment

Hydroxycinnamic acids (controls)				Flavonols (controls)		
Days after treatment				Days after treatment		
	1	3			1	3
3	89.46			3	9.32	
6	12.21	0.62*		6	11.20	0.62*
Catechin (controls)				Proanthocyanidins (controls)		
Days after treatment				Days after treatment		
	1	3			1	3
3	72.39			3	21.64	
6	33.11	35.26		6	1.92*	25.10

*significant at 95 % level

Table 2: P-values of non-parametric Mann-Whitney test for comparison of phenol concentrations of untreated leaves (controls) according to days after treatment

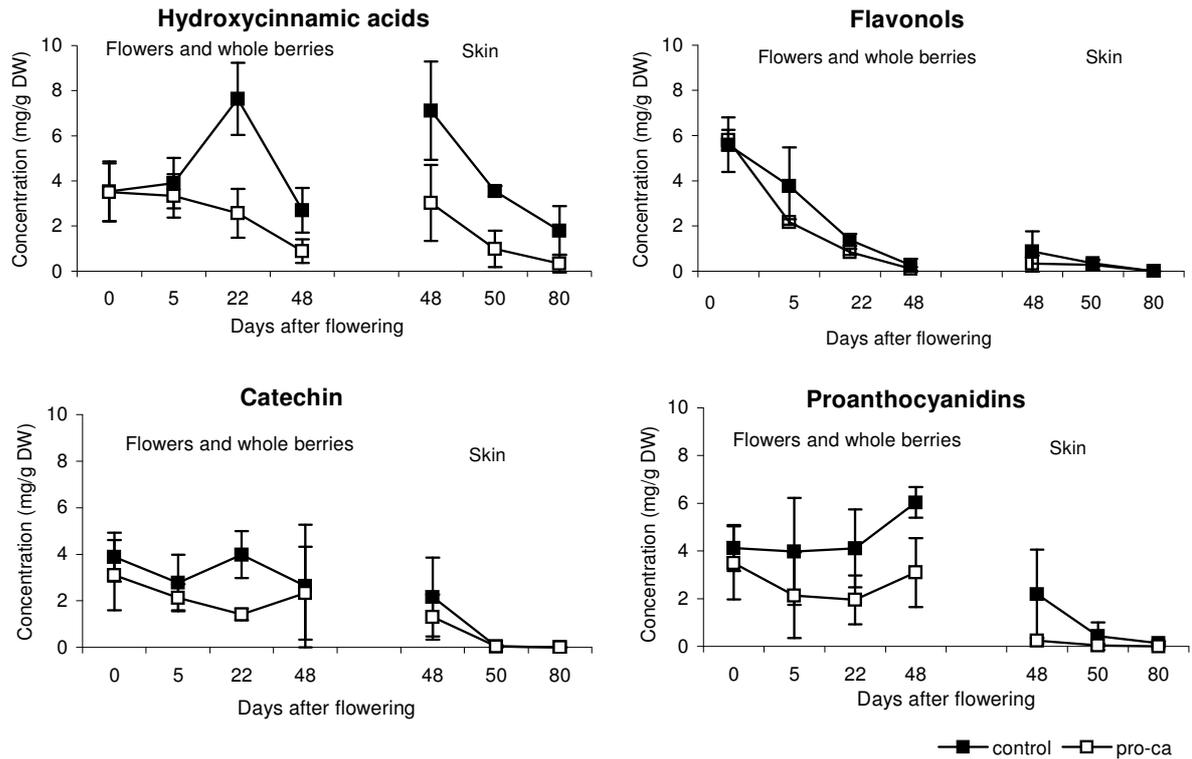


Figure 2: Changes in concentrations of constitutive phenolic compounds (mg/ g dry weight) during berry development from flowering to 80 days after flowering: hydroxycinnamic (sum of caffeic and coumaric acid), flavonols (isoquercitrin), catechin and proanthocyanidins (B₂, B₃, B₄) Tissues were treated with prohexadione-Ca (500 ppm) before bloom and at flowering. The vertical lines represent the standard deviation from the mean of 6 replicates. Significant differences and P-values are indicated in Table 4 and 5.

Eriodictyol 7-glucoside			Pentahydroxyflavanone glycosides			Luteoliflavan		
Days after treatment			Days after treatment			Days after treatment		
	1	3		1	3		1	3
3	0.15*		3	2.17*		3	85.92	
6	0.08*	6.37	6	0.08*	1.04*	6	3.32*	2.67*

*significant at 95 % level

Table 3: P-values of non-parametric Mann-Whitney test for comparison of phenol concentrations of pro-hexadione-Ca treated leaves according to days after treatment

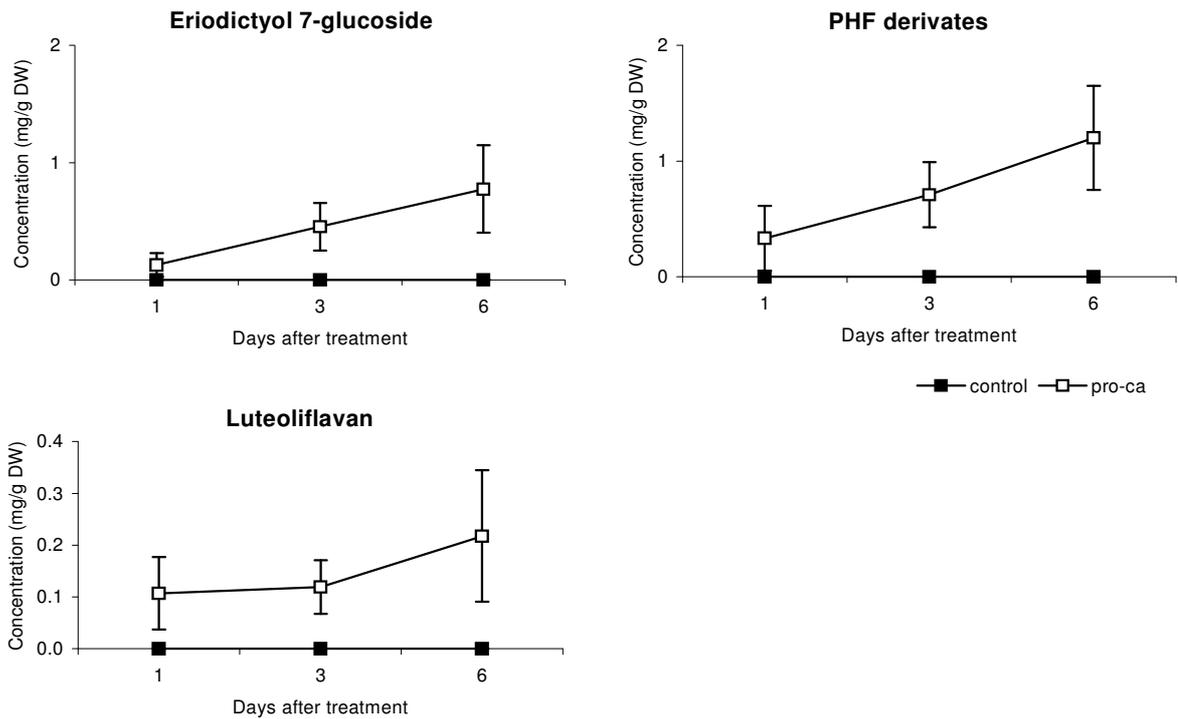


Figure 3: Changes in concentration (mg/g dry weight) in the grapevine leaves of the induced flavonoids eriodictyol 7-glucoside (flavanone 3) and pentahydroxyflavanones (PHF, sum of flavanones 1 and 2) and 3-deoxyflavonoid luteoliflavan after prohexadione-Ca treatment (pro-ca, 500 ppm) at day 1, 3, and 6 after treatment. The vertical lines represent the standard deviation from the mean of 9 replicates. Significant differences and P-values are indicated in Table 3.

	Flowers and berries					Skin		
	Days after treatment							
	0	5	22	48		48	50	80
Hydroxycinnamic acids	50.00	18.31	2.64*	1.41*		4.66*	2.64*	4.66*
Flavonols	14.98	18.31	1.41*	7.69		12.26	12.26	30.05
Catechin	25.93	12.26	2.64*	36.62		18.31	34.93	12.17
Proanthocyanidins	25.93	14.98	1.41*	25.93		2.64*	4.66*	1.41*

*significant at 95 % level

Table 4: P-values of non-parametric Mann-Whitney test for comparison of flowers/berries control against flowers/berries prohexadione-Ca treatment

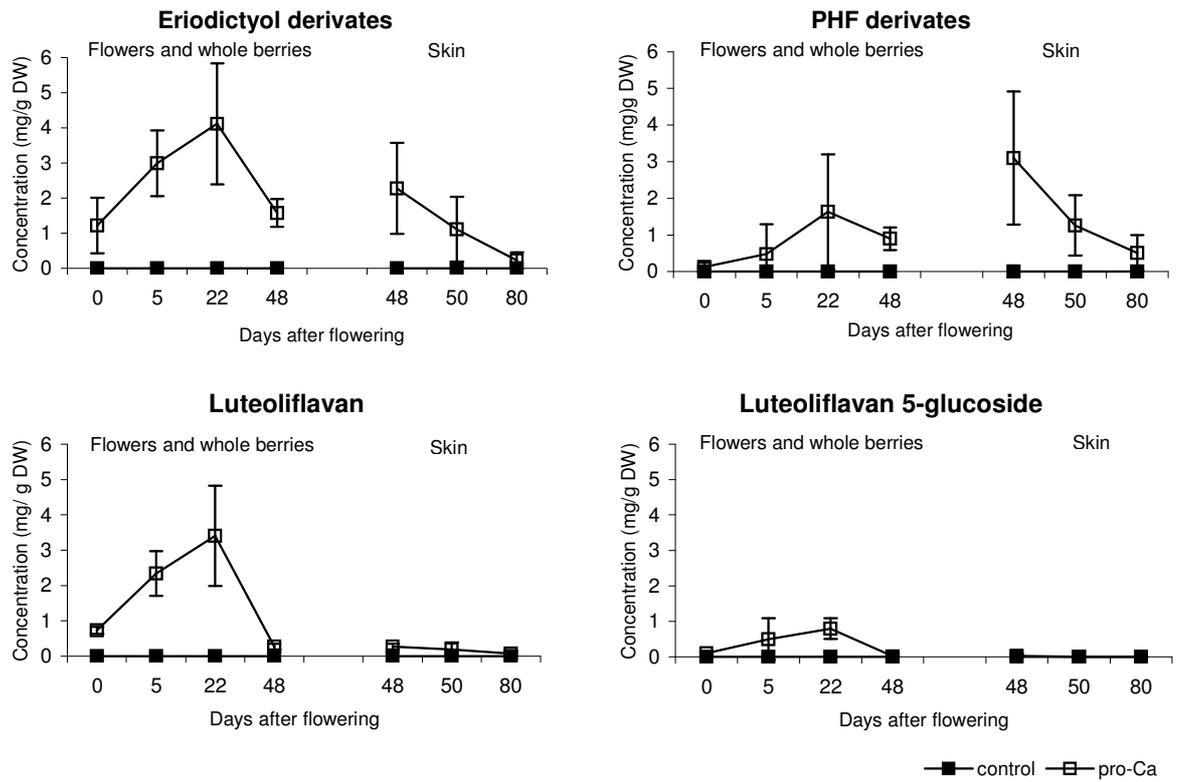


Figure 4: Changes in concentrations (mg/g dry weight) during berry development from flowering to 80 days after flowering of the induced flavonoids eriodictyol derivatives (sum of flavanones 3 and 4), pentahydroxyflavanone (PHF, sum of flavanones 1 and 2) and 3-deoxyflavonoids (sum of luteoliflavan and luteoliflavan 5-glucoside). Tissues were treated with prohexadione-Ca (500 ppm) before bloom and at flowering. The vertical lines represent the standard deviation of 6 replicates.

Flowers and berries					Skin		
Hydroxycinnamic acids (controls)							
Days after treatment					Days after treatment		
	0	5	22			48	50
5	57.52				50	2.02*	
22	3.06*	4.53*			80	0.51*	2.02*
48	9.27	3.06*	1.31*				
Flavonols (controls)							
Days after treatment					Days after treatment		
	0	5	22			48	50
5	0.82*				50	17.35	
22	0.51*	0.82*			80	0.51*	0.51*
48	0.51*	0.51*	0.51*				
Catechin (controls)							
Days after treatment					Days after treatment		
	0	5	22			48	50
5	37.85				5	0.82*	
22	81.02	9.27			22	0.51*	42.3
48	12.82	37.85	12.82				
Proanthocyanidins (controls)							
Days after treatment					Days after treatment		
	0	5	22			48	50
5	100.00				5	4.53*	
22	93.62	93.62			22	1.29*	100.00
48	6.56	12.82	12.82				

*significant at 95 % level

Table 5: P-values of non-parametric Mann-Whitney test for comparison of phenol concentrations of untreated flowers, berries and skin (controls) according to days after treatment

DISCUSSION

The accumulation of flavanones (Figs. 3 and 4) and the decrease of flavonols (Figs. 1 and 2) in treated leaves, flowers, and green berries indicated that the enzymes FHT and FLS, as 2-oxoglutarate dependent dioxygenases (3), are inhibited by prohexadione-Ca (Fig. 5) This was formerly described for apple (5, 6, and 9) and pear (23). Comparing the flavonoid profiles of tested tissues, differences in flavonol contents are most conspicuous. High concentrations of flavonols in leaves (Fig. 1) and their decrease in flowers after pollination (Fig. 2) are consistent with literature data concerning analysis of phenolics as well as gene expression of FLS (24, 25, and 26). The proposed inhibition of the FLS enzyme by prohexadione-Ca (Fig. 5) caused a marked decrease of flavonol concentrations (Fig. 1). As catechin is yet synthesized to a lesser extent in leaves (Fig. 1) than in flowers and berries (Fig. 2), we think that in the presence of a strongly active FLS, the conversion of dihydroflavonols to flavonols dominates over the DFR/LAR-route of the flavonoid pathway. This may also explain why catechin as well as proanthocyanidin concentrations in leaves (Fig. 1), unlike in berries (Fig. 2) are scarcely affected by the prohexadione-Ca treatment. Blocking FLS (Fig. 5) may have directed metabolites towards the synthesis of flavan 3-ols and thus may have compensated for the loss due to the partially inhibited FHT activity.

The formation of 3-deoxyflavonoids in treated grapevine tissues (Figs. 3 and 4) is achieved by a postulated FNR enzyme which catalyzes the reduction of the flavanone eriodictyol to the flavan-4-ol luteoforol, which is the unstable immediate precursor of luteoliflavan (27) (Fig. 5). Recent work (7, 20) showed that the enzyme DFR which normally catalyzes the reduction of dihydroflavonols to leucoanthocyanidins (28) (Fig. 5) of apple, pear, strawberry and grapevine possess FNR activity and, therefore, is able to perform the key reaction in the formation of 3-deoxyflavonoids. Furthermore, it is noteworthy that luteoliflavan was the only 3-deoxyflavanol aglycone found in prohexadione-Ca treated tissues. This observation points at the substrate affinity of the

FNR since the FHT inhibition also leads to the accumulation of pentahydroxyflavanone (Figs. 3 and 4), which, however, was not reduced to the corresponding 3-deoxyflavanol. Fischer *et al.* (20) demonstrated a substrate preference for the DFR/FNR of apple and pear. Thus, a high substrate specificity can also be assumed for the DFR/FNR of grapevine, reducing eriodictyol to 3-deoxyleucocyanidin (luteoforol) (Fig. 5) Further reduction to luteoliflavan is catalyzed by a proposed LAR. Pfeifer *et al.* (29) showed that grape and apple LARs are able to convert luteoforol to luteoliflavan. Under natural conditions, grapevine LAR catalyzes the conversion of leucocyanidin to catechin (30) (Fig.5).

The most recognizable accumulation of 3-deoxyflavonoids and flavanones (Fig. 4) and decrease of catechin during grape berry development (Fig. 2) after prohexadione-Ca treatment were observed at flowering and fruit set. Also, the expression of the genes encoding for LAR and DFR were both described to be highest in the same period by other authors (31, 32). Although the effect of prohexadione-Ca on flavanone accumulation was still noticeable in the skins of growing berries, the content of luteoliflavan decreased dramatically after the stage of bunch closure (Fig. 4).

The results obtained show that it is possible to induce an additional formation of specific phenylpropanoid compounds using the bioregulator prohexadione-Ca.

Even though for practical application in grape production the influence of prohexadione-Ca on the hormonal balance of the plant must be considered which may lead for instance to reduced berry size and cluster compactness, the bioregulator can be applied as a tool to change the flavonoid composition of grapevine tissues. Due to the fact that phenolic compounds often are responsible for enhanced plant resistance, modification of the phenylpropanoid metabolism using elicitation can be considered as a new potential strategy in plant protection. For the 3-deoxyleucocyanidin luteoforol, antimicrobial properties were shown against, amongst others, *Botrytis cinerea* (33) and thus, susceptibility might be reduced in grapevine by prohexadione-Ca treatment.

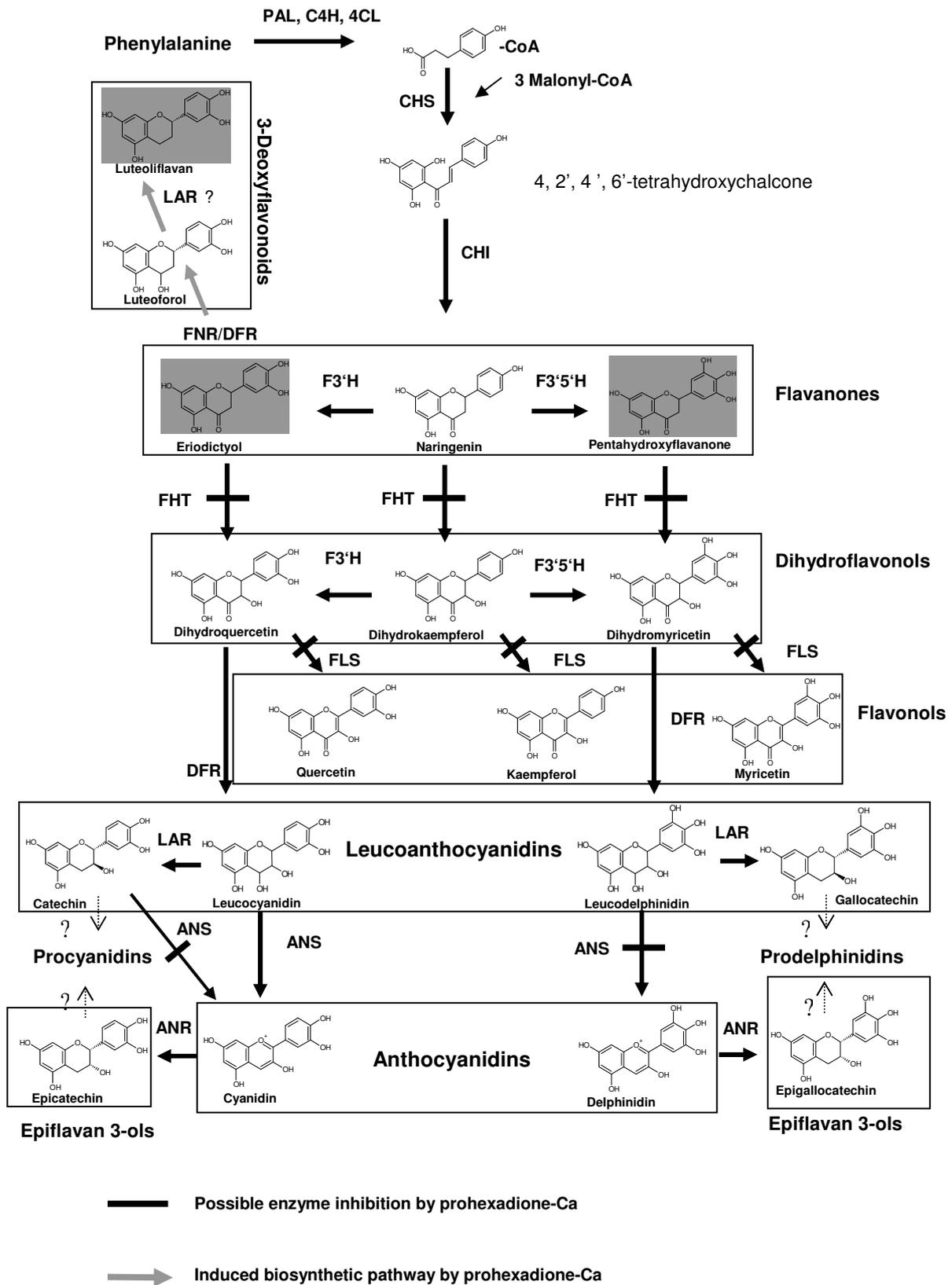


Figure 5: Simplified schematic overview of the major phenylpropanoid pathway in grapevine modified after 3 and 31. PAL Phenylalanine ammonia-lyase, C4H Cinnamate 4-hydroxylase, 4CL 4-Cumarate:CoA-Ligase, CHS Chalcone synthase, CHI Chalcone isomerase, FNR Flavanone 4-reductase, FHT Flavanone 3-hydroxylase, DFR Dihydroflavonols 4-reductase, LAR Leucoanthocyanidin 4-reductase, F3'H Flavonoid 3'-hydroxylase, F3'5'H Flavonoid 3'5'-hydroxylase, FLS Flavonol synthase, ANS Anthocyanidin synthase, ANR Anthocyanidin reductase

Abbreviations used:

FHT: Flavanone 3- hydroxylase, FLS: Flavonol synthase, DFR: Dihydroflavonol 4-reductase, LAR: Leucoanthocyanidin 4-reductase, ANR: Anthocyanidin reductase, PAL: Phenylalanine ammonia lyase.

Acknowledgement:

The authors gratefully acknowledge the Bayerisches Staatsministerium für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz for financial support of the study.

Literature cited

1. Lo Giudice, D.; Wolf, T. K.; Zoecklein, B. W. Effects of prohexadione-Calcium on grape yield components and fruit and wine composition. *Am. J. Enol. Vitic.* **2004**, *55*, 73-83.
2. Rademacher, W. Growth Retardants: Effects on Gibberellin Biosynthesis and other Metabolic Pathways. *Plant Mol. Biol.* **2000**, *51*, 501-31.
3. Forkmann, G.; Heller, W. Biosynthesis of flavonoids. In *Comprehensive natural products chemistry*; Barton, D. H. R., Nakanishi, K., Eds.; Elsevier: Amsterdam, 1999; Vol. 1, 714-748.
4. Römmelt, S.; Treutter, D.; Speakman, J. B.; Rademacher, W. Effects of prohexadione-Ca on the flavonoid metabolism of apple with respect to plant resistance against fire blight. *Acta Hort.* **1999**, *489*, 359-364.
5. Römmelt, S.; Zimmermann, N.; Rademacher, W.; Treutter, D. Formation of novel flavonoids in apple (*Malus x domestica*) treated with the 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase inhibitor prohexadione-Ca. *Phytochemistry* **2003**, *64*, 709-716.
6. Römmelt, S.; Fischer, T. C.; Halbwirth, H.; Peterrek, S.; Schlangen, K.; Speakman, J.-B.; Treutter, D.; Forkmann, G.; Stich, K. Effect of dioxygenase inhibitors on the re-

sistance-related flavonoid metabolism of apple and pears: chemical, biochemical and molecular biological aspects. *Eur. J. Hort. Sci.* **2003**, *68*, 129-136.

7. Gosch, C.; Puhl, I.; Halbwirth, H.; Schlangen, K.; Römmelt, S.; Andreotti, C.; Costa, G.; Fischer, T. C.; Treutter, D.; Stich, K.; Forkmann, G. Effect of prohexadione-Ca on various fruit crops: flavonoid composition and substrate specificity of their dihydroflavonol 4-reductases. *Eur. J. Hort. Sci.* **2003**, *68*, 144-151.

8. Rühmann, S.; Treutter, D. Effect of N-Nutrition in apple on the response of its secondary metabolism to prohexadione-Ca treatment. *Eur. J. Hort. Sci.* **2003**, *68*, 152-159.

9. Fischer, T. C.; Halbwirth, H.; Roemmelt, S.; Sabatini, E.; Schlangen, K.; Andreotti, C.; Spinelli, F.; Costa, G.; Forkmann, G.; Treutter, D.; Stich, K. Induction of polyphenol gene expression in apple (*Malus x domestica*) after the application of a dioxygenase inhibitor. *Physiol. Plant.* **2006**, *128*, 604–617.

10. Yoder, K. S.; Miller, S. S.; Byers, R. E. Suppression of fireblight in apple shoots by prohexadione-Calcium following experimental and natural inoculation. *Hort. Sci.* **1999**, *34*, 1202-1204.

11. Costa, G.; Andreotti, C.; Bucchi, F.; Sabatini, E.; Bazzi, C.; Malaguti, S.; Rademacher, W. Prohexadione-Ca (Apogee): Growth regulation and reduced fire blight incidence in pear. *Hort. Sci.* **2001**, *36*, 931-933.

12. Scalbert, A. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 3875-3883.

13. Yamamoto, M.; Nakatsuka, S.; Otani, H.; Kohmoto, K.; Nishimura, S. (+)-Catechin acts as an infection-inhibiting factor in strawberry leaf. *Phytopathology* **2000**, *90*, 595-599.

14. Del Rio, J. A.; Baidez, A. G.; Botia, J. M.; Ortuno, A. Enhancement of phenolic compounds in olive plants (*Olea europaea* L.) and their influence on resistance against *Phytophthora* sp. *Food Chem.* **2003**, *83*, 75-78.

15. Parvez, M. M.; Tomita-Yokotani, K.; Fujii, Y.; Konishi, T.; Iwashina, T. Effects of quercetin and its seven derivatives on the growth of *Arabidopsis thaliana* and *Neurospora crassa*. *Biochem. System. Ecol.* **2004**, *32*, 631-635.
16. Weber B.; Hoesch, L.; Rast, D. M. Protocatechualdehyde and other phenols as cell wall components of grapevine leaves. *Phytochemistry* **1995**, *40*, 433-437.
17. Feucht, W.; Treutter, D.; Schwalb, P. Principles of barrier formation of scab-infected apple fruits. *Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz* **1998**, *105*, 394-403.
18. Schwalb, P.; Feucht, W. Affinity of flavanols to cell walls: Changes after wounding, infection, lignification, and suberization. *J. Appl. Bot.* **1998**, *72*, 157-161.
19. Feucht, W.; Treutter, D. The role of flavan-3-ols and proanthocyanidins in plant defence. In *Principles and Practices in Plant Ecology*; Inderjit, D., Foy C. L., Eds.; CRC Press: Boca Raton, Florida; 1999, 307-338.
20. Fischer, T. C.; Halbwirth, H.; Meisel, B.; Stich, K.; Forkmann, G. Molecular cloning, substrate specificity of the functionally expressed dihydroflavonol 4-reductases from *Malus domestica* and *Pyrus communis* cultivars and the consequences for flavonoid metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.* **2003**, *412*, 223-23.
21. Treutter, D. Chemical reaction detection of catechins and proanthocyanidins with 4-dimethylaminocinnamaldehyde. *J. Chromatogr.* **1989**, *467*, 185-193.
22. Feucht, W.; Treutter, D.; Christ, E. Flavanols in grapevine: in vitro accumulaton and defence reactions in shoots. *Vitis* **1996**, *35*, 113-118.
23. Peterek, S. Phenolische Inhaltsstoffe der Birne und ihre Bedeutung in der Resistenz gegen den Feuerbrand. PhD thesis submitted to the Technische Universität München, 2005.
24. Downey, M. O.; Harvey, J. S.; Robinson, S. P. Synthesis of flavonols and expression of flavonol synthase genes in the developing grape berries of Shiraz and Chardonnay (*Vitis vinifera* L.) *Australian Journal of Grape and Wine Research* **2003**, *9*, 110-121.

25. Doshi, P.; Adsule, P.; Banerjee, K. Phenolic composition and antioxidant activity in grapevine parts and berries (*Vitis vinifera* L.) cv. Kishmish Chorny (Sharad Seedless) during maturation. *International Journal of Food Science & Technology* **2006**, *41*, 1-9.
26. Fujita, A., Goto-Yamamoto, N., Aramaki, I., Hashizume, K. Organ-Specific Transcription of Putative Flavonol Synthase Genes of Grapevine and Effects of Plant Hormones and Shading on Flavonol Biosynthesis in Grape Berry Skins. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2006**, *70*, 632-638.
27. Stich, K.; Forkmann, G. Biosynthesis of 3-deoxyanthocyanins with flower extracts from *Sinningia cardinalis*. *Phytochemistry* **1988**, *27*, 785-789.
28. Gollop, R.; Even, S.; Colova-Tsolova, V.; Perl, A. Expression of the grape dihydroflavonol reductase gene and analysis of its promoter region. *J. Exp. Bot.* **2002**, *53*, 1397-1409.
29. Pfeiffer, J.; Kühnel, C.; Brandt, J.; Duy, D.; Punyasiri, P. A. N.; Forkmann, G.; Fischer, T. C. Biosynthesis of flavan 3-ols by leucoanthocyanidin 4-reductases and anthocyanidin reductases in leaves of grape (*Vitis vinifera* L.), apple (*Malus x domestica* Borkh.) and other crops. *Plant Physiol. Biochem.* **2006**, *44*, 323-334.
30. Tanner, G. J.; Francki, K. T.; Abrahams, S.; Watson, J. M.; Larkin, P. J.; Ashton, A. R. Proanthocyanidin biosynthesis in plants: purification of legume leucoanthocyanidin reductase and molecular cloning of its cDNA. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 31647-31656.
31. Bogs, J.; Downey, M. O.; Harvey, J. S.; Ashton, A. R.; Tanner, G. J.; Robinson, S. P. Proanthocyanidin Synthesis and Expression of Genes Encoding Leucoanthocyanidin Reductase in Developing Grape Berries and Leaves. *Plant Physiol.* **2005**, *139*, 652-663.
32. Bogs, J.; Ebadi, A.; McDavid, D.; Robinson, S. P. Identification of the Flavonoid Hydroxylases from Grapevine and Their Regulation during Fruit Development. *Plant Physiol.* **2006**, *140*, 279-291.

33. Spinelli, F.; Speakman, J.-B.; Rademacher, W.; Halbwirth, H.; Stich, K.; Costa, G. Luteoforol, a flavan 4-ol, is induced in pome fruits by prohexadione-Calcium and shows phytoalexin-like properties against *Erwinia amylovora* and other plant pathogens. *Eur. J. Plant Pathol.* **2005**, *112*, 133-142.

5.1.2 Der Einfluss von Prohexadion-Ca in Kombination mit den Pflanzenstärkungsmitteln Milsana und Myco-Sin auf den Flavonoidstoffwechsel der Weinblätter (*Vitis vinifera* L.)

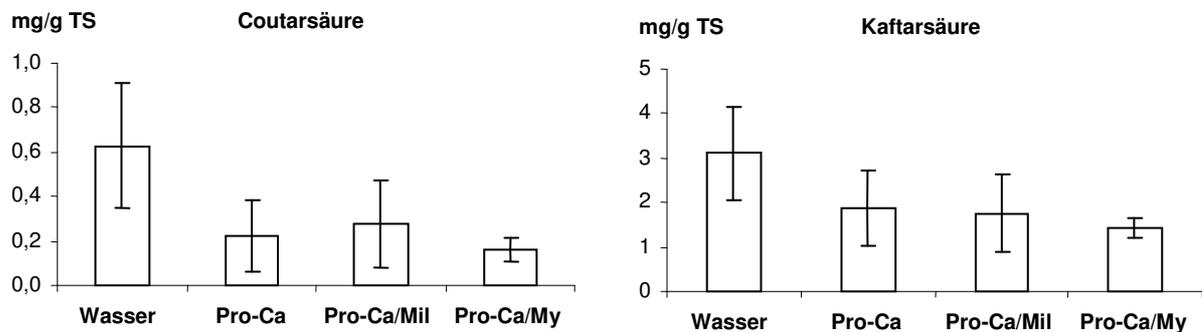


Abb. 32: Einfluss von Prohexadion-Ca-Behandlung (Pro-Ca) und Kombinationsbehandlungen von Prohexadion-Ca mit Milsana (Pro-Ca/Mil) und mit Mycosin (Pro-Ca/My) auf die Konzentrationen von Hydroxyzimtsäuren (Kaftarsäure und Coutarsäure)

Kaftarsäure stellt die Hauptkomponente der Hydroxyzimtsäuren in den Blättern dar. Coutarsäure kommt in deutlich geringerer Konzentration vor. In den Behandlungsvarianten verhielten sich Kaftar- und Coutarsäure in ihren Schwankungen ähnlich. Nach der Prohexadion-Ca-Behandlung und nach der Anwendung von Myco-Sin und Milsana in Kombination mit Prohexadion-Ca kam es zu einer Abnahme des Hydroxyzimtsäure-Gehaltes gegenüber der Kontrolle (Wasser). Die Abnahme des Hydroxyzimtsäure-Gehaltes wurde durch die Kombinationsbehandlungen nicht verstärkt (Abb.32).

Mengenmäßig stellten die Flavonole in Blättern die Hauptkomponente der phenolischen Verbindungen dar (Abb.33). Eine auffällige Dominanz von Isoquercitrin über Quercitrin und Rutin wurde beobachtet (Abb.33).

Die Prohexadion-Ca-Behandlungen (allein und in Kombination mit Milsana und Mycosin) wirkten sich sehr ähnlich auf die Gehalte an Flavonolen aus. Dabei wurde ein Rückgang der Flavonole beobachtet. Die Intensität dieser Abnahme war durch Kombinationsbehandlungen nicht deutlich verändert (Abb.33).

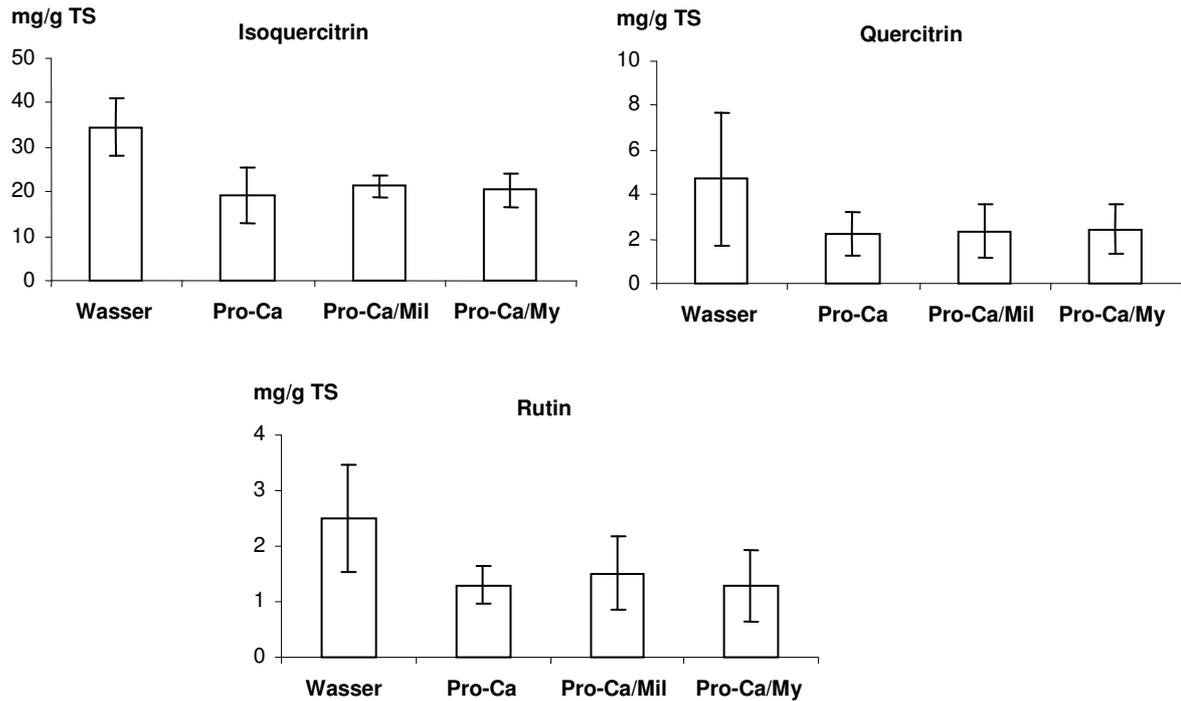


Abb. 33: Einfluss von Prohexadion-Ca-Behandlung (Pro-Ca) und Kombinationsbehandlungen von Prohexadion-Ca mit Milsana (Pro-Ca/Mil) und mit Mycosin (Pro-Ca/My) auf die Konzentrationen von Flavonolen (Isoquercitrin, Quercitrin und Rutin)

Ein konstanter Catechin-Gehalt in allen getesteten Varianten wurde beobachtet. Zum Verlauf des Epicatechin-Gehalts lässt sich wegen der großen Standardabweichung keine gültige Aussage treffen (Abb.34).

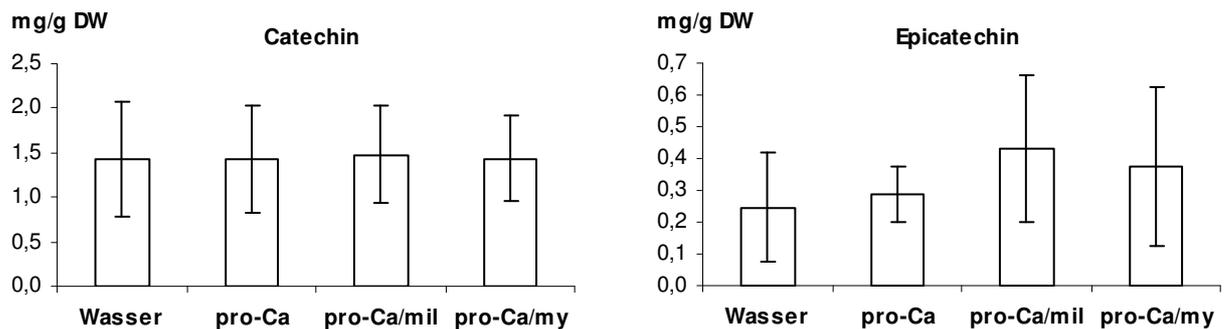


Abb. 34: Einfluss von Prohexadion-Ca-Behandlung (Pro-Ca) und Kombinationsbehandlungen von Prohexadion-Ca mit Milsana (Pro-Ca/Mil) und mit Mycosin (Pro-Ca/My) auf die Konzentrationen von Flavonolen (Catechin und Epicatechin)

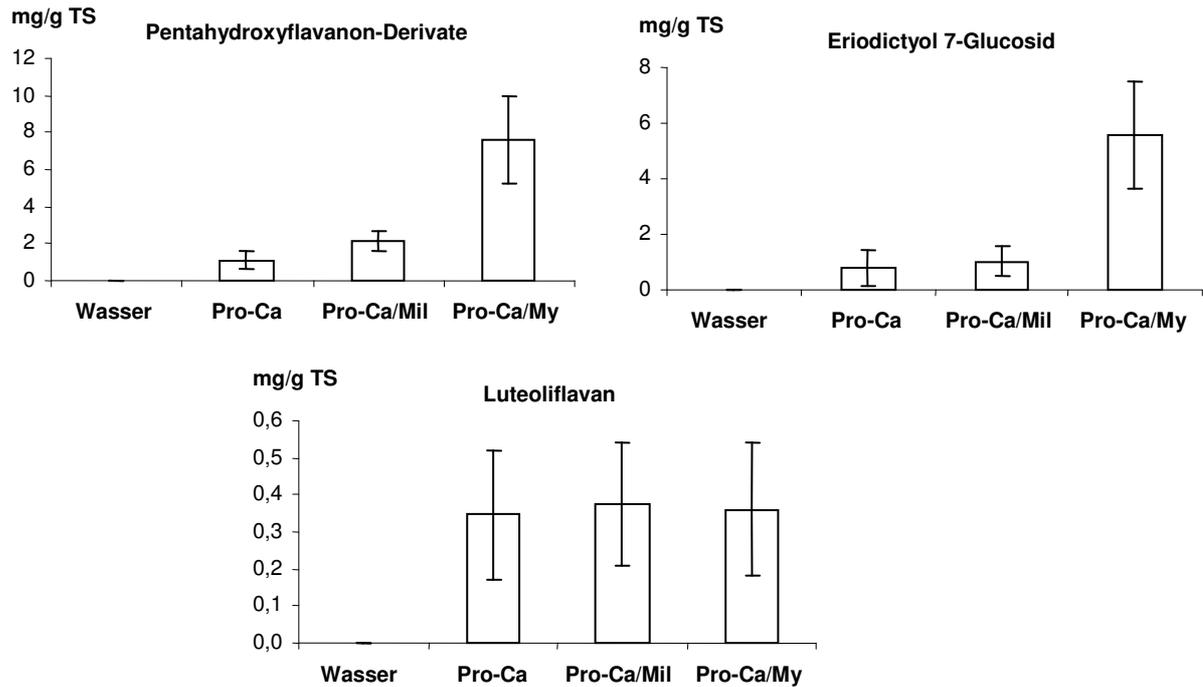


Abb.35: Induktion von Flavanonen (Pentahydroxyflavanon-Derivate und Eriodictyol 7-Glucosid) und 3-Deoxyflavan (Luteoliflavan) durch Prohexadion-Ca-Behandlungen (Pro-Ca) und durch Kombinationsbehandlungen von Prohexadion-Ca mit Milsana (Pro-Ca/Mil) und mit Mycosin (Pro-Ca/My)

In den Kontrollblättern wurden keine Flavanone (Eriodictyol und Pentahydroxyflavanon-Derivate) und keine 3-Deoxyflavane (Luteoliflavan) nachgewiesen (Abb.35). Auf die Anwendung von Prohexadion-Ca reagierten behandelte Weinblätter mit einer geringfügigen Luteoliflavan-Produktion und einer deutlichen Flavanonsynthese. Während die Luteoliflavan-Akkumulation in den Prohexadion-Ca-Varianten immer konstant war, wurde die Flavanon-Akkumulation durch Kombinationbehandlung mit Myco-Sin verstärkt. Dieser Effekt wurde bei der Kombinationsbehandlung mit Milsana nicht beobachtet (Abb.35).

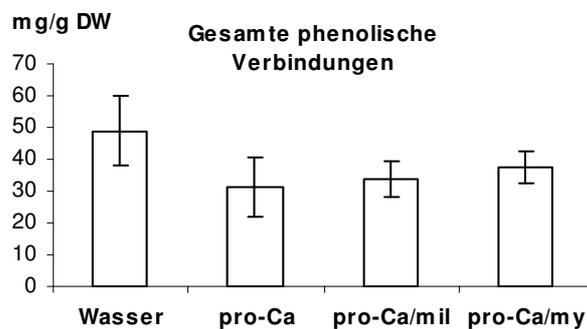


Abb.36: Einfluss von Prohexadion-Ca-Behandlung (Pro-Ca) und Kombinationsbehandlungen von Prohexadion-Ca mit Milsana (Pro-Ca/Mil) und mit Mycosin (Pro-Ca/My) auf die Konzentrationen der Summe an phenolischen Verbindungen

Durch die Prohexadion-Ca-Behandlungen wurde die Gesamtmenge an phenolischen Stoffen verringert. Unterschiede zwischen den Prohexadion-Ca-Varianten wurden nicht beobachtet (Abb.36).

Diskussion:

In Blättern der Weinrebe (*Vitis vinifera* L.) bewirkt Prohexadion-Ca quantitative und qualitative Veränderungen im Metabolismus der phenolischen Verbindungen (Abb. 32, 33, 35, 36). Die Behandlung mit Milsana bewirkte weder quantitative noch qualitative Modifikationen der Prohexadion-Ca-Wirkung auf den Metabolismus der phenolischen Verbindungen (Abb. 32, 33, 34, 35, 36).

PFEIFFER (2007) berichtete über keine deutlichen Effekte auf die Genexpression in Weinblättern durch alleinige Anwendung von Milsana. Das Fehlen von Modifikationen der Prohexadion-Ca-Wirkung durch die zusätzliche Milsana-Behandlung ist insofern auffällig, weil Veränderungen durch Milsana im Phenylpropanoidmetabolismus oft beschrieben wurden (**DAAYF et al. 1995, DAAYF et al. 1997, FOFANA et al. 2002**). Auch unterstützte Milsana den Prohexadion-Ca-Effekt im Erdbeer-Versuch. Möglicherweise spielt der Zeitpunkt der Probenahme (zwei Tage nach der Behandlung) dabei eine Rolle.

Induktionen im Phenylpropanoidmetabolismus durch Myco-Sin wurden von **RÖMMLT (2002)** in Kombination mit Feuerbrand gefunden. **MICHALEK et al. (2005)** zeigten für Myco-san, ein dem Myco-Sin ähnliches Präparat mit Schwefelzusatz, induktive Wirkungen auf die PAL-Aktivität von Apfel. Die Folge der gesteigerten PAL-Aktivität war auch in der hohen Konzentration der Chlorogensäure zu erkennen. Gleichzeitig wurden die Gehalte an Catechin, Epicatechin und Procyanidinen nicht durch Myco-san beeinflusst. Die Myco-Sin-Behandlung verstärkte teilweise die durch Prohexadion-Ca hervorgerufene Induktion von neuartigen phenolischen Stoffen. Dabei wurde allerdings nur die Akkumulation von Flavanonen verstärkt, während die Akkumulation von Luteoliflavan unverändert blieb (Abb.35). Die Anreicherung von Flavanonen könnte durch PAL-Aktivität reguliert werden. Betrachtet man die Hydroxyzimtsäuren-Gehalte als Indikator der PAL-Aktivität, deutet die festgestellte Abnahme des Hydroxyzimtsäuren-Gehalts in behandelten Blättern auf keine induzierte PAL-Aktivität durch Myco-Sin in Kombination mit Prohexadion-Ca hin (Abb. 32). Da die Hydroxyzimtsäuren als Ausgangspunkt des Flavonoidstoffwechsels betrachtet werden können, könnte die festgestellte Abnahme des Hydroxyzimtsäuren-Gehalts in behandelten Blättern jedoch auch auf einen aktiveren Flavonoid-Metabolismus hinweisen. Somit könnte eine Aktivitätssteigerung der PAL nicht durch Zunahme sondern durch Abnahme des Hydroxyzimtsäuren-Gehalt gekennzeichnet sein (Abb.32). Als Indikator eines erhöhten Flavonoid-Metabolismus wäre allerdings eine Zunahme der Summe der phenolischen Verbindungen zu erwarten, was nicht der Fall ist (Abb.36). Von daher wird vermutet, dass die verstärkte Induktion von Flavanonen nach der Prohexadion-Ca/ Myco-Sin Behandlung nicht durch PAL hervorgerufen wird.

Die Verluste in den konstitutiv vorhandenen phenolischen Substanzen (Hydroxyzimtsäuren und Flavonole) (Abb.32, 33) wurden nicht durch die Induktion der neu synthetisierten

Verbindungen (Flavanone und Luteoliflavan) (Abb.35) kompensiert. Demzufolge kam es insgesamt zu einer Abnahme der phenolischen Verbindungen nach der Prohexadion-Ca-Behandlung (Abb.36).

Durch Myco-Sin und Prohexadion-Ca, einzeln oder in Kombination, wurde die *FHT*-Expression etwas erhöht (**PFEIFFER 2007**). Deswegen wird die verstärkte Flavanon-Akkumulation nach der Kombinationsbehandlung mit Prohexadion und Myco-Sin (Abb.35) als die Folge einer erhöhten *FHT*-Expression betrachtet. Das Ausbleiben einer verstärkten Luteoliflavan-Akkumulation durch Prohexadion-Ca/Myco-Sin- Behandlung wird auf eine sehr schwache *LAR*-Expression in Weinblättern (**BOGS et al. 2005**) zurückzuführen sein.

6. ZUSAMMENFASSENDE GESAMTDISKUSSION

Die vorliegenden Daten belegen, dass es durch Prohexadion-Ca-Behandlung möglich ist, den Phenylpropanoid- und Flavonoidstoffwechsel der Weinrebe und der Erdbeere zu beeinflussen. Fast alle behandelten Entwicklungsstadien der Weinrebe und Erdbeere reagierten auf die Prohexadion-Ca-Behandlungen mit der Akkumulation von Luteoliflavan und Eriodictyol 7-Glucosid. PHF (Pentahydroxyflavanon-Derivate) und eine glucosylierte Form von Luteoliflavan (Luteoliflavan 5-Glucosid) wurden nach der Prohexadion-Ca-Behandlung nur in Weinbeeren quantifiziert (**PUHL et al. 2008**).

Die Akkumulation von Eriodictyol 7-Glucosid und Luteoliflavan in beiden Kulturen erlaubt den Schluss, dass die DFR sowohl der Weinrebe als auch der Erdbeere, wie schon bei Apfel beschrieben wurde, eine zusätzliche FNR-Aktivität besitzen (**HALBWIRTH et al. 2002**, **FISCHER et al. 2003**). Durch die Strukturähnlichkeit von Prohexadion-Ca und 2-Oxoglutarat (**RADEMACHER 2000**) wurde die Aktivität der FHT als 2-Oxoglutarat-abhängiger Dioxygenase der Flavonoidbiosynthese (**FORKMANN UND HELLER 1999**) eingeschränkt. Dadurch akkumulierte das Flavanon Eriodictyol, welches teilweise zum Eriodictyol 7-Glucosid glykosyliert und teilweise durch die DFR/FNR-Aktivität in das Flavan 4-ol Luteoforol umgewandelt wurde. Luteoforol als instabiles Zwischenprodukt wird durch LAR sowohl in Trauben (**PFEIFFER et al. 2006**) als auch bei der Erdbeere (**DEIML 2007**) weiter zum Luteoliflavan metabolisiert.

Obwohl unter den Flavanonen das 3'-hydroxylierte Naringenin bei der Birne (**PETEREK 2004**) und das 3'5'-hydroxylierte Pentahydroxyflavanon bei der Weinrebe nach der Prohexadion-Ca Behandlung nachgewiesen wurde, konnte keine Akkumulation der entsprechenden 3-Deoxyflavonole (3-Deoxyafzelechin bzw. 3-Deoxygallocatechin) festgestellt werden. Diese Substanzen wurden bisher auch nicht beschrieben. Aufgrund des Fehlens von anderen 3-Deoxyflavonoiden außer Luteoliflavan stellt sich die Frage, ob die Substratspezifität der LAR nicht nur durch Konfiguration (Stereoisomerie) der OH-Gruppe an Position 3 (**XIE et al. 2005**, **WELLMANN et al. 2006**), sondern auch durch die Hydroxylierung des B-Ringes bedingt ist.

Das Fehlen von Pentahydroxyflavanon als 3'4'5'-hydroxyliertes Flavanon nach der Prohexadion-Ca-Behandlung und das Auftreten vor allem 4'- und 3'4'-hydroxylierter Flavonole, Anthocyane und Flavan 3-ole bei der Erdbeere (**ISHIMARU et al. 1995**, **TÖRRÖNEN et al. 2002**, **BREITFELLNER et al. 2002**, **BREITFELLNER et al. 2003**, **AUGER et al. 2004**, **MÄÄTTÄ-RIIHINEN et al. 2004**, **SEERAM et al. 2006**, **ALMEIDA et al. 2007**) deuten auf keine bzw. niedrige Flavonoid 3'5'-Hydroxylase-Aktivität in Erdbeerfrüchten hin. Im Gegensatz zur

Weinrebe (**JEONG et al. 2005, BOGS et al. 2006**) konnte bisher keine Flavonoid 3'- oder Flavonoid 3'5'-Hydroxylase aus der Erdbeere kloniert und charakterisiert werden. Die Entstehung von Pentahydroxyflavanon-Derivaten bei der Weinrebe könnte als Indikator von F3'5'H-Enzymexpression betrachtet werden. F3'H ist den Blüten und jungen Beeren der Weinrebe aktiver, im Ektokarp bzw. zum Farbumschlag wird der Einfluss der F3'5'H stärker (**JEONG et al. 2005**).

Luteoforol wurde wegen seiner antimikrobiellen Eigenschaften (**SPINELLI et al. 2005**) als Ursache der Resistenzinduktion durch Prohexadion-Ca angenommen (**RÖMMELT et al. 1999b, RÖMMELT et al. 2003a, PETEREK 2004**).

Weil Luteoforol bisher nicht in behandelten Geweben detektiert wurde, wird die Entstehung von Luteoliflavan, welches allerdings selbst keine antibakterielle Wirkung zeigt (**RÖMMELT et al. 2003a**), als Indiz für seine Synthese betrachtet.

Obwohl Flavanone als Resistenzfaktoren bei *Citrus*-Früchten (**del RIO et al. 2004, ORTUÑO et al. 2006**) und als antifungale Flavonoide beschrieben (**DANELUTTE et al. 2003**) wurden, konnten **RÖMMELT et al. (2003a,b)** aufgrund fehlender antibakterieller Eigenschaften der Flavanone Eriodictyol 7-Glucosid und Naringenin 7-Glucosid gegen *Erwinia amylovora* keinen Zusammenhang zwischen akkumulierten Flavanonen und induzierter Resistenz finden.

Die Instabilität des Luteoforols in Pflanzen (**PFEIFFER et al. 2006**) und die fehlenden Daten und Literaturangaben über die Wirkung von Flavanonen und 3-Deoxyflavanoiden gegen *Botrytis cinerea* erschweren die Aussage, inwieweit diese neu induzierten Verbindungen als Kandidaten für induzierte Resistenz durch Prohexadion-Ca-Behandlung betrachtet werden können.

Während die Bildung von Phytoalexinen in Erdbeerfrüchten bisher noch nicht beschrieben wurde (**SCHERER et al. 1982, JERSCH et al. 1989, FILIPPONE et al. 1999**), wurden die Verbindungen der Stilbene als Phytoalexine bei der Weinrebe (**LANGCAKE UND PRYCE 1976**) sehr oft als Resistenzfaktoren dargestellt.

In der Weinrebe kommen Stilbene als induzierbare phenolische Verbindungen vor.

Diese können durch verschiedene abiotische Stressoren wie UV-Licht (**JEANDET et al. 1991, DOUILLET-BREUIL et al. 1999, ADRIAN et al. 2000, BAIS et al. 2000, PEZET et al. 2003a**) und Aluminiumchlorid (**ADRIAN et al. 1996**) sowie biotische Stressoren wie Befall durch *Botrytis cinerea* (**LANGCAKE UND PRYCE 1976, BLAICH UND BACHMANN 1980, JEANDET et al. 1991, JEANDET et al. 1995, BAVARESCO et al. 1997, CICHEWICZ et al. 2000, ROLDAN et al. 2003, KELLER et al. 2003**) und *Plasmopara viticola* (**LANGCAKE UND PRYCE et al. 1976, PEZET et al. 2004**) induziert werden.

Obwohl **PFEIFFER (2007)** durch Prohexadion-Ca-Behandlung eine Steigerung der STS-Expression in Weinblättern fand, erbrachten die Ergebnisse der Phenolanalytik sowohl in

den Kontrollblätter als auch in den behandelten Blättern keinen Nachweis von Stilben-Akkumulationen. Die schnelle Oxidation (**LANGCAKE UND PRYCE 1976**) und die Isomerisierung der Stilbene zur *cis*-Form durch UV-Licht (**ADRIAN et al. 2000**) können die Identifikation und Quantifizierung der Stilben-Verbindungen beeinträchtigen.

Die Abwesenheit der Stilbene in Blättern wurde schon beschrieben (**BLAICH UND BACHMANN, LISWIDOWATI et al. 1991**). **KORTEKAMP (2006)** fand erst nach der Inokulation mit Pathogenen (*Plasmopara viticola* und *Pseudoperonospora cubensis*) eine Expression von *STS* in den Weinblättern. Deswegen wäre möglicherweise eine Vorinduktion der Stilben-Synthese vor der Prohexadion-Ca Behandlung sinnvoll. Als Induktoren wären abiotische Faktoren von Vorteil, weil *Botrytis cinerea* selbst Stilbene enzymatisch metabolisieren und detoxifizieren kann (**PEZET et al. 1991, SBAGHI et al. 1996**). Die Kombinationsbehandlung von Prohexadion-Ca mit Aluminiumchlorid (**ADRIAN et al. 1996**) bzw. vorherige zusätzliche Bestrahlung mit UV-Licht (**JEANDET et al. 1991, DOUILLET-BREUIL et al. 1999, ADRIAN et al. 2000, BAIS et al. 2000, PEZET et al. 2003a**) wäre eine Möglichkeit für weiterführende Untersuchungen zur näheren Aufklärung der Induktion der Stilbenbiosynthese sowohl bei Blättern als auch bei Trauben.

Bei den Trauben sollte eine solche Behandlung während der Blüte durchgeführt werden, weil die Induzierbarkeit der Stilbensynthese während der Fruchtreife sinkt (**SCHÖPPNER UND KINDL**), und weil Blüten die bevorzugten Organe für eine *Botrytis*-Infektion sind (**MC-CLELLAN et al. 1973, SCHERER et al. 1982, HILL et al. 1981, JERSCH et al. 1989, BOFF et al. 2003, KELLER et al. 2003**).

Der Einfluss von Prohexadion-Ca auf die Stilben-Biosynthese und dessen Verlauf während der Fruchtentwicklung der Weintrauben wurden als Teil einer im Rahmen dieser Arbeit betreuten Diplomarbeit untersucht (**STADLER 2006**). Dabei wurde gezeigt, dass die Stilben-Gehalte, wie schon oft in der Literatur beschrieben wurde (**JEANDET et al. 1991, BAVARESCO et al. 1997, JEANDET et al. 1995, BAIS et al. 2002, PEZET et al. 2003a, ROLDAN et al. 2003**), während der Fruchtreife sinken und dass eine Prohexadion-Ca-Anwendung nicht in der Lage ist, der Phenolstoffwechsel in Richtung der Stilbene umzuleiten.

Obwohl ein dynamisches Expressionsmuster der *STS* während der Traubenentwicklung festgestellt wurde, gelang dies bei der *STS*-Enzymaktivität nicht (**PFEIFFER 2007**).

Der erneute Anstieg der *STS*-Expression bei der Fruchtreife (**PFEIFFER 2007**) stimmte nicht mit den sinkenden Stilben-Gehalten während der Fruchtreife überein (**JEANDET et al. 1991, BAVARESCO et al. 1997, JEANDET et al. 1995, BAIS et al. 2002, PEZET et al. 2003a, ROLDAN et al. 2003, Stadler 2006**). Der Rückgang des Stilbengehalts mit beginnender Traubenfärbung kann nach **JEANDET et al. (1995)** auf die Konkurrenz der Enzyme

Stilben- und Chalkonsynthese (CHS) zurückgeführt werden. Die STS konkurriert mit der CHS um die gemeinsamen Substrate (Malonyl-CoA und *p*-Comaroyl-CoA) (**SCHRÖDER et al. 1988**). Die Reaktionen sind bis zu dem Tetraketid-Intermediat nach den drei Kondensations-Reaktionen mit Malonyl-CoA identisch. Erst danach unterscheiden sie sich in der Faltung zu einem neuen aromatischen Ringsystem. Bei der Ringbildung zum Stilben Resveratrol wird die endständige Carboxyl-Gruppe als Kohlendioxid (CO₂) abgespalten; dies findet bei der Reaktion mittels CHS nicht statt (**AUSTIN et al. 2004**).

Zusätzlich zur Empfindlichkeit der Stilbene gegenüber UV-Licht und Sauerstoff-Einfluss, die möglicherweise nach der Probenahme bzw. bei der Extraktion vorhanden waren, könnte die Steuerung der Konkurrenz zwischen STS und CHS um die gleichen Substrate *in planta*, die nicht *in vitro* vorhanden ist, noch ein Grund für die widersprüchlichen Ergebnisse der Stilben-Analytik, -Genexpression und -Enzymaktivität sein.

Obwohl heute die Kristallstruktur der Chalkonsynthese und zahlreiche Sequenzen von Chalkon- und Stilbensynthesen vorliegen, ist die Entscheidung, ob es sich um eine Chalkon – oder Stilben-Synthase handelt, nicht anhand der Primärsequenz möglich (**FERRER et al 1999**).

Die Chalkon- und die Stilbensynthese in *Arachis hypogaea* (**SCHRÖDER et al. 1988**) sind auf Proteinebene zu 75% identisch und unterscheiden sich nur durch 35 Aminosäurepositionen voneinander. Wenn sich die unterschiedlichen Aminosäurepositionen im inaktiven Bereich des Enzyms befinden sollten, wäre es denkbar, dass beide Enzyme in das jeweils andere umwandelbar sind. Eine Umwandlung wäre durch verschiedene abiotische und biotische Faktoren möglich. Diese Hypothese wird durch auftretende Kreuzreaktionen in transformierten *Escherichia coli* (**YAMAGUCHI et al. 1999**) gestärkt, bei denen eingeschleuste Chalkon- und Stilbensynthese-Gene auch in der Lage waren, das jeweils andere Endprodukt zu synthetisieren.

Catechin als konstitutive phenolische Verbindung wurde aufgrund seiner antimikrobiellen Eigenschaften sehr oft als Resistenzfaktor beschrieben (**SCALBERT 1991, HAKULINEN et al. 1999, YAMAMOTO et al. 2000, del RIO et al. 2003**). Die Expressionsmuster von *LAR* bei der Erdbeere (**ALMEIDA et al. 2007, DEIML 2007**) und Trauben (**PFEIFFER 2007**) sind sehr ähnlich. Sie sind zweiphasig mit einem hohen Expressionsniveau in grünen Stadien und einem erneuten Anstieg während der Fruchtreife.

In Gegensatz zum ersten Maximum deckte sich das zweite Maximum nicht mit den niedrigen Gehalten des Catechins sowohl bei der reifenden Erdbeere als auch bei den reifenden Trauben. Die niedrigen Catechingehalte und die untergeordnete Cyanidin-Produktion der reifenden Trauben (**WENZEL et al. 1987, KOSIR et al. 2004, KALLITHRAKA et al. 2005, JEONG et al. 2006**) sowie die Expressionsmuster von *LAR* während Wachstum und Reife der Trauben (**PFEIFFER 2007**) erlauben die Behauptung, dass die bei der Erdbeere aufge-

stellte Hypothese über Produktion der Cyanidin-Derivate als Produkte der „alten“ Catechinbiosynthese durch Rückreaktion der LAR (**DEIML 2007**) auch bei der Weinrebe in Frage kommen kann.

Zusammenfassend lässt sich behaupten, dass in den Reproduktionsorganen der Weinrebe (**BOSS et al. 1996**) und der Erdbeere (**ALMEIDA et al. 2007**) die Enzyme PAL, CHS, CHI, FHT und ANS ihre maximale Expression zur Blütezeit bzw. grünen Früchten und ab der Fruchtreife zeigen. Auch die *DFR* Expression sowohl bei der Erdbeere (**MOYANO et al. 1998**) als auch bei der Trauben (**BOSS et al. 1996**) zeigte ein zweiphasiges Genexpressionsmuster.

Die erste Phase des Phenylpropanoidstoffwechsels in den grünen Früchten ist bei beiden Kulturen durch entsprechende Expressionmuster während der Blüte charakterisiert. Dabei wurde Catechin als Hauptflavonoid produziert. In frühen Stadien werden wahrscheinlich die Reaktionsprodukte der ANS, die Anthocyanidine, durch die ANR-Aktivität in Epicatechin umgewandelt (**XIE et al. 2005, FUJITA et al. 2005**). Bei der Erdbeere könnte die ANS für Catechin Dimerisierung zuständig sein (**WELLMANN et al. 2006**)

Die zweite Phase, in den reifen Früchten, ist für Anthocyanbildung verantwortlich. Die Stabilisierung der Anthocyane ist durch *UFGT* Expression bei der Reife der Trauben (**KOBAYASHI et al. 2001**) und der Erdbeere (**GRIEBER 2007**) reguliert.

Der deutlichste Effekt der Applikation von Prohexadion-Ca auf die Gehalte an Catechin wurde in den grünen Früchten der beiden Reproduktionsorgane festgestellt (BBCH 71 und BBCH 73). Gleichzeitig wurde hier das erste Maximum der *LAR* festgestellt (**ALMEIDA et al. 2007, DEIML 2007**). Der zweite Anstieg der *LAR*-Expression spiegelte sich in der Wirkung von Prohexadion-Ca nicht wider. Wird angenommen, dass der zweite Anstieg der *LAR* nicht für die Catechin-Synthese verantwortlich ist, dann lässt sich behaupten, dass die Entstehung von Luteoliflavan bzw. Luteoforol neben der putativen *LAR*-Aktivität auch von der Catechin-Synthese während Wachstum und Reife der Erdbeeren und Trauben abhängt. Obwohl bei den Weinblättern die Verfügbarkeit des Substrats Eriodictyol als Ausgangspunkt für die Luteoliflavan-Produktion durch die Kombinationsbehandlung mit Myco-Sin induziert wurde, war die Luteoliflavan-Akkumulation unverändert.

Hier spielt, wie in Trauben und Erdbeeren, die Catechin-Synthese eine entscheidende Rolle. Weil in den Weinblättern die Catechin-Synthese in Relation zu der der Flavonole untergeordnet ist, wurde die Luteoliflavan-Entstehung offenbar aufgrund der nicht ausreichenden *LAR*-Aktivität beschränkt.

Aufgrund der dargestellten Ergebnisse, lässt sich behaupten, dass die Catechin-Synthese eine entscheidende Rolle bei der Prohexadion-Ca-Wirkung spielt.

Der Einsatz von Prohexadion-Ca in der Praxis als Alternative zur direkten Bekämpfung von Krankheitserregern ist wegen der wenig spezifischen Wirkungsweise von Prohexadion-Ca fraglich. Weil 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenasen am gesamten Pflanzenstoffwechsel beteiligt sind (**RADEMACHER 2000**), ist es nicht möglich, seine Wirkung nur auf den Phenylpropanoidstoffwechsel zu beschränken. Weil der Phenylpropanoidstoffwechsel pflanzenartspezifisch und durch Umweltfaktoren beeinflussbar ist (**TREUTTER et al. 2006**), ist eine allgemeine gezielte Aktivierung des Phenylpropanoidstoffwechsels durch Prohexadion-Ca zur Abwehr von *Botrytis cinerea* begrenzt. Trotzdem weisen die Versuche mit Prohexadion-Ca darauf hin, dass bestimmte Modifikationen während Wachstum und Reife der Erdbeeren und Trauben möglich sind und zeigen, wie sich der Phenylpropanoidstoffwechsel in Abhängigkeit der Entwicklungsstadien effektiv von außen steuern lässt. Die deutlichsten Modifikationen wurden in beiden Kulturen in den grünen Früchten erreicht. Weil grüne Früchte als *Botrytis*-resistent gelten, besteht in der Praxis jedoch wenig Bedarf an metabolischem Pflanzenschutz. Reife Früchte, die gegenüber *Botrytis cinerea* anfällig sind, zeigten keine deutlichen Veränderungen durch Prohexadion-Ca. Bei der Trauben liegt der Grund für die lediglich geringen Unterschiede wohl darin, dass seit der letzten Pro-Ca-Applikation zehn Wochen vergangen sind. Trotz des Dauerbelastungsversuchs bei der Erdbeere waren die Modifikationen in den reifen Früchten minimal.

Die Strategie, die Resistenz der Erdbeere und Weinrebe gegen *Botrytis cinerea* durch Phenolstoffwechselmodifikationen in reifen Früchten zu erreichen, erscheint also nicht ausreichend. Im Gegensatz dazu wurden deutliche Veränderungen während der Blüte durch Prohexadion-Ca bei beiden Kulturen festgestellt. Weil Blüten in ihrem Phenylpropanoidmetabolismus modifizierbar sind und weil diese, auch wenn Symptome erst zur Reife auftreten, die bevorzugten Infektionsorgane für *Botrytis cinerea* darstellen, sollten die Blüten und eine eventuelle Verhinderung der Infektion von *Botrytis cinerea* durch äußere Steuerung des Phenolstoffwechsels vor und während der Blüte, als Hauptaugenmerk der Pflanzenresistenzinduktionsforschung bei der Erdbeere und der Weinrebe betrachtet werden.

Die molekularbiologischen, enzymologischen und analytischen Untersuchungen von Prohexadion-Ca-behandelten Pflanzen haben bis heute maßgebliche Beiträge zur Erforschung der Flavonoidbiosynthese geleistet. Es wurde gezeigt, dass die DFR eine zusätzliche FNR-Aktivität besitzen kann (**HALBWIRTH et al. 2002, FISCHER et al. 2003**) und dass die LAR-Spezifität nicht durch Hydroxylierung des C-Rings bestimmt ist (**PFEIFFER et al. 2006, DEIML 2007**). Zusätzlich wurden neue Stoffe identifiziert und isoliert (**RÖMMELT et al. 2003 a, b, PUHL et al. 2008**). Durch die Entstehung von Flavanonen und 3-Deoxyflavonoiden bei der Weinrebe wurde vermutet, dass die LAR-Spezifität durch die B-Ring Hydroxylierung charakterisiert ist.

Wenngleich Prohexadion-Ca in der Praxis wohl kaum als Alternative zu Fungiziden zur Anwendung kommen wird, sollten in dieser Hinsicht die bisherigen Erkenntnisse über den Flavonoidstoffwechsel, die durch den Bioregulator Prohexadion-Ca gewonnen wurden, in zukünftige Untersuchungen im Bereich der noch nicht genug erforschten induzierten Pflanzenresistenz als neue Strategie des Pflanzenschutzes einbezogen werden.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Durch Behandlung mit dem Bioregulator Prohexadion-Ca ist es möglich, den Phenylpropanoid- bzw. Flavonoidstoffwechsel der Weinrebe und der Erdbeere zu beeinflussen. Der Effekt von Prohexadion-Ca äußerte sich bei beiden Kulturen in einer Akkumulation von Luteoliflavan und Eriodictyol 7-glucosid. Pentahydroxyflavanon-Derivate wurden nach der Prohexadion-Ca-Behandlung nur bei der Weinrebe identifiziert.

Neben der Biosynthese neuer Flavonoide bewirkte Prohexadion-Ca auch Verschiebungen im Metabolismus konstitutiver phenolischer Verbindungen. Bei der Weinrebe kam es zur Konzentrationsabnahme von Flavonolen und Hydroxyzimtsäuren. Bei der Erdbeere wurde, abhängig von dem Zeitpunkt der Behandlung, der Catechin-Gehalt modifiziert.

Durch die auffallend hohe Konzentration an Flavonolen in Weinblättern - im Gegensatz zu Blüten und Trauben - wurde der Prohexadion-Ca-Effekt hier vor allem durch eine deutliche Abnahme der Flavonolgehalte erkennbar. Der Catechingehalt blieb dabei unverändert.

In Weinblüten und Weinbeeren hingegen wurde eine Reduktion der Catechin-Konzentrationen festgestellt. Die Dynamik des Phenylpropanoidstoffwechsels während der Blüten- und Fruchtentwicklung sowohl der Weinrebe als auch der Erdbeere ist der entscheidende Faktor für die Effektivität einer Prohexadion-Ca-Behandlung. Alle Prohexadion-Ca-bedingten Modifikationen manifestierten sich am stärksten nach der Blüte während der frühen Fruchtentwicklung (BBCH-Stadien 71 bzw. 73), wo gleichzeitig die jeweiligen Aktivitätsmaxima des Phenylpropanoidstoffwechsels beobachtet wurden. Danach fand eine deutliche Abnahme der gesamten Phenylpropanoidbiosynthese statt, womit sich auch die durch Prohexadion-Ca induzierten Veränderungen abschwächten. Dies reflektiert sich bei beiden Kulturen auch im zeitlichen Verlauf der Catechin-Konzentrationen. Folglich sind die erwünschten Modifikationen im Catechingehalt der *Botrytis*-anfälligen Stadien (beginnende Fruchtreife; BBCH 81) nicht durch die Anwendung von Prohexadion-Ca zu erreichen.

Abhängig von der Kultur sind die untersuchten Pflanzenstärkungsmittel Milsana und Myco-Sin in der Lage, in Kombination mit Prohexadion-Ca zusätzliche Modifikationen zu induzieren. Bei den Weinblättern führte Myco-Sin/Prohexadion-Ca zu einer im Vergleich zur Prohexadion-Ca-Variante erhöhten Akkumulation von Flavanonen, während die Anreicherung von Luteoliflavan unverändert blieb. Die Behandlung mit Milsana bewirkte weder quantitative noch qualitative Modifikationen der Prohexadion-Ca-Wirkung auf den Metabolismus der phenolischen Stoffe der Weinblätter.

Bei der Erdbeere wurde durch Kombinationsbehandlung mit Prohexadion-Ca und Milsana eine verstärkte Catechin-Akkumulation, eine erhöhte Induktion von Eriodictyol 7-glucosid

und Luteoliflavan im Vergleich zur einzelnen Prohexadion-Ca Behandlung festgestellt. Auch ein resistenzinduzierter Effekt gegen *Botrytis*-Befall bei den reifen Früchten (BBCH 89) wurde bei der Kombinationsbehandlung mit Prohexadion-Ca und Milsana beobachtet. Bei beiden Kulturen wurde deutlich, dass die Blüten weniger Catechin als die gegen Grauschimmel resistenten grünen Früchte (BBCH 71 und 73) bilden. Möglicherweise ist die verminderte Catechinsynthese in den Blüten ein Grund, dass die Blüten die bevorzugten Infektionsorte für *Botrytis* darstellen. Damit bietet sich die Förderung der Catechin-Biosynthese vor der Blüte als neue Strategie an, um das Infektionsrisiko der Erdbeere und Weinrebe mit *Botrytis cinerea* zu verringern.

Die Ergebnisse dieser Arbeit können als Beitrag zur Grundlagenforschung des Phenylpropanoidstoffwechsels der Erdbeere und Weinrebe weitergehende Untersuchungen im Bereich der Resistenzinduktion durch Modifikationen im pflanzlichen Sekundärstoffmetabolismus unterstützen.

8. SUMMARY

The application of the bioregulator prohexadione-Ca affects the phenylpropanoid and in particular the flavonoid metabolism in grapevine and strawberry. In both crops, the effect of prohexadione-Ca became manifest in the accumulation of derivatives of eriodictyol and luteoliflavan. Pentahydroxyflavanone derivatives were exclusively identified upon prohexadione-Ca treatment in grapevine tissues.

In addition to the synthesis of novel flavonoids, prohexadione-Ca also caused shifts in the metabolism of constitutive phenylpropanoids. In treated grapevine tissues, the concentrations of flavonols and hydroxycinnamic acids decreased. Subject to the point in time of the treatment, the catechin content of strawberry fruits was altered.

As, unlike in flowers and berries, the concentrations of flavonols were remarkably high in grapevine leaves, the effect of prohexadione-Ca herein was mainly expressed in a strong reduction of flavonol contents. Catechin contents remained unchanged. In grapevine flowers and berries however, a reduction of catechin contents was noticed. The dynamics of the phenylpropanoid metabolism during flower and berry development in both grapevine and strawberry are the key factors for the effectiveness of prohexadione-Ca treatment. All modifications brought about by prohexadione-Ca most distinctively occurred during the early stages of fruit development where the maximum activities of the phenylpropanoid metabolism were observed. Afterwards, the total phenylpropanoid biosynthesis strongly decreased. Thus, the alterations generated through prohexadione-Ca attenuated in synchrony. For both crops, this is also reflected in the chronological sequence of catechin concentrations. Consequently, the desired modifications of catechin contents during stages susceptible to *Botrytis cinerea* (beginning of ripening) cannot be achieved through the application of prohexadione-Ca.

Depending on the crop, the investigated plant resistance inductors Milsana and Myco-Sin may, in combination with prohexadione-Ca, lead to additional modifications. In grapevine leaves, Myco-Sin/prohexadione-Ca caused an enhanced accumulation of flavanones compared to the prohexadione-Ca variant. However, luteoliflavan levels remained unaltered. Milsana treatment neither quantitatively nor qualitatively affected the impact of prohexadione-Ca on the metabolism of phenolic compounds in grapevine leaves. In strawberry, Milsana intensified the prohexadione-Ca effect by an enhanced accumulation of catechin and a further induction of eriodictyol 7-glucoside and luteoliflavan. A resistance-inducing effect against *Botrytis cinerea* infestation was also observed with the combined application of prohexadione-Ca and Milsana.

It was apparent in both crops that flowers produce less catechin than green fruits, which are resistant to grey mould. Reduced catechin synthesis in flowers may be a reason why

flowers are the favoured organs of *Botrytis* infection. Thus, enhancing the biosynthesis of catechin before flowering seems to be an appropriate novel strategy to reduce the risk of infection with *Botrytis cinerea* in grapevine and strawberry.

As a contribution to basic research on the phenylpropanoid metabolism of strawberry and grapevine, the results of this thesis may support advanced research in the field of resistance induction through the modification of plant secondary metabolism.

9. LITERATURVERZEICHNIS

ABRAHAMS, S., LEE, E., WALKER, A. R., TANNER, G. J., LARKIN, P. J., ASHTON, A. R. **2003**: The Arabidopsis TDS4 gene encodes leucoanthocyanidin dioxygenase (LDOX) and its essential for proanthocyanidin synthesis and vacuole development

***The Plant Journal* 35/5:624–636**

ADRIAN, M., JEANDET, P., BESSIS, R., JOUBERT, J.M. **1996**: Induction of phytoalexin (resveratrol) synthesis in grapevine leaves treated with aluminium chloride (AlCl₃)

***J. Agric. Food. Chem.* 44: 1979-1981**

ADRIAN, M., JEANDET, P., VENEAU, J., WESTON L. A., BESSIS R. **1997**: Biological Activity of Resveratrol, a stilbenic compound from grapevine, against *Botrytis cinerea* the causal agent for grey mould

***J. Chem. Ecology* 23: 1689.-1702**

ADRIAN, M., RAJAEI, H., JEANDET, P., VENEAU, J., BESSIS, R. **1998**: Resveratrol oxidation in *Botrytis cinerea* conidia

***Phytopathology* 88/5: 472-476**

ADRIAN, M., JEANDET, P., DOUILLET-BREUIL, A. C., TESSON, L., BESSIS, R. **2000**: Stilbene content of mature *Vitis Vinifera* berries in response to UV-C elicitation

***J. Agric. Food Chem.* 48: 6103-6105**

ALMEIDA J.R.M., D'AMICO E., PREUSS A., CARBONE F., de VOS C.H.R., DEIML B., MOURGUES F., PERROTTA G., FISCHER T.C., BOVY A.G, MARTENS S., ROSATI C. **2007**: Characterization of major genes and enzymes involved in flavonoid and proanthocyanidin biosynthesis during fruit development in strawberry (*Fragaria x ananassa*)

***Archives of Biochemistry and Biophysics* 465: 61-71**

AUGER, C., AL-AWWADI, N., BORNET, A., ROUANET, J. M.M., GASC, F., CROS, G., TEISSEDRE, P. L. **2004**: Catechins and procyanidins in mediterranean diets

***Food Research International* 37: 233-245**

AUSTIN, M. B., BOWMAN, M. E., FERRER, J.L., SCHRÖDER, J., NOEL, J.P. **2004**: An aldol switch discovered in stilbene synthases mediates cyclization specificity of type III polyketide synthases.

***Chemistry & Biology* 11:1179-1194**

BAIS, A.J., MURPHY, P.J., DRY, I.B. **2000**: The molecular regulation of stilbene phytoalexin biosynthesis in *Vitis Vinifera* during grape berry development

***Aus. J. Plant Physiology* 27: 425-433**

BALDI, A., ROMANNI, A., MULINACCI, N., VINCIERI, F.F., CASSETTA, B. **1995**: HPLC/MS Application to anthocyanins of *Vitis vinifera* L.

***J. Agric. Food Chem.* 43: 2104-2109**

BARANOWSKI, J. D., NAGEL, C.W. **1981**: Isolation and identification of the hydroxycinnamic acid derivatives in white riesling wine

***Am. J. Enol. Vitic.* 32: 5-12**

BAVARESCO, L., PETEGOLLI, D., CANTU, E., FREGONI, M., CHIUSA, G., TREVISAN, M. **1997**: Elicitation and accumulation of stilbene phytoalexins in grapevine berries infected by *Botrytis cinerea*
***Vitis* 36/2: 77-83**

BLAICH, R., BACHMANN, O. **1980**: Die Resveratrolsynthese bei *Vitaceen* Induktion und zytologische Beobachtungen
***Vitis* 19: 230-240**

BOFF, P., KRAKER, DE J., GERLAGH, M., KÖHL, J. **2003**: The role of petals in development of grey mould in strawberries
***Fitopatol. Bras.* 28/1:76-83**

BOGS, J., DOWNEY, M. O., HARVEY, J. S., ASHTON, A. R., TANNER, G. J., ROBINSON, S. P. **2005**: Proanthocyanidin synthesis and expression of gene encoding leucoanthocyanidin reductase and anthocyanidin reductase in developing grape berries and grapevine leaves
***Plant Physiology* 2005: 652-663**

BOGS, J., EBADI, A., McDAVID, D., ROBINSON, S. **2006**: Identification of the flavonoid hydroxylases from grapevine and their regulation during fruit development
***Plant Physiology* : 279-291**

BOSS, P.K., DAVIES, C., ROBINSON, S. P. **1996**: Analysis of the expression of anthocyanin pathway genes in developing *Vitis vinifera* L. cv Shiraz grape berries and the implications for pathway regulation
***Plant Physiol* 111: 1059-1066**

BRANDES, W., BAUMANN, R., PAAR, E., PISCHINGER, K., REINEINHARD, E., ROSNER, A., WUNDERER, W. **2001**: Über den Konzentrationsverlauf wichtiger Inhaltsstoffe von Trauben der Sorten *Rheinriesling*, *Grüner Veltliner* und *Zweigelt* während der Reife des Lesejahres 2000
***Mitteilungen Klosterneuburg* 51: 79-99**

BREITFELLNER, F., SOLAR, S., SONTAG, G. **2002**: Effect of gamma irradiation on flavonoids in strawberries
***Eur. Food Res. Tech.* 215: 28-31**

BREITFELLNER, F., SOLAR, S., SONTAG, G. **2003**: Radiation induced chemical changes of phenolic compounds in strawberries
***Radiation Physics and Chemistry* 67: 497-499**

BREUIL, A.C., ADRIAN, M., PIRIO, N., MEUNIER, P., BESSIS, R., JEANDET, P. **1998**: Metabolism of stilbene phytoalexins by *Botrytis cinerea*: Characterization of a resveratrol dehydrodimer
***Tetrahedron Letters* 39: 537-540**

BREUIL, A.C., JEANDET, P., ADRIAN, M., CHOPIN, F., PIRIO, N., MEUNIER, P., BESSIS, R. **1999**: Characterization of a pterostilbene dehydrodimer produced by laccase of *Botrytis cinerea*
***The American Phytopathological Society* 89: 298-302**

BREITFELLNER, F., SOLAR, S., SONTAG, G. **2002**: Effect of gamma irradiation on flavonoids in strawberries
***Eur. Food Res. Technol* 215: 28-31**

- BRISTOW, P. R. McNICOL, R. J., WILLIAMSON, B. **1986**: Infection of strawberry flowers by *Botrytis cinerea* and its relevance to grey mould development
Ann. Appl. Biol. 109: 545-554
- BULGER, M. A., ELLIS, M. A., MADDEN, L. V. **1987**: Influence of temperature and wetness duration on infection on strawberry flowers by *Botrytis cinerea* and disease incidence of fruit originating from infected flowers
Ecology and Epidemiology 77: 1225-1230
- CARANDO, S., TEISSEDE, P., PASCUAL-MARTINEZ, L., CABANIS J. **1999**: Levels of flavan-3-ols in French wines
J. Agric. Food. Chem. 47: 4161-4166
- CHENG, G. W. AND BREEN P. J. **1991**: Activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and concentrations of anthocyanins and phenolics in developing strawberry fruit
J. Amer. Soc. Hort. Sci. 116: 865-869
- CICHEWICZ, R. H., KOUZI, S. A., HAMANN, M. T. **2000**: Dimerization of resveratrol by the grapevine pathogen *Botrytis cinerea*
J. Nat. Prod. 63. 29-33
- CLIFFORD, M. N., SCALBERT A., **2000**: Ellagitannins- nature, occurrence and dietary burden
Journal of the Science of Food and Agriculture 80: 1118-1125
- CORDENUNSI, B., GENOVESE, M. I., do NASCIMENTO, J. R.O., HASSIMOTTO, N. M. A., dos SANTOS R. J., LAJOLO, F. M. **2005**: Effects of temperature on the chemical composition and antioxidant activity of three strawberry cultivars
Food Chemistry 91: 113-121
- COSTA, G., ANDREOTTI, C., BUCCHI, F., SABATINI, E., BAZZI, C., MALAGUTI, S., RADEMACHER, W. **2001**: Prohexadione-Ca (Apogee): Growth regulation and reduced fire blight incidence in pear
Hort. Science 36: 931-933
- DAAYF, F., SCHMITT, A., AND BÉLANGER, R. R. **1995**: The effects of plant extracts of *Reynoutria sachalinensis* on powdery mildew development and leaf physiology of long english cucumber
Plant Dis. 79: 577-580
- DAAYF, F., SCHMITT, A., AND BÉLANGER, R. R. **1997**. Evidence of phytoalexins in cucumber leaves infected with powdery mildew following treatment with leaf extracts of *Reynoutria sachalinensis*
Plant Physiol. 113:719-727
- DANELUTTE, A. P., LAGO, J.H.G., YOUNG, M.C.M., KATO, M.J. **2003**: Antifungal flavanones and prenylated hydroquinones from *Piper crassinervium* Kunth
Phytochemistry 64/2:555-559
- DANIEL, E. M., KRUPNICK, A. S., HEUR, A. S., BLINZLEWR, Y. H., NIMS, R. W., STONER, G. D. **1989**: Extraction, stability and quantification of ellagic acid in various fruits and nuts
Journal of Food Composition and Analysis 2: 338-349

- de FREITAS, V. AP., GLORIES, Y. **1999**: Concentration and compositional changes of procyanidins in grape seeds and skin of white *Vitis vinifera* varieties
Journal of the Science of Food and Agriculture 79: 1601-1606
- del RIO, J. A., BAIDEZ, A. G., BOTIA, J.M., ORTUNO, A. **2003**: Enhancement of phenolic compounds in olive plants (*Olea europaea* L.) and their influence on resistance against *Phytophthora* sp.
Food Chemistry 83: 75-78
- del RÍO, J.A., GÓMEZ P., BAIDEZ A. G., ARCAS M.C., BOTÍA J.M., ORTUÑO A. **2004**
Changes in the levels of polymethoxyflavones and flavanones as part of the defense Mechanism of *Citrus sinensis* (Cv. Valencia Late) fruits against *Phytophthora citrophthora*
Agricultural and Food Chemistry 52: 1913-1917
- DEIML, B. **2007**: Klonierung und Charakterisierung von Genen der Flavonoidbiosynthese aus Erdbeere (*Fragaria x ananassa*) und der Einfluss von Prohexadion-Ca und Milsana auf die Flavan 3-ol Biosynthese
Dissertation, Technische Universität München-Weihenstephan
- DELGADO R., MARTIN, P., del ALAMO, M., GONZALEZ, M.R. **2004**: Changes in the phenolic composition of grape berries during ripening to vineyard nitrogen and potassium fertilisation rates
Journal of the Science of Food and Agriculture 84: 623-630
- DENG, C., DAVIS, T. M. **2001**: Molecular identification of the yellow fruit colour locus in diploid strawberry
Theor. Appl. Genet. 103: 316-322
- DI VENERE, D., LINSALATA, V., IPPOLITO, A., NIGRO, F., ARCUTI, P., LATTANZIO, V. **1998**: Endogenous phenolics, ripening and susceptibility of strawberry fruits (*Fragaria x ananassa* Duch.) to post harvest diseases
Polyphenols Communications 98 XIXth International Conference on Polyphenols, Lille, France: 459-460
- DOUILLET-BREUIL, A. C., JEANDET P., ADRIAN, M., BESSIS, R. **1999**: Changes in the phytoalexin content of various *Vitis* Spp. in response to ultraviolet-C elicitation
J. Agric. Food Chem. 47: 4456-4461
- DOWNEY, M. O., HARVEY, J. S., ROBINSON, S. P. **2003a**: Synthesis of flavonols and expression of flavonol synthase genes in the developing grape berries of Shiraz and Chardonnay (*Vitis vinifera* L.)
Australian Journal of Grape and Wine Research 9: 110-121
- EIBACH, R. **1999**: Bisherige Erfahrungen mit Regent
Der Deutsche Weinbau 16-17, 34-39
- FERRER, J.L., JEZ, J.M., BOWMAN, M.E., DIXON, R.A., NOEL, J. P. **1999**: Structure of chalcone synthase and the molecular basis of plant polyketide biosynthesis
Nature Structural Biology 6: 775-784
- FERNANDEZ DE SIMON B., PEREZ-ILZARBE J., HERNANDEZ T., GOMEZ-CORDOVES C., ESTRELLA I. **1992**: Importance of phenolic compounds for the characterization of fruit
J. Agric. Food. Chem. 40: 1531-1535

FILIPPONE, M. P., RICCI, J. D., MAMANI de MARCHESE A., FARIAS, R. N., CASTAGNARO, A. **1999**: Isolation and purification of a 316 Da preformed compound from strawberry (*Fragaria x ananassa*) leaves against plants pathogens
FEBS Letters: 115-118

FISCHER, T.C., HALBWIRTH, H., MEISEL, B., STICH, K., FORKMANN, G. **2003**: Molecular cloning, substrate specificity of the functionally expressed dihydroflavonol 4-reductases from *Malus domestica* and *Pyrus communis* cultivars and the consequences for flavonoid metabolism
Archives of Biochemistry and Biophysics 412: 223-231

FOFANA, B., MCNALLY, D.J., LABBE, C., BOULANGER, R., BENHAMOU, N., SEGUIN, A., BELANGER, R. R., **2002**: Milsana-induced resistance in powdery mildew-infected cucumber plants correlates with the induction of chalcone synthase and chalcone isomerase
Physiological and Molecular Plant Pathology 61: 121-132

FORKMANN, G., HELLER, W. **1999**: Biosynthesis of flavonoids
Comprehensive natural products chemistry Vol 1, Elsevier Amsterdam: 714-748

FOSSON, T., RAYYAN, S., ANDERSEN, Ø. M. **2004**: Dimeric anthocyanins from strawberry (*Fragaria x ananassa*) consisting of pelargonidin 3-glucoside covalently linked four flavan-3-ols
Phytochemistry 65: 1421-1428

FUJITA, A., SOMA, N., GOTO-YAMAMOTO, N., SHINDO, H., KAKUTA, T., KOIZUMI, T., HASHIZUME, K. **2005**: Anthocyanidin reductase gene expression and accumulation of flavan-3-ols in grape berry
Am. J. Enol. Vitic. 56: 336-342

FULEKI, T., DA SILVA, J. M. R. **1997**: Catechin and procyanidin composition of seeds from grape cultivars grown in Ontario
J. Agric. Food Chem. 45/4: 1156-1160

GABLER, F.M., SMILANICK, J.L., MANSOUR, M., RAMMING, D.W., MACKEY B.E. **2003**: Correlation of morphological, anatomical and chemical features of grape berries with resistance to *Botrytis cinerea*
Phytopathology 93: 1263-1273

GARCIA-VIQUERA, C., ZAFRILLA P AND F., TOMAS-BARBERAN, A. **1998**: The use of acetone as an extraction solvent for anthocyanins from strawberry fruit
Phytochemical analysis 9: 274-277

GOLDBERG, D. M., TSANG, E., KARUMANCHIRI, A., DIAMANDIS, E. P., SOLEAS, G., NG, E. **1996**: Method to assay the concentrations of phenolic constituents of biological interest in wines
Anal.Chem. 68: 1688-1694

GOTO-YAMAMOTO, N., WAN, G.H., MASAKI, K., KOBAYASHI, S. **2002**: Structure and transcription of three chalcone synthase genes of grapevine (*Vitis vinifera*)
Plant Science 162: 867-872

- GÖTZ, G., FKYERAT, A., METAIS, N., KUNZ, M., TABACCHI, R., PEZET, R., PONT, V. **1999**: Resistance factors to grey mould in grape berries: identification of some phenolics inhibitors of *Botrytis cinerea* stilbene oxidase
***Phytochemistry* 52/5: 759-767**
- GRIEBER M. **2007**: Funktionelle Charakterisierung von Glycosyltransferasen der Erdbeerfrucht (*Fragaria x ananassa*)
Dissertation, Technische Universität München-Weihenstephan
- HALBWIRTH, H., FISCHER, T.C., MEISEL, B., KAMPAN, W., RADEMACHER, W., FORKMANN, G., STICH, K. **2002**: Biochemical and molecular biological investigations with respect to induction of fire blight resistance in apple and pear by transiently altering the flavonoid metabolism with specific enzyme inhibitors
***Acta Hort.* 590: 485-492**
- HALBWIRTH H., PUHL I., HAAS U., JEZIK K., TREUTTER D., STICH K. **2006**: Two-phase flavonoid formation in developing strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruit
***J. Agric. Food Chem.* 54:1479-1485**
- HÄKKINEN S. H., TÖRRÖNEN A. R. **2000**: Content of flavonols and selected phenolic acids in strawberries and *Vaccinium* species: influence of cultivar, cultivation site and technique
***Food Research International* 33: 517-524**
- HAKULINEN, J., SORJONEN, S., JULKUNEN-TIITTO, R. **1999**: Leaf phenolics of three willow clones differing in resistance *Melampsora* rust infection
***Physiologia Plantarum* 105: 662-669**
- HANCOCK, J. F. **1999**: Strawberries
CABI Publishing: Wallingford, United Kingdom
- HERRMANN, K. **1989**: Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods
***Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 28: 315-347**
- HILL G., STELLWAAG-KITTLER, F., HUTH, G., SCHLÖSSER, E. **1981**: Resistance of grapes in different developmental stages to *Botrytis cinerea*
***Phytopath. Z.* 102: 339-340**
- HILT, P., SCHIEBER, A., YILDIRIM, C., ARNOLD, G., KLAIBER, I., CONRAD, J., BEIFUSS, U., CARLE, R. **2003**: Detection of phloridzin in strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.) by HPLC-PDA-MS/MA and NMR spectroscopy
***J. Agric. Food Chem.* 51: 2896-2899**
- HOOS, A., BLAICH, R. **1988**: Metabolism of stilbene phytoalexins in grapevines: Oxidation of resveratrol in single-cell cultures
***Vitis* 27: 1-12**
- HUTH, G. **1980**: Proanthocyanidine als Resistenzfaktoren in vegetativen und generativen Organen von Pflanzen
Dissertation, Justus-Liedig-Universität, Gießen
- ISHIMARU K., OMOTO T., ASAI I., EZAKI K., SHIMOMURA K. **1995**: Taxifolin 3-Arabinoside from *Fragaria x ananassa*
***Phytochemistry* 40:345-347**

- JAAKOLA, L., MÄÄTTÄ, K., PIRTTILÄ, R., KÄRENLAMPI, S., HOHTOLA, A. **2002**: Expression of genes involved in anthocyanin biosynthesis in relation to anthocyanin, proanthocyanidin and flavonols levels during bilberry fruit development
***Plant Physiology* 130: 729-739**
- JEANDET, P., BESSIS, R., GAUTHERON, B. **1991**: The production of resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) by grape berries in different developmental stages
***Am. J. Enol. Vitic.* 42/1:41-46**
- JEANDET, P., SBAGHI, M., BESSIS, R., MEUNIER, P. **1995**: The potential relationship of stilbene (resveratrol) synthesis to anthocyanin content in grape berry skin
***Vitis* 34: 91-94**
- JEANDET, P., DOUILLET-BREUIL, A.C., BESSIS, R., DEBORD, S., SBAGHI, M., ADRIAN, M. **2002**: Phytoalexins from the *Vitaceae*: Biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity and metabolism
***J. Agric. Food. Chem.* 50: 2731-2741**
- JEONG, S. T., GOTO-YAMAMOTO, N., HASHIZUME, K., ESAKA, M. **2005**. Expression of the flavonoid 3'-hydroxylase and flavonoid 3',5'-hydroxylase genes and flavonoid composition in grape (*Vitis vinifera*)
***Plant Science* 170: 61-69**
- JERSCH, S., SCHERER, C., HUTH, G., SCHLÖSSER, E. **1989**: Proanthocyanidins as basis for quiescence of *Botrytis cinerea* in immature strawberry fruits
***Journal of Plant Diseases and Protection*: 365-378**
- KELLER, M., VIRET, O., COLE, M.C. **2003**: *Botrytis cinerea* infection, in grape flowers: defense reaction, latency and disease expression
***Phytopathology* 93/3: 316-322**
- KOBAYASHI, S., ISHIMARU, M., DING, C. K., YAKUSHIJI, H., GOTO, N. **2001**: Comparison of UDP-glucose : flavonoid 3-O-glucosyltransferase (UFGT) gene sequences between white grapes (*Vitis vinifera*) and their sports with red skin
***Plant Sci.*160: 543-550**
- KORTEKAMP, A. 2006: Expression analysis of defence-related genes in grapevine leaves after inoculation with a host and a non-host pathogen
***Plant Physiology and Biochemistry* 44: 58-67**
- KOSAR, M., KAFKAS, E., PAYDAS, S., BASER, K. H. C. 2004: Phenolic composition of strawberry genotypes at different maturation stages
***J. Agric. Food Chem.* 52: 1586-1589**
- KNOTT, R., A. SCHWAB, K. WAHL, SCHOTTDORF W., **1999**: Rotweinsorten in der Prüfung – Die pilztolerante Rebsorte Regent
***Rebe & Wein* 52: 63-66**
- LANGCAKE P., PRYCE R. J. **1976**: The production of resveratrol by *Vitis Vinifera* and their members of the Vitaceae as a response to infection or injury
***Physiol. Plant Pathol.* 9: 77-86**
- LANGCAKE, P., CORNFORD, C.A., PRYCE, R. J. **1979**: Identification of pterostilbene as a phytoalexin from *Vitis vinifera* leaves
***Phytochemistry* 18: 1025-1027**

- LANGCAKE, P. **1981**: Disease resistance of *Vitis* spp. and the production of the stress metabolites resveratrol, Ó-viniferin, á-viniferin, and pterostilbene
Physiol. Plant athol. 18: 213-26
- LISWIDOWATI, M. F., HOHMANN, F., SCHWER, B., KINDL, H. **1991**: Induction of stilbene synthase by *Botrytis cinerea* in cultured grapevine cells
Planta 183: 307-314
- LORENZ, D. H., EICHHORN K. W., BLEI-HOLDER H., KLOSE R., MEIER R., WEBER, E. **1994**: Phänologische Entwicklungsstadien der Weinrebe (*Vitis vinifera* L. ssp. *vinifera*).
Vitic. Enol. Sci. 49: 66-70
- LUNKENBEIN, S., BELLIDO, M.L., AHARONI, A., SALENTIJN, E.M.J., KALDENHOFF, R., COINER, H.A., MUNOZ-BLANCO, J. UND SCHWAB, W. **2006**: Cinnamate metabolism in ripening fruit: Characterization of a UDP-glucose:cinnamate glucosyltransferase from strawberry (*Fragaria x ananassa*)
Plant Physiol. 140:1047-1058.
- MÄÄTTÄ-RIIHINEN, K. R., KAMAL-ELDIN, A., TÖRRÖNEN A. R. **2004**: Identification and quantification of phenolic compounds in berries of *Fragaria* and *Rubus* Species (Family *Rosaceae*)
J. Agric. Food Chem. 52: 6178-6187
- McCLELLAN, W.D., HEWIT, W.B., **1973**: Early *Botrytis* rot of grapes: time of infection and latency of *Botrytis cinerea* Pers. in *Vitis vinifera* L.
Phytochemistry 58: 33-41
- MASNYL, A., WIESLAW, M., ZURAWICZ, E. **2005**: Combining ability analysis of fruit yield and fruit quality in ever bearing strawberry cultivars using an incomplete diallel cross
Journal of Fruit and Ornamental Plant Research1: 5-17
- MARBACH, I., HAREL.E., MAYER, A.M. **1984**: Molecular properties of extracellular *Botrytis cinerea* laccase
Phytochemistry 23: 2713-2717
- MEIER, U., GRAF H., HACK H., HESS M., KENNEL W., KLOSE R., MAPPES D., SEIPP D., STAUSS R., STREIF J., VAN DEN BOOM T. **1994**: Phänologische Entwicklungsstadien des Kernobstes (*Malus domestica* Borkh. und *Pyrus communis* L.), des Steinobstes (*Prunus*-Arten), der Johannisbeere (*Ribes*-Arten) und der Erdbeere (*Fragaria x ananassa* Duch.)
Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes 46: 141-153
- MICHALEK, S., KLEBEL, C., TREUTTER, D. **2005**: Stimulation of phenylpropanoid biosynthesis in apple (*Malus domestica* Borkh.) by abiotic elicitors
European Journal of Horticultural Science 70: 116-120
- MIROŠEVIĆ, N 1993: Vinogradarstvo
Matica hrvatska, Nakladni zavod Globus, Zagreb
- MOYANO, E, PORTERO-ROBLES, I, MEDINA-ESCOBAR, N, VALPUESTA, V, MUÑOZ-BLANCO, J, CABALLERO, J. L. **1998**: A fruit-specific putative dihydroflavonol 4-reductase gene is differentially expressed in strawberry during the ripening process
Plant Physiol. 1172: 711-716

MULLEN, W., MCGINN, J., LEAN, M. E. J., MACLEAN M. R., GARDNER, P., DUTHIE, G. G., YOKOTA, T., CROZIER, A. **2002**: Ellagitannins, flavonoids and other phenolics in red raspberries and their contribution to antioxidant capacity and vasorelaxation properties
J. Agric. Food Chem. 50: 5191-5196

MULLEN, W., YOKOTA, T., LEAN, M. E. J., CROZIER, A. **2003**: Analysis of ellagitannins and conjugates of ellagic acid and quercetin in raspberry fruits by LC-MS
Phytochemistry 64: 617-624

NAUMANN, W. D., SEIPP D. **1989**: Erdbeeren
Ulmer-Verlag, Stuttgart

ORTUÑO, A., BÁIDEZ, P., GÓMEZ, M.C., ARCAS, I., PORRAS, A., GARCÍA-LIDÓN A., DEL RÍO, J. A. **2006**: *Citrus paradisi* and *Citrus sinensis* flavonoids: Their influence in the defence mechanism against *Penicillium digitatum*
Food Chemistry 98/2:351-358

OSZMIANSKI, J., RAMOS, T., BOURZEIX, M. **1988**: Fractionation of phenolic compounds in red wine
Am. Journal Enol. Vitic. 39: 259-262

OSZMIANSKI, J., LEE, Y., **1990**: Isolation and HPLC determination of phenolic compounds in red grapes
Am. Journal Enol. Vitic. 41/3: 204-206

PENA-NEIRA, A., DUENAS, M., DUARTE, A., HERNANDEZ, T., ESTRELLA, I., LOYOLA, E. **2004**: Effects of ripening and of plant vegetative vigor on the phenolic compositions of grapes (*Vitis vinifera* L.) cv. Cabernet Sauvignon in the Maipo Valley (Chille)
Vitis 43/2: 51-57

PETEREK, S. **2004**: Phenolische Inhaltsstoffe der Birne und ihre Bedeutung in der Resistenz gegen den Feuerbrand
Dissertation, Technische Universität München-Weihenstephan

PEZET, R. **1998**: Purification and characterization of a 32-kDa laccase-like stilbene oxidase produced by *Botrytis cinerea* Pers.:Fr.
Microbiology Letters 167: 203-208

PEZET, R., VIRET, O., PERRET, C., TABACCHI, R. **2003a**: Latency of *Botrytis cinerea* and biochemical studies during growth and ripening of two grape berry cultivars, respectively susceptible and resistant to grey mould
Journal of Phytopathology 151: 208-214

PEZET, R., PERRET, C., JEAN-DENIS, J.B., TABACCHI, R., GINDRO, K., VIRET, O. **2003b**: ϵ -Viniferin a resveratrol dehydrodimer one of the major stilbenes synthesized by stressed grapevine leaves
J. Agric. Food Chem. 51: 5488-5492

PEZET, R., GINDRO, K., VIRET, O., RICHTER, H. **2004**: Effects of resveratrol, viniferins and pterostilbene on *Plasmopara viticola* zoospore mobility and disease development
Vitis: 43:145-148

- PFEIFFER J., KÜHNEL C., BRANDT J., DUY D., PUNYASIRI P., FORKMANN G., FISCHER T. C. **2006**: Biosynthesis of catechins by leucoanthocyanidin 4-reductases (LAR) and anthocyanidinreductases (ANR) in leaves of grape (*Vitis vinifera*), apple (*Malus x domestica*) and other crops
Plant Physiology and Biochemistry 44: 323-334
- PFEIFFER J. 2007: Phenylpropanoidbiosynthese und Resistenz bei Weinreben (*Vitis vinifera* L.)
Dissertation, Technische Universität München-Weihenstephan
- POUR NIKFARDJAM, M. S., PATZ, C.D., KAUER, R., SCHULTZ, H., DIETRICH, H. **1999**: A modified HPLC method to detect salicylic acid in must and wine after its application in the field to induce fungus resistance
Vitis 38/4: 179-182
- POUR NIKFARDJAM, M.S. **2001**: Polyphenole in Weißweinen und Traubensäften und ihre Veränderung im Verlauf der Herstellung
Dissertation, Universität Giessen
- PRYCE, R.J., LANGCAKE, P. **1977**: alpha-Viniferin: An antifungal resveratrol trimer from grapevines
Phytochemistry 16: 1452-1454
- PUHL, I., STADLER, F., TREUTTER, D. 2008: Alterations of flavonoid biosynthesis in young grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaves, flowers and berries induced by the dioxygenase inhibitor Prohexadione-Ca
J. Agric. Food Chem. 56 (7): 2498–2504
- RADEMACHER, W. **2000**: Growth retardants: effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways
Plant Mol. Biol. 51: 501-31
- REVILLA, E., RYAN, J.M. **2000**: Analysis of several phenolic compounds with potential antioxidant properties in grape extracts and wines by high-performance liquid chromatography–photodiode array detection without sample preparation
Journal of Chromatography A 881:461-469
- RITTER, G. **1994**: Die Bedeutung der phenolischen Saft- und Weinhaltstoffe während der Verarbeitung von Äpfeln, Speierling und weißen Trauben – Der Einfluss moderner Verfahrenstechnologie auf die Qualität des Endproduktes.
Dissertation, Universität Giessen
- ROLDAN, A., PALACIOS, V., CARO, I., PEREZ, L. **2003**: Resveratrol content of *Palomino fino* Grapes: Influence of vintage and fungal infection
J.Agric.Food Chem. 51: 1464-1468
- RÖMMELT, S., PLAGGE, J., TREUTTER, D., ZELLER, W. **1999a**: Untersuchungen zur Bekämpfung des Feuerbrandes (*Erwinia amylovora*) an Äpfel mit Gesteinsmehlpräparaten und anderen alternativen Präparaten
Gesunde Pflanzen 51: 72-74
- RÖMMELT, S., TREUTTER, D., SPEAKMAN, J.B. AND RADEMACHER, W. **1999b**. Effects of prohexadione-Ca on the flavonoid metabolism of apple with respect to plant resistance against fire blight
Acta Hort. 489:359-364

- RÖMMELT S. **2002**: Beteiligung phenolischer Verbindungen an der induzierten Resistenz von Apfel (*Malus domestica*) gegen Feuerbrand (*Erwinia amylovora*)
Dissertation, Technische Universität München-Weihenstephan
- RÖMMELT, S., FISCHER, T. C., HALBWIRTH, H., PETEREK, S., SCHLANGEN, K., SPEAKMAN, J. -B., TREUTTER, D., FORKMANN, G., STICH, K. **2003a**: Effect of dioxygenase inhibitors on the resistance-related flavonoid metabolism of apple and pears: chemical, biochemical and molecular biological aspects
Europ. J. Hort. Sci. 68/3:129-136
- RÖMMELT, S., ZIMMERMANN, N., RADEMACHER, W., TREUTTER, D. **2003b**: Formation of novel flavonoids in apple (*Malus x domestica*) treated with the 2-oxoglutarate-dependet dioxygenase inhibitor prohexadione-Ca
Phytochemistry 64: 709-716
- SBAGHI, M., JEANDET, P., BESSIS, R., LEROUX, P. **1996**: Degradation of stilbene phytoalexins in relation to the pathogenicity of *Botrytis cinerea* to grapevines
Plant Pathology 45: 139-144
- SCALBERT, A. **1991**: Antimicrobial properties of tannins
Phytochemistry 30: 3875-3883
- SCHANZ, S., SCHRÖDER G., SCHRÖDER, J. **1992**: Stilbene synthase from Scots pine (*Pinus sylvestris*)
FEBS Letters 313: 71-74
- SCHERER, C. **1982**: Rolle von Proanthocyanidinen bei der Stadienresistenz von Erdbeerfrüchten gegenüber *Botrytis cinerea* Pers.
Dissertation, Universität Gießen
- SCHÖPPNER, A., KINDL, H. **1984**: Purification and properties of a stilbene synthase from induced cell suspension of peanut
Journal of Biological Chemistry 259: 6806-6811
- SCHRÖDER, G., BROWN, J.W.S., SCHRÖDER, J. **1988**: Molecular analysis of resveratrol synthase: cDNA, genomic clones and relationship with chalcone synthase.
European Journal of Biochemistry 172, 161-169
- SCHWAB, A., KNOTT R. **2005**: Informationen zu klassischen weißen und roten Rebsorten
Broschüre der Bayerischen Landesanstalt für Weinbau und Gartenbau
- SCHULTZ, T. P., HUBBARDJR, T. F., JIN, L., FISHER, T. H., NICHOLAS, D. D. **1990**: Role of stilbenes in the natural durability of wood: Fungicidal structure-activity relationships
Phytochemistry 29: 1501-1507
- SEERAM, N. P., LEE, R., SCHEULLER, H. S., HEBER, D. **2006**: Identification of phenolic compounds in strawberries by liquid chromatography electrospray ionization mass spectroscopy
Food Chemistry 97: 1-11
- SNYDER, B.A., NICHOLSON, R.L. **1990**: Synthesis of phytoalexins in *Sorghum* as a site specific response to fungal ingress
Science 248/4963: 1637-1639

- SPARVOLI, F., MARTIN C., SCIENZA, A., GAVAZZI A., TONELLI, C. **1994**: Cloning and molecular analysis of structural genes involved in flavonoid and stilbene biosynthesis in grape (*Vitis vinifera* L.)
***Plant Molecular Biology* 24: 743-755**
- SOUQUET, J.M., CHEYNIER, V., BROSSAUD, F., MOUTOUNET, M. 1996: Polymeric proanthocyanidins from grape skins
***Phytochemistry* 43: 509-512**
- STADLER, F. 2006: Der Einfluss von Bioregulatoren auf den Phenolstoffwechsel in Weintrauben (*Vitis vinifera* L.) während der Fruchtentwicklung
Diplomarbeit, Technische Universität München-Weihenstephan
- STEIN, U., BLAICH, R. **1985**: Untersuchungen über Stilbenproduktion und Botrytis anfälligkeit bei *Vitis*-Arten
***Vitis* 24: 75-87**
- STRISSEL, T. 2004: Induktion der Flavonoidbiosynthese bei Apfel (*Malus domestica*) in Hinblick auf induzierte Resistenz gegenüber dem Erreger von Schorf (*Venturia inaequalis*)
Dissertation, Technische Universität Wien
- TANNER G. J. FRANCKI K. T., ABRAHAMS S., WATSON J. M., LARKIN P. J., ASHTON A. R., **2003**: Proanthocyanidin biosynthesis in plants: Purification of legume leucoanthocyanidin reductase and molecular cloning of its cDNA
***Journal of Biological Chemistry* 278: 31647-31656**
- TÖRRÖNEN, R., MÄÄTTÄ, K. **2002**: Bioactive substances and health benefits of strawberries
***Acta Hort.* 567: 797-803**
- TREUTTER, D., SANTOS-BUELGA, C., GUTMANN, M., KOLODZIEJ, H. **1994**: Identification of flavan-3-ols and procyanidins by high-performance liquid chromatography and chemical reaction detection
***J. Chromatogr.* 667: 290-297**
- TREUTTER, D. **2005**: Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis
***Plant Biology* 7: 581-591**
- TROUSDALE, E.K., SINGLETON, V.L. **1983**: Astilbin and engeletin in grape and wine
***Phytochemistry* 22: 619-620**
- VANETTEN, H.D., MATTHEWS, D.E., MATTHEWS, P.S. **1989**: Phytoalexin detoxification: Importance for pathogenicity and practical implications
***Annu. Rev. Phytopathol.* 27: 143-146**
- VARGA, A. **2005**: Einfluss von Prohexadion-Ca und Milsana auf Polyphenolgehalt und *Botrytis*-Befall von Erdbeeren
Diplomarbeit, Technische Universität München-Weihenstephan
- VERSARI, A., BIESENBRUCH, S., BARBANTI, D., FARNELL, P.J., GALASSI, S. **1997**: Effects of pectolytic enzymes on selected phenolic compounds in strawberry and raspberry juices
***Food Research International* 30: 811-817**

- VIRET, O. **2004**: *Botrytis cinerea* infection of grape flowers: Light and electron microscopical studies of infection sites
Phytopathology 94:850-857
- VRHOVŠEK, U. **1988**: Extraction of hydroxycinnamoyltartaric acids from berries of different grape varieties
J. Agric. Food. Chem. 46: 4203-4208
- WATERHOUSE, A.L., LAMUELA-RAVENTOS R. M. **1994**: The occurrence of piceid, a stilben glucoside in grape berries
Phytochemistry 37: 571-573
- WATERHOUSE, A. L. **2002**: Wine phenolics
Annals New York Academy of Sciences 957: 21-36
- WEN, P. F., CHEN, J. Y., KONG, W. F., PAN, Q. H., WAN, S. B., HUANG, W. D. **2005**: Salicylic acid induced the expression of phenylalanine ammonia-lyase gene in grape berry
Plant Science 169: 928-934
- WENZEL, K., DITTRICH, H. H., HEIMFARTH, M. **1987**: Die Zusammensetzung der Anthocyane in den Beeren verschiedener Rebsorten
Vitis 26: 65-78
- WELLMANN, F. M., GRIESSER, W., SCHWAB, S., MARTENS, W., EISENREICH, MATERN, U., LUKAČIN L. **2006**: Anthocyanidin synthase from *Gerbera hybrida* catalyzes conversion of (+)-catechin to cyanidin and a novel procyanidin
FEBS Letters 580: 1642-1648
- WILINER, M. R., PIROVANI, M. E., GÜEMES, D. R. **2003**: Ellagic acid in strawberries of different cultivars and ripening stages
Journal of Science of Food and Agriculture 83: 842-845
- WINKEL-SHIRLEY, B. **2001**: Flavonoid biosynthesis. A colourful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology
Plant Physiol. 126: 485-493
- WÜRDIG G., R., WOLLER, **1989**: Chemie des Weines
Handbuch der Lebensmitteltechnologie, Verlag Eugen Ulmer
- XIE, D.Y., DIXON, R.A. **2005**: Proanthocyanidin biosynthesis-still more question than answer?
Phytochemistry 66: 2127-2144
- YAMAMOTO, M., NAKATSUKA, S., OTANI, H., KOHMOTO, K., NISHIMURA, S., **2000**: (+)-Catechin acts as an infection-inhibiting factor in strawberry leaf
Phytopathology 90/6: 595-599
- YODER, K.S., MILLER, S.S., BYERS, R.E. **1999**: Suppression of fire blight in apple shoots by prohexadione-calcium following experimental and natural inoculation Proc. Of the Workshop Metabolism, Action and use of BAS-125W in apples held at the 94th ASHS annual Conference Salt Lake City, Utah, 26. July 1997
Hort. Science 34: 1202-1204

YAMAGUCHI, T., KUROSAKI, F., SUH, D-Y., SANKAWA, U., NISHIOKA, M., AKIYAMA, T., SHIBUYA, M., EBIZUKA, Y. **1999**: Cross-reaction of chalcone synthase and stilbene synthase overexpressed in *Escherichia coli*
***FEBS Letters* 460: 457-461**

YODER, K.S., MILLER, S.S., BYERS, R.E. **1999**: Suppression of fireblight in apple shoots by prohexadione-calcium following experimental and natural inoculation Proc. Of the Workshop Metabolism, Action and use of BAS-125W in apples held at the 94th ASHS annual Conference Salt Lake City, Utah, 26. July 1997
***Hort. Science* 34: 1202-1204**

ANHANG

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben noch zu weiteren Veröffentlichungen beigetragen:

HALBWIRTH H., PUHL I., HAAS U., JEZIK K., TREUTTER D., STICH K. **2006**: Two-phase flavonoid formation in developing strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruit
***Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:1479-1485**

WULF J.S., RÜHMANN, S., REGOS, I., PUHL, I., TREUTTER, D. & ZUDE, M. **2008**: Non-destructive application of laser-induced fluorescence spectroscopy for quantitative analyses of phenolic compounds in strawberry fruits (*Fragaria x ananassa*)
***Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 2875–2882**

Two-Phase Flavonoid Formation in Developing Strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) Fruit

HEIDRUN HALBWIRTH,[†] IVA PUHL,[§] URSULA HAAS,[†] KAROLINE JEZIK,[‡]
 DIETER TREUTTER,[§] AND KARL STICH^{*,†}

Technische Universität Wien, Institut für Verfahrenstechnik, Umwelttechnik und Technische Biowissenschaften, A-1060 Vienna, Austria, Technische Universität München Weihenstephan, Fachgebiet Obstbau, D-85350 Freising, Germany, and Universität für Bodenkultur Wien, Institut für Garten-, Obst-, und Weinbau, A-1180 Vienna, Austria

Flavonoids are important secondary metabolites in strawberry as they fulfill a wide variety of physiological functions. In addition, they are beneficial for human health. Previous studies have shown for selected enzymes from the flavonoid pathway that flavonoid biosynthesis shows two peaks during fruit development. We provide optimized protocols for the determination of the activities of the key flavonoid enzymes: phenylalanine ammonia lyase, chalcone synthase/chalcone isomerase, flavanone 3-hydroxylase, dihydroflavonol 4-reductase, flavonol synthase, flavonoid 3-*O*-glucosyltransferase, and flavonoid 7-*O*-glucosyltransferase. Using these protocols we were able to demonstrate two distinct activity peaks during fruit ripening at early and late developmental stages for all enzymes with the exception of flavonol synthase. The first activity peak corresponds to the formation of flavanols, while the second peak is clearly related to anthocyanin and flavonol accumulation. The results indicate that flavonoid 3-*O*-glucosyltransferase activity is not essential for redirection from flavanol to anthocyanin formation in strawberry.

KEYWORDS: Strawberry (*Fragaria* × *ananassa*); fruit ripening; fruit color; flavonoid concentrations; flavonoid enzymes; anthocyanins; flavan 3-ols (catechin, epicatechin, and derived proanthocyanidins); flavanols

INTRODUCTION

Strawberry is an important crop in temperate regions such as Central Europe. The attractive fruits are favored for their excellent taste and are health promoting due to their richness in vitamins, minerals, and antioxidative compounds (1–3). Fruit color is one of the most important quality characteristics for strawberries with respect to human consumption. It is caused by derivatives of the anthocyanidins pelargonidin (predominant pigment, bright red colors, 4'-hydroxylation) and cyanidin (minor pigment, dark red colors, 3',4'-hydroxylation) (4–8). Additionally, flavanols are formed (Figure 1), which serve as copigments for fruit coloration. In particular, quercetin (3',4'-hydroxylation) and kaempferol (4'-hydroxylation) derivatives are described in strawberry (8–13). Interestingly, strawberry fruits produce another prevalent group of flavonoids during early stages of fruit development. In unripe fruits, large amounts of the 3',4'-hydroxylated flavan 3-ols catechin, epicatechin, and derived proanthocyanidins are accumulated (Figure 1) (14, 15). They are beneficial with respect to their antioxidative capacity

(16–18) and presumably contribute to the restriction of plant pathogens such as gray mold (*Botrytis cinerea*), which infects the strawberry flower but is quiescent until fruit ripening is almost completed (19–22). However, the presence of proanthocyanidins in fruits results in an astringent taste, and catechin may cause undesirable browning due to an enzyme-mediated reaction (16).

Previously it has been reported that the activity of phenylalanine ammonia lyase (PAL) shows two peaks during strawberry fruit development (23). Similar observations were made in dihydroflavonol 4-reductase (DFR) gene expression studies during fruit ripening (24). It was assumed that this could be related to the different functions of the different flavonoid classes formed during early and late fruit development. PAL is a key enzyme located at the interface between primary and secondary metabolism. It catalyzes the conversion of the amino acid phenylalanine into cinnamic acid, which is an important intermediate in the biosynthesis of flavonoids (25). However, derivatives of cinnamic acids are the precursors for a broad variety of secondary metabolites (e.g. cinnamic acid derivatives, flavonoids, lignin, coumarins, stilbenes), and the activity of PAL alone therefore provides only limited information with respect to flavonoid formation. To get a more comprehensive insight into the changes occurring in flavonoid metabolism during

* To whom correspondence should be addressed. Tel: +43-1-5880117320. Fax: +43-1-5880117399. E-mail: kstich@mail.zserv.tuwien.ac.at.

[†] Technische Universität Wien.

[§] Technische Universität München Weihenstephan.

[‡] Universität für Bodenkultur Wien.

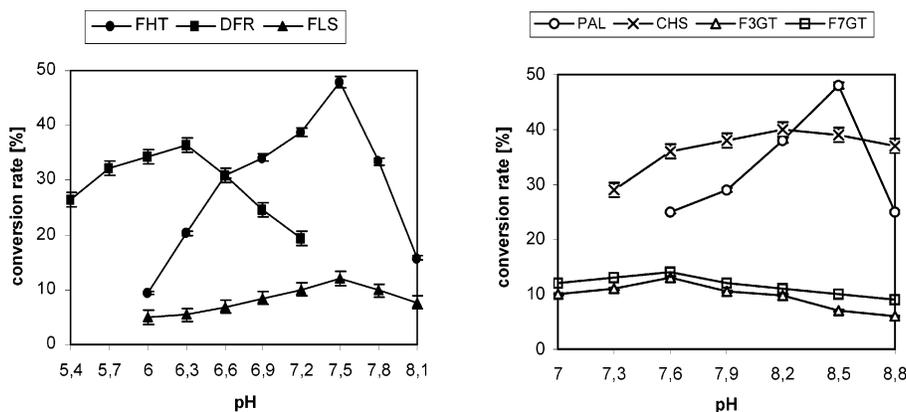


Figure 2. pH-optima of selected enzymes from the flavonoid pathway in strawberry fruits.

30 min. After 5 min centrifugation at 13000g, 1 mL of the supernatant was mixed with 1 mL of 4 N HCl and incubated for 60 min at 90 °C. Insoluble residues were removed by centrifugation, the supernatant was diluted 1:15, and absorption at 520 nm was measured. Anthocyanin contents were calculated as mg pelargonidin/g dry weight.

Determination of the Polyphenol Content. Total phenolic content was obtained as a sum of all compounds detected at 280 nm. Not-identified compounds were calculated as gallic acid, flavonols as quercetin, and anthocyanins as pelargonidin.

Determination of Sugar Content. HPLC–sugar analysis was performed on a Dionex BioLC system (Idstein, Germany) equipped with a GP 40 gradient pump, an electrochemical detector ED 40, and a 250 mm × 4 mm analytical Carbo Pac-100 column (Dionex, Idstein, Germany). The sugars were eluted with 1 mL/min 10 mM NaOH within 20 min. For quantification, the sum of the peak areas was calculated as glucose.

Buffers Used. The following buffers were used for the enzyme assays. Buffer 1 (PAL assays): 0.1 M H₃BO₃ + 0.4% Na-ascorbate, pH 8.5. Buffer 2 (CHS assays): 0.1 M Tris/HCl + 0.4% Na-ascorbate, pH 8.25. Buffer 3 (FHT and FLS assays): 0.1 M Tris/HCl + 0.4% Na-ascorbate, pH 7.5. Buffer 4 (DFR assays): 0.1 M KP_i + 0.4% Na-ascorbate, pH 6.3. Buffer 5 (GT assays): 0.1 M KP_i + 0.4% Na-ascorbate, pH 7.5.

Enzyme Preparations. Shock-frozen fruits were ground in a mill. A total of 0.5 g of the fine powder, 0.25 g of quartz sand, 0.25 g of Polyclar AT, and 3 mL of 0.1 M Tris/HCl (containing 0.4% Na-ascorbate, pH 7.25) were homogenized in a mortar. The homogenate was centrifuged for 10 min at 4 °C and 10000g. To remove low molecular compounds, 400 μL of the supernatant was passed through a gel chromatography column (Sephadex G25 medium). Protein content was determined by a modified Lowry procedure (29) using crystalline BSA as a standard. All data represent an average of at least three independent experiments.

Enzyme Assays. In a final volume of 100 μL: the PAL assay contained 40 μL of enzyme preparation (2.4–8.1 μg total protein), 5 μL of [¹⁴C]-phenylalanine (0.063 nmol, 548 Bq), and 55 μL of buffer 1; the CHS/CHI assay contained 40 μL of enzyme preparation (2.4–8.1 μg total protein), 5 μL of [¹⁴C]-malonyl-CoA (1.5 nmol, 1300 Bq), 5 μL of *p*-coumaroyl-CoA (1.0 nmol), and 50 μL of buffer 2; the FHT assay contained 0.046 nmol of [¹⁴C]-naringenin (108 Bq), 30 μL of enzyme preparation (2.1–6.6 μg total protein), 5 μL of 3.48 mM 2-oxoglutarate, 5 μL of 2.01 mM FeSO₄·7 H₂O, and 80 μL of buffer 3; and the FLS assay contained 0.046 nmol of [¹⁴C]-dihydrokaempferol (108 Bq), 40 μL of enzyme preparation (2.8–8.8 μg total protein), 5 μL of 3.48 mM 2-oxoglutarate, 5 μL of 2.01 mM FeSO₄·7 H₂O, and 50 μL of buffer 3.

In a final volume of 50 μL: the DFR assay contained 0.046 nmol of [¹⁴C]-dihydroquercetin (108 Bq), 15 μL of enzyme preparation (1–3.6 μg total protein), 5 μL of 5.21 mM NADPH, and 35 μL of buffer 4; and the GT assay contained 2.5 μL of [¹⁴C]-UDPG (0.206 nmol, 2300 Bq), 15 nmol of quercetin (dissolved in 2.5 μL of ethylene glycol monomethyl ether), 25 μL of enzyme preparation (1.8–5.5 μg total protein), and 35 μL of buffer 5.

The assays were incubated for 30 min at 30 °C, with the exception of DFR, which was incubated for 15 min at 30 °C. PAL and CHS/CHI assays were stopped with 200 μL of ethyl acetate and 10 μL of acetic acid, and the amounts of product formed were determined on a scintillation counter. FHT, DFR, and FLS assays were terminated by addition of 70 μL of ethyl acetate and 10 μL of acetic acid. To FLS assays were also added 10 μL of 0.1 mM EDTA before the extraction. The organic phases were transferred to a precoated cellulose plate (Merck, Germany). After developing the TLC plates in chloroform/acetic acid/H₂O (10:9:1, v/v/v), conversion rates were determined with a TLC linear analyzer. GT assays were terminated by addition of 10 μL of acetic acid and 30 μL of methanol. The mixture was chromatographed on Schleicher and Schüll 2043b paper using 30% acetic acid as solvent system. The zones containing the labeled products were cut out, and radioactivity was quantified on a scintillation counter. All products were identified as described using authentic substances (26, 32).

RESULTS AND DISCUSSION

Only a few protocols are available in the literature for the determination of flavonoid enzymes from strawberry fruits (23, 30, 31). Therefore, the assays previously described for apple leaves (32) were adapted to the strawberry fruit tissues. The pH-optima were determined for all enzymes of interest: PAL, CHS/CHI, FHT, DFR, FLS, F3GT, and F7GT (**Figure 2**). Leucoanthocyanidin reductase (LAR), anthocyanidin synthase (ANS), and anthocyanidin reductase (ANR) were not included, since the instability of their substrates hampers reliable comparative studies. All enzyme assays were optimized with respect to temperature, incubation time, and protein concentration (data not shown).

Highest specific activities for CHS/CHI were determined at S1 (**Figure 3**). During fruit development, the activity strongly decreased and reached a minimum at S3–S5. At S6, the activity increased again, but showed rather low activities compared to S1 and S2. In contrast, FLS activity could not be detected in the early stages but reached a distinct maximum at S5. All other enzymes investigated clearly showed two activity peaks at S2 and S6 (**Figure 3**). For DFR and F3GT, the peaks at S2 and S6 showed almost the same size, whereas PAL had a distinct maximum at S2. The two activity peaks observed for most enzymes indicate a two-phase flavonoid biosynthesis during fruit development. The specific activities determined correspond to the high phenolic contents present in the young fruits, in particular to catechin, epicatechin, and proanthocyanidins. The respective time courses are given in **Figure 4**, where the contents are expressed as mg/g dry weight, and **Figure 5**, where the total amount per fruit was calculated, which is a result of fruit growing, product formation, and product turnover. During fruit

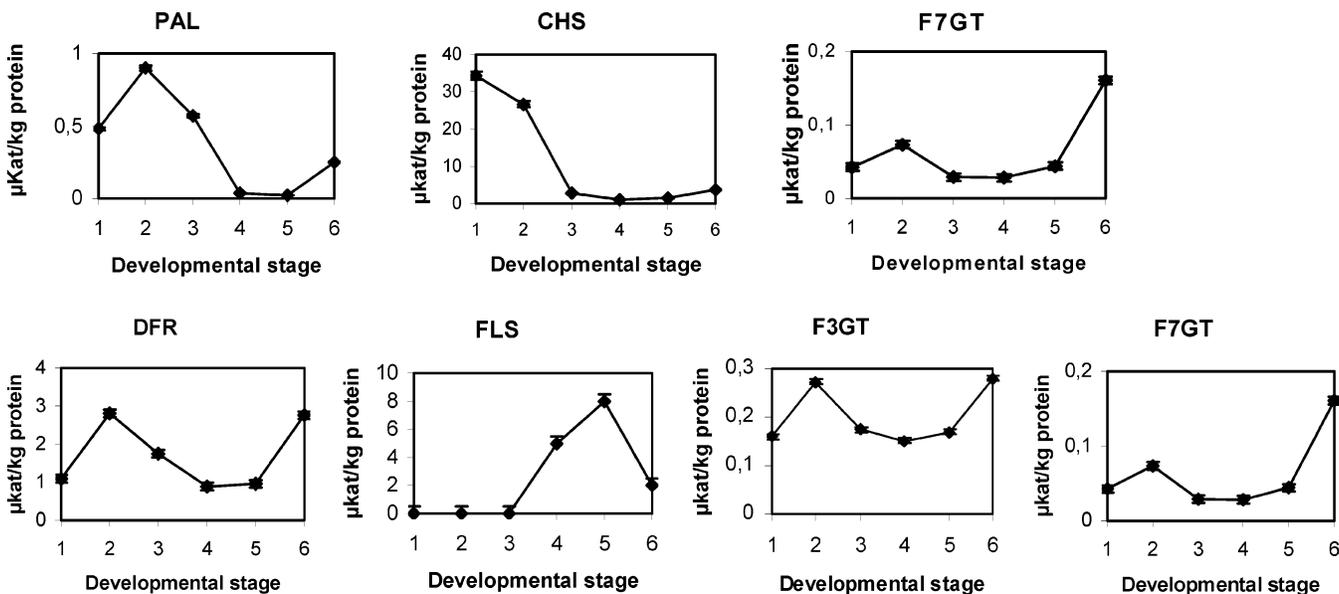


Figure 3. Specific activities [$\mu\text{kat}/\text{kg}$] of selected enzymes from the flavonoid pathway during fruit development.

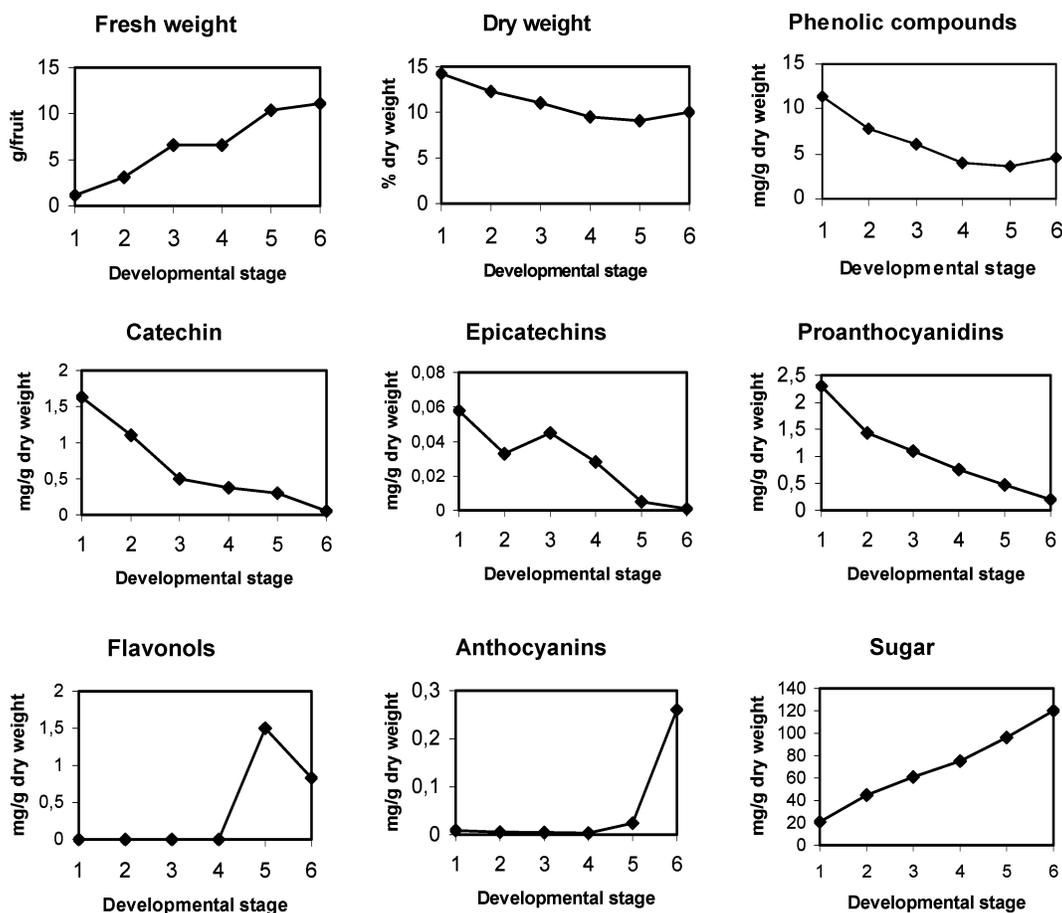


Figure 4. Changes of selected polyphenol and sugar concentrations (in mg/g dry weight) during fruit development.

ripening, the concentrations of flavan 3-ols expressed per mg/g dry weight decreased continuously, while anthocyanins, flavonols, and sugar contents increased simultaneously. Thus, there is an obvious redirection of flavonoid biosynthesis from flavan 3-ol to anthocyanin formation during the complex developmental process of fruit ripening. Since the specific enzyme activities, which are based on the protein content, also consider the increase of the fruit weight during fruit development, the temporal correlation of enzyme activities and product accumulation is

reflected by comparison of the time courses in **Figures 3** and **5** rather than in **Figures 3** and **4**.

The different polyphenol classes formed during early and late fruit development seem to fulfill different important functions. In unripe fruits, the presence of astringent flavan 3-ols (**Figure 4**) may contribute to herbivore deterrence along with green color, high acid concentration, and tissue firmness (33–35). When seeds mature, attraction of harvesting species is attained by the accumulation of the red colored anthocyanins in combination

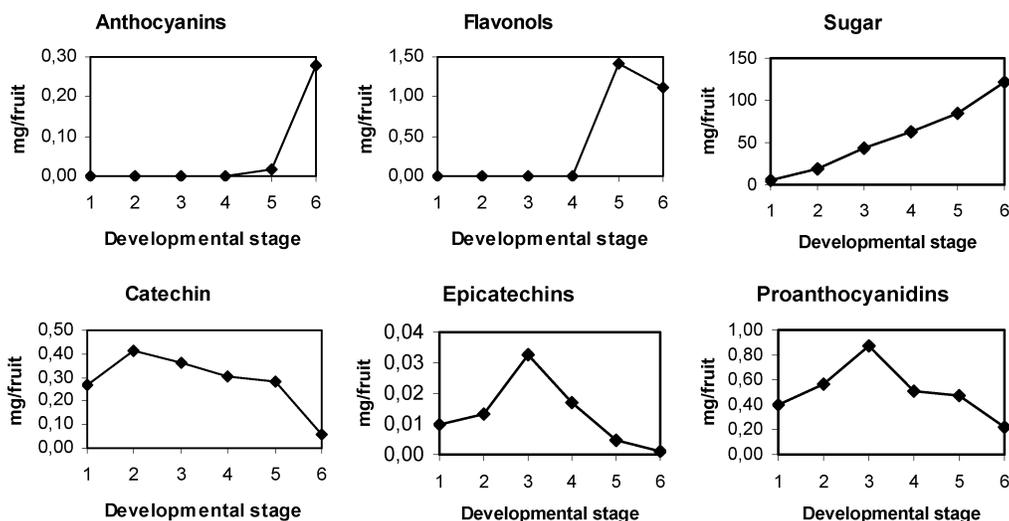


Figure 5. Accumulation of selected polyphenols and sugar during fruit development.

with aroma volatiles, increasing sugar concentrations (Figure 4), and a progressive decrease in tissue firmness (33–35). Formation of flavonols slightly precedes the accumulation of anthocyanins (Figure 4), since the uncolored flavonols are important copigments contributing much to fruit and flower coloration by stabilizing the rather unstable anthocyanin chromophore (33, 36).

Interestingly, unripe fruits of strawberry and grapevine do not suffer from gray mold although they may already harbor the pathogen without any visible disease development (37–39). The involvement of multiple parameters is assumed for the observed pathogen tolerance in the quiescent stage, which is not yet fully understood. The assumption that flavanols may play an important part (39, 40) is supported by our observations of high flavan-3-ol concentrations only in the early developmental stages, which are based on highest specific activities of the related flavonoid enzymes.

There are indications that two-phase flavonoid formation during fruit development may occur also in other crops. For raspberry it could be shown that two different genes encoding PAL are expressed during fruit ripening, both at the earliest and at late developmental stages (34). Similar reports are available on grape, where a distinctly reduced expression of seven genes of the anthocyanin pathway was observed between 4 and 8 weeks post-flowering (41). However, Waters et al. (42) have recently shown a concerted increase in flavonoid gene expression in young grapes but could not observe a similar boost in the late stages during anthocyanin formation. In contrast, expression of genes encoding PAL, CHS, FHT, DFR, and ANS could be observed only in bilberry flowers and in ripening but not in young berries (43).

Red grapes (*Vitis vinifera*) represent a more complex system since anthocyanins are formed only in the berry skin (44, 45). The presence or absence of F3GT seems to be a key factor for the formation of red or white grapes (41). Furthermore, it is assumed that in red grapes mainly the F3GT activity is decisive for the redirection of flavonoid biosynthesis from proanthocyanidin to anthocyanin formation during fruit ripening (41, 46, 47). The first biosynthetic steps catalyzed by CHS, CHI, FHT, and DFR are common to the formation of both types of flavonoids, but subsequent biosynthetic pathways are most divergent (Figure 1). Whereas the synthesis of catechin and epicatechin is performed via the action of LAR or ANS/ANR in the unripe fruit, the colored anthocyanins of the ripening fruit are produced by ANS/ F3GT (Figure 1). However, Given et

al. (35) reported a parallel course of PAL and F3GT in developing strawberry fruits, although in this study enzyme activities were generally low in the early stages. In our studies, F3GT activity in the early stages was comparable to the late stage (Figure 3). Thus, F3GT does not seem to be the key factor in strawberry for the redirection of flavonoid biosynthesis during fruit ripening as suggested for grape.

It is obvious that the two-phase flavonoid biosynthesis has to be tightly regulated with respect to the developmental stages of the fruit. It may be assumed that different types of transcription factors are involved in the regulation as was shown for other plants (48). The regulation could act on only one gene or a few genes or, in the other extreme case, there could be two completely different sets of genes for all steps of the pathway coding for the respective early and late biosynthetic enzymes. Further work on this topic is in progress.

ABBREVIATIONS USED

CHS/CHI, chalcone synthase/chalcone isomerase; DFR, dihydroflavonol 4-reductase; FHT, flavanone 3-hydroxylase; FLS, flavonol synthase; F3GT, flavonoid 3-*O*-glucosyltransferase; F7GT, flavonoid 7-*O*-glucosyltransferase; GT, glucosyl transferase; PAL, phenylalanine ammonia lyase; UDPG, uridine diphospho glucose.

LITERATURE CITED

- Prior, R. L.; Cao, G. Flavonoids: Diet and health relationships. *Nutr. Clin. Care* **2000**, *3*, 279–288.
- Meyers, K. J.; Watkins, C. B.; Pritts, M. P.; Liu, R. H. Antioxidant and antiproliferative activities of strawberries. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 6887–6892.
- Hannum, S. M. Potential impact of strawberries on human health: a review of the science. *Nutr. Sci.* **2004**, *44*, 1–17.
- Goiffon, J.; Mouly, P.; Gaydou, E. Anthocyanic pigment determination in red fruit juices, concentrated juices and syrups using liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta* **1999**, *382*, 39–50.
- Zabetakis, I.; Leclerc, D.; Kajda, P. The effect of high hydrostatic pressure on the strawberry anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 2749–2754.
- Nyman, N. A.; Kumpulainen, J. T. Determination of anthocyanidins in berries and red wine by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 4183–4187.

- (7) Andersen, Ø. M.; Fossen, T.; Torskangerpoll, K.; Fossen, A.; Hauge, U. Anthocyanin from strawberry (*Fragaria ananassa*) with the novel aglycone 5-carboxypyranopelargonidin. *Phytochemistry* **2004**, *65*, 405–410.
- (8) Kosar, M.; Kafkas, E.; Paydas, S.; Can Baser, K. H. Phenolic composition of strawberry genotypes at different maturation stages. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 1586–1589.
- (9) Häkkinen, S. H.; Auriola, S. High-performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry and diode array ultraviolet detection in the identification of flavonol aglycons and glycosides in berries. *J. Chromatogr.* **1998**, *829*, 91–100.
- (10) Häkkinen, S. H.; Kaerenlampi, S. O.; Heinonen, I. M.; Mykkaenen, H. M.; Törrönen, A. R. Content of the flavonols quercetin, myricetin, and kaempferol in 25 edible berries. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 2274–2279.
- (11) Olsson, M. E.; Ekvall, J.; Gustavsson, K. E.; Nilsson, J.; Pillai, D.; Sjöholm, I.; Svensson, U.; Åkesson, B.; Nyman, M. G. L. Antioxidants, low molecular weight carbohydrates, and total antioxidant capacity in strawberries (*Fragaria × ananassa*): Effects of cultivar, ripening, and storage. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 2490–2498.
- (12) Henning, W. Flavonol glycosides of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.), raspberry (*Rubus idaeus* L.) and blackberry (*Rubus fruticosus* L.). *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.* **1981**, *173*, 180–187.
- (13) Hertog, M.; Hollman, P.; Katan, M. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in The Netherlands. *J. Agric. Food Chem.* **1992**, *40*, 2363–2379.
- (14) Macheix, J. J.; Fleuriet, A. Phenolics in fruits and fruit products: progress and prospects. In *Polyphenolic Phenom*; Scalbert, A., Ed.; INRA Editions: Paris, France, 1993; pp 157–163.
- (15) Maeaettæ-Riihinen, K. R.; Kamal-Eldin, A.; Toeröenen, A. R. Identification and Quantification of phenolic compounds in berries of *Fragaria* and *Rubus* species (family Rosaceae). *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 6178–6187.
- (16) López-Serrano, M.; Barceló, A. R. Comparative study of the products of the peroxidase-catalyzed and the polyphenoloxidase-catalyzed (+)-catechin oxidation. Their possible implications in strawberry (*Fragaria × ananassa*) browning reactions. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 1218–1224.
- (17) Ryu, B. H. Antioxidative activity of flavonoid on oxidation of human low-density lipoprotein induced by macrophages and copper. *Food Sci. Biotechnol.* **2002**, *11*, 84–88.
- (18) Liu, Z.; Ma, L. P.; Zhou, B.; Yang, L.; Liu, Z. L. Antioxidative effects of green tea polyphenols on free radical initiated and photosensitized peroxidation of human low-density lipoprotein. *Chem. Phys. Lipids* **2000**, *106*, 53–63.
- (19) Schlösser, E. Preformed phenols as resistance factors. *Acta Hortic.* **1994**, *381*, 615–630.
- (20) Yamamoto, M.; Nakatsuka, S.; Otani, H.; Kohmoto, K.; Nishimura, S. (+)-Catechin acts as an infection-inhibiting factor in strawberry leaf. *Phytopathology* **2000**, *90*, 595–600.
- (21) Treutter, D.; Feucht, W.; Christ, E. Flavan-3-ols and their relation to resistance to fungi in strawberries. *Mitt. Klosterneuburg* **1991**, *41*, 79–83.
- (22) Hebert, C.; Charles, M. T.; Gauthier, L.; Willemot, C.; Khanizadeh, S.; Cousineau, J. Strawberry proanthocyanidins: Biochemical markers for *Botrytis cinerea* resistance and shelf-life predictability. *Acta Hortic.* **2002**, *567*, 659–662.
- (23) Cheng, G. W.; Breen, P. J. Activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and concentrations of anthocyanins and phenolics in developing strawberry fruit. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **1991**, *116*, 865–869.
- (24) Moyano, E.; Portero-Robles, I.; Medina-Escobar, N.; Valpuesta, V.; Muñoz-Blanco, J.; Caballero, J. L. A fruit-specific putative dihydroflavonol 4-reductase gene is differentially expressed in strawberry during the ripening process. *Plant Physiol.* **1998**, *1172*, 711–716.
- (25) Forkmann, G.; Heller, W. Biosynthesis of flavonoids. In *Comprehensive Natural Products Chemistry*; Sankawa, U., Ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 1999; Vol. 1, pp 714–748.
- (26) Fischer, T. C.; Halbwirth, H.; Meisel, B.; Stich, K.; Forkmann, G. Molecular cloning, substrate specificity of the functionally expressed dihydroflavonol 4-reductases from *Malus domestica* and *Pyrus communis* cultivars and the consequences for flavonoid metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.* **2003**, *412*, 223–230.
- (27) Treutter, D.; Santos-Buelga, C.; Gutmann, M.; Kolodziej, H. Identification of flavan-3-ols and procyanidins by high-performance liquid chromatography and chemical reaction detection. *J. Chromatogr.* **1994**, *667*, 290–297.
- (28) Mayr, U.; Treutter, D.; Santos-Buelga, C.; Bauer, H.; Feucht, W. Developmental changes in the phenol concentrations of 'Golden Delicious' apple fruits and leaves. *Phytochemistry* **1995**, *385*, 1151–1155.
- (29) Sandermann, H.; Strominger, L. Purification and properties of C55 – isoprenoid alcohol phosphokinase from *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* **1972**, *247*, 5123–5131.
- (30) Cheng, G. W.; Malencik, D. A.; Breen, P. J. UDP-glucose: flavonoid O-glucosyl-transferase from strawberry fruit. *Phytochemistry* **1994**, *35*, 1435–1439.
- (31) Gosch, C.; Puhl, I.; Halbwirth, H.; Schlangen, K.; Roemmelt, S.; Andreotti, C.; Costa, G.; Fischer, T. C.; Treutter, D.; Stich, K.; Forkmann, G. Effect of prohexadione-Ca on various fruit crops: flavonoid composition and substrate specificity of their dihydroflavonol 4-reductases. *Eur. J. Hortic. Sci.* **2003**, *683*, 144–151.
- (32) Halbwirth, H.; Kampan, W.; Stich, K.; Fischer, T. C.; Meisel, B.; Forkmann, G.; Rademacher, W. Biochemical and molecular biological investigations with respect to induction of fire blight resistance in apple and pear by transiently altering the flavonoid metabolism with specific enzyme inhibitors. *Acta Hortic.* **2002**, *590*, 485–492.
- (33) Harborne, J. B. *Introduction to ecological biochemistry*, 4th ed.; Academic Press: London, 1993.
- (34) Kumar, A.; Ellis, B. E. The phenylalanine ammonia-lyase gene family in raspberry. Structure, expression, and evolution. *Plant Physiol.* **2001**, *127*, 230–239.
- (35) Given, N. K.; Venis, M. A.; Grierson, D. Phenylalanine ammonia-lyase activity and anthocyanin synthesis in ripening strawberry fruit. *J. Plant Physiol.* **1988**, *133*, 25–30.
- (36) Stich, K.; Eidenberger, T.; Wurst, F.; Forkmann, G. Flavonol synthase activity and regulation of flavonol and anthocyanin biosynthesis during flower development in *Dianthus caryophyllus* L. (carnation). *Z. Naturforsch.* **1992**, *47c*, 553–560.
- (37) Schouten, R. E.; Van Kooten, O. Keeping quality of strawberry batches. *Acta Hortic.* **2001**, 329–335.
- (38) Jersch, S.; Scherer, C.; Huth, G.; Schloesser, E. Proanthocyanidins as the basis for the quiescence of *Botrytis cinerea* in immature strawberry fruits. *Z. Pflanzenkrankh. Pflanzenschutz* **1989**, *96*, 365–378.
- (39) Goetz, G.; Fkyerat, A.; Metais, N.; Kunz, M.; Tabacchi, R.; Roger P.; Pont, V. Resistance factors to grey mould in grape berries: identification of some phenolic inhibitors of *Botrytis cinerea* stilbene oxidase. *Phytochemistry* **1999**, *52*, 759–767.
- (40) Feucht, W.; Treutter, D. The role of flavan-3-ols and proanthocyanidins in plant defence. In *Principles and Practices in Plant Ecology*; Inderjit, D., Foy, C. L., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, 1999; pp 307–338.
- (41) Boss, P. K.; Davies, C.; Robinson, S. P. Expression of anthocyanin biosynthesis pathway genes in red and white grapes. *Plant Mol. Biol.* **1996**, *32*, 565–569.
- (42) Waters, D. L. E.; Holton, T. A.; Ablett, E. M.; Slade Lee, L.; Henry, R. J. cDNA microarray analysis of developing grape (*Vitis vinifera* cv. Shiraz) berry skin. *Funct. Integr. Genomics* **2005**, *5*, 40–58.

- (43) Jaakola, L.; Maatta, K.; Pirttila, A. M.; Torronen, R.; Karenlampi, S.; Hohtola, A. Expression of genes involved in anthocyanin biosynthesis in relation to anthocyanin, proanthocyanidin, and flavonol levels during bilberry fruit development. *Plant Physiol.* **2002**, *130*, 729–379.
- (44) Somers, T. C. Pigment development during ripening of the grape. *Vitis* **1976**, *14*, 269–277.
- (45) Ristic, R.; Iland, P. G. Relationships between seed and berry development of *Vitis vinifera* L. cv Shiraz: developmental changes in seed morphology and phenolic composition. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2005**, *11*, 43–58.
- (46) Kobayashi, S.; Ishimaru, M.; Hiraoka, K.; Honda, C. Myb-related genes of the Kyoho grape (*Vitis labruscana*) regulate anthocyanin biosynthesis. *Planta* **2002**, *215*, 924–933.
- (47) Kobayashi, S.; Ishimaru, M.; Ding, C. K.; Yakushiji, H.; Goto, N. Comparison of UDP-glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase (UFGT) gene sequences between white grapes (*Vitis vinifera*) and their sports with red skin. *Plant Sci.* **2001**, *160*, 543–550.
- (48) Winkel-Shirley, B. Flavonoid biosynthesis. A colourful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol.* **2001**, *126*, 485–493.

Received for review September 29, 2005. Revised manuscript received December 16, 2005. Accepted December 21, 2005. These investigations were supported by the Austrian Federal Ministry for Agriculture, Forestry, Environment and Water (Project 1416).

JF0524170

Nondestructive Application of Laser-Induced Fluorescence Spectroscopy for Quantitative Analyses of Phenolic Compounds in Strawberry Fruits (*Fragaria x ananassa*)

J. S. WULF,^{*,†} S. RÜHMANN,[‡] I. REGO,[‡] I. PUHL,[‡] D. TREUTTER,[‡] AND M. ZUDE[†]

Leibniz Institute for Agricultural Engineering Potsdam-Bornim, Max-Eyth-Allee 100, 14469 Potsdam,
 Germany, and Technical University Munich, Alte Akademie 16, 85350 Freising, Germany

Laser-induced fluorescence spectroscopy (LIFS) was nondestructively applied on strawberries (EX = 337 nm, EM = 400–820 nm) to test the feasibility of quantitatively determining native phenolic compounds in strawberries. Eighteen phenolic compounds were identified in fruit skin by UV and MS spectroscopy and quantitatively determined by use of rp-HPLC for separation and diode-array or chemical reaction detection. Partial least-squares calibration models were built for single phenolic compounds by means of nondestructively recorded fluorescence spectra in the blue-green wavelength range using different data preprocessing methods. The direct orthogonal signal correction resulted in $r^2 = 0.99$ and $\text{rmsep} < 8\%$ for *p*-coumaroyl-glucose, and $r^2 = 0.99$ and $\text{rmsep} < 24\%$ for cinnamoyl-glucose. In comparison, the correction of the fluorescence spectral data with simultaneously recorded reflectance spectra did not further improve the calibration models. Results show the potential of LIFS for a rapid and nondestructive assessment of contents of *p*-coumaroyl-glucose and cinnamoyl-glucose in strawberry fruits.

KEYWORDS: blue-green fluorescence; direct orthogonal signal correction; LIFS; partial least-squares regression; reflectance; strawberry

INTRODUCTION

Fresh fruits and vegetables deliver water, carbohydrates, proteins, nucleic acids, and lipids for the human nutrition. They possess compounds built up in the secondary metabolism such as phenolic compounds that have been further investigated in recent years in different clinical studies for their constitutional effects in the human diet (1). However, the health-promoting effects of single phenolic compounds in the human diet are a controversial topic of discussion (2, 3). Therefore, it is not the total phenolic compound content that determines the nutritional value of horticultural products but rather the composition and contents of single native phenolic compounds (4).

During the last three decades, spectral optical methods in optical geometries of transmittance, remittance, and diffuse reflectance have been successfully applied in nondestructive fruit and vegetable analyses addressing the pigment absorption (5–7), whereas the potential of fluorescence spectroscopy has not been investigated systematically. Research in fluorescence spectral analysis in agricultural and horticultural sciences has been mainly focused on changes in fruit chlorophyll fluorescence kinetic detectable in the red wavelength range (8). Additionally, spectroscopic methods and imaging techniques were tested to

analyze the fluorescing molecules in plants and horticultural products (9). Furthermore, fluorimetric systems were introduced to detect changes in the blue-green fluorescence (10, 11). Few working groups have been dealing with quantitative fluorescence analyses of compounds in processed fruits although promising results were found in other food stuffs (12).

The detection of fruit compounds by fluorescence spectroscopy is more selective than the photometric determination of absorbance and reflectance attributes, because only a part of the fruit molecules possess the ability to re-emit the absorbed energy as fluorescence radiation after some pico- or nanoseconds (average 10 ns) (13) in which the molecule remains in the excited state. Moreover, small amounts of fluorescing compounds can also be detected fluorimetrically because of the higher sensitivity compared to the absorption and reflectance spectroscopy. However, the fluorescence spectrum recorded from complex fruit tissue represents the sum of all single fluorescence spectra of every fluorophor in the probe. As a result, the molecule fluorescence signal in vivo is influenced by both environmental and inter- and intramolecular factors, which also change during development and ripening of fruits. Reabsorption and masking effects of autofluorescent and nonfluorescent molecules as well as scattering effects can interfere with the fluorescence emission of native fluorophors. The use of statistical methods instead of generic models for evaluating horticultural products in a qualitative and quantitative manner therefore

* Corresponding author. E-mail: jwulf@atb-potsdam.de.

[†] Leibniz Institute for Agricultural Engineering Potsdam-Bornim.

[‡] Technical University Munich.

became more important (14) for eliminating these influences on the spectral intensities which are not correlated to the fluorescence signal of a specific fruit compound under question. Using multivariate processing methods, particularly partial least-squares (PLS) regression, the spectral data can be evaluated and information on a specific fruit compound can be extracted (14, 15). However, dealing with raw data often leads to unsatisfactory calibration models. The use of different data preprocessing methods to reduce the noise, off-sets, and scattering influences in the spectral data before calculating the calibration model or to eliminate the information in the spectral data that is not referring to the content of a specific compound might be valuable for building robust calibrations on the fluorescence spectra as well for dealing with the reabsorption effects of the fruit matrix.

Alternatively, an often applied method in fluorescence spectroscopy to correct the fluorescence spectra is the use of the information contained in simultaneously recorded diffuse reflectance spectra of the fruit tissue. This approach has been successfully undertaken in applications of Gitelson et al. (16) and Löhmannsröben and Schober (17). For this purpose, (i) the entire reflectance spectrum can be subtracted wavelength by wavelength from the fluorescence spectrum, and (ii) a single reflectance wavelength can be used at which preferably marginal fluorescence appears for the correction of the entire fluorescence spectrum.

In the present work, nondestructive fluorescence measurements using laser-induced fluorescence spectroscopy (LIFS) and chromatographical fruit analyses were applied on strawberries to evaluate the feasibility for the quantification of single phenolic fruit compounds in comparison to quantitative HPLC-DAD and HPLC-CRD analysis. An approach was carried out to correct the apparent fluorescence signal by means of reflectance readings and statistical preprocessing methods.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material. Strawberries (*Fragaria x ananassa*) cv. 'Elsanta' cultivated in hydroponic production system were harvested in November 2005 in a commercial greenhouse in the region of Brandenburg, Germany. At each harvest date, three different maturity stages were collected and visually classified as follows: In ripening stage 1, the unripe fruits were characterized by a greenly white color; ripening stage 2 contained ripe berries with the skin appearance turning from white to red; and ripening stage 3 was composed of slightly overripe strawberries of overall red color. Parallel readings of nondestructive measurements and chromatographic analyses were accomplished at the fruit equator. Therefore the fruits were marked on the sepals and the measuring point for spectroscopic readings as well as sampling for chemical analyses was chosen on the fruit equator under the marked sepal. The calibration models were calculated using the spectral data and the concentrations of phenolic compounds estimated by rp-HPLC-analysis ($n = 32$) on the first picking date. An independent test set ($n = 35$) of fruits harvested 1 week later in the same green house was used for the model validation.

In a pre-experiment, chemical analysis has been carried out on a batch of strawberry fruits ($n = 89$) for the identification of phenolic compounds in the fruit tissue.

Extraction and rp-HPLC Analysis of Phenolic Compounds. Strawberry fruits were frozen in liquid nitrogen and lyophilized (BETA 1-8 LMC-1, Christ Gefriertrocknungsanlagen, Germany). From every single lyophilized fruit, the skin was scraped off with a razor blade as a layer of about 0.5 mm around the measuring point. The sample preparation corresponds to the depth of light penetration of around 0.5 mm. The sample was ground in a mortar and 2–6 mg per sample were used for extraction. For extraction, per 2 mg of powder, 500 μL of methanol containing 0.5 mg mL^{-1} flavone (Carl Roth GmbH, Germany) as an internal standard and 1.8 mL of methanol were added in a test

tube. Extraction was carried out for 30 min in a cooled water bath using ultrasonication. After centrifugation, the supernatant was evaporated; the residue was redissolved in 100 μL of methanol and injected for HPLC-analysis.

The HPLC analyses were performed on a Gilson-Abimed Systems (model 231, Gynkotek HPLC, Germany) using two pumps (model 422, Kontron Instruments, Germany) and a diode-array-detector (Bio Tek Kontron 540, Kontron Instruments, Germany). For the postcolumn derivatization a HPLC pump (model 300 C, Gynkotek HPLC, Germany) was used with a VIS-detector (640 nm, Kontron Detektor 432, Kontron Instruments, Germany). The phenolic compounds were separated on a Nucleosil 120-3 C18 column (250 \times 4 mm, 3 μm particle diameter, Machery-Nagel HPLC, Germany) following a stepwise gradient using mixtures of solvent A (formic acid 5% in water) and solvent B (methanol) from 95:5, v/v to 10:90, v/v with a flow rate of 0.5 mL min^{-1} (26). The gradient profile (%B in A) used was 0–5 min, isocratic, 5% B; 5–15 min, 5–10% B; 10–15 min, isocratic, 10% B; 15–35 min, 10–15% B; 35–55 min, isocratic, 15% B; 55–70 min, 15–20% B; 70–80 min, isocratic, 20% B; 80–95 min, 20–25% B; 95–125 min, 25–30% B; 125–145 min, 30–40% B; 145–160 min, 40–50% B; 160–175 min, 50–90% B; 175–195 min, isocratic, 90% B.

Identification of compounds was achieved by their chromatographic behavior, by their UV absorbance spectra and by mass spectroscopy in comparison with authentic standards and with data from literature (Table 1). The procyanidins B1, B3 and *p*-coumaroyl-glucose were previously identified (18, 20). Cinnamoyl-glucose was kindly provided by W. Schwab (Technical University Munich). Commercially available standards used were caffeic acid, *p*-coumaric acid, cinnamic acid, pelargonidin, cyanidin, isoquercitrin, kaempferol, catechin, and gallic acid, which were obtained from (Roth-Karlsruhe, Germany). Epicatechin-3-gallate was purchased from (Extrasynthèse-Lyon, France).

Hydroxycinnamic acids, dihydroxychalcones, and flavonols were detected at 280 nm and anthocyanins at 540 nm, whereas flavanols were estimated by chemical reaction detection (CRD) at 640 nm after postcolumn derivatization with 4-dimethylaminocinnamic aldehyde (18, 19). For quantification, we estimated procyanidins B1 and B3 as procyanidin B2, caffeoyl-glucoside as caffeic acid, *p*-coumaroyl-glucose and kaempferol-coumaroyl-glucoside as *p*-coumaric acid, cinnamoyl-glucose and cinnamic acid derivate as cinnamic acid, pelargonidin-glucoside and pelargonidin-malonyl-glucoside as pelargonidin, cyanidin-glucoside-succinate as cyanidin, quercetin-glucoside as isoquercitrin, kaempferol-glucuronide and kaempferol-acetyl-glucoside as kaempferol, and galloyl-ester as gallic acid.

For statistical analysis, the data were first tested for normal distribution using the Kolmogorov–Smirnov test, which was confirmed with $P < 0.01$. The data were further treated with a one-way ANOVA and the TUKEY test using Minitab 14 statistical software.

Mass Spectroscopy. For MS/MS analyses of single compounds, the crude extract was first fractionated by several analytical runs as described above. The fractions containing only a few phenolic compounds were further separated on Phenomenex Synergy (Fusion-RP 18, 80 A, 50 \times 2 mm, 4 μm particle diameter) and a stepwise gradient using mixtures of solvent A (formic acid, 0.1% in water) and solvent B (formic acid, 0.1% in MeOH) from 94:6, v/v to 0:100, v/v with a flow rate of 0.2 mL min^{-1} . The gradient profile (%B in A) used was: 0–0.2 min, isocratic, 6% B; 0.2–14.2 min, 6–16.5% B; 14.2–16.2 min, 16.5–17% B; 16.2–18.2 min 17–17.5% B; 18.2–20.2 min, isocratic, 17.5% B; 20.2–22.2 min, 17.5–18.5% B; 22.2–24.2 min, isocratic, 18.5% B; 24.2–27.2 min, 18.5–20% B; 27.2–46.2 min, 20–100% B. The survey of molar mass and fragment occurred on a triple-quadrupole mass spectrometer (API 3000, Perkin-Elmer Sciex, USA) with turbo stray as ion source, polarity negative, scan-type Q1 MS in molar mass range m/z 100–1000.

Laser-Induced Fluorescence Spectroscopy. The fluorometer (Laser Fluoroscope LF401 Lambda, I.O.M., Germany) used for the detection of fluorescence spectra of strawberries was equipped with a pulsed nitrogen laser emitting short laser pulses of 350 ps at a repetition rate of 16 Hz at 337 nm (Figure 1). The depth of light penetration of the excitation light in the fruit tissue is about 0.5 mm. An exciting as well as receiving fiber-optic probe allowed reading spectra directly from the fruit surface. The fiber probe had a length of 3 m with a kernel

Table 1. Identification of Phenolic Compounds in Strawberry Fruits using HPLC-DAD and LC-MS/MS (m/z = mass to charge ratio; $[M-H]^-$ = molecule ion minus H (negative mode), t_R = retention time)

t_R (min)	λ_{max} (nm)	avg m/z $[M - H]^-$	MS/MS fragments	identification
Benzoic Acids				
8	287			galloyl-ester
Cinnamic Acids				
19	286	341 (179 + hexose)		caffeoyl-glucose
37	314	325	117, 145, 89, 119	p-coumaroyl-glucose
66	284	355 $[M + COOH]$	103, 59, 71, 146	cinnamoyl-glucose
70	282			cinnamic acid derivative
Flavanols				
23	278			procyanidin B3
24	277			procyanidin B1
25	278			catechin
80	278			epicatechingallate
Anthocyanins				
109	272, 329sh, 501	432	268, 223, 146, 120	pelargonidin-glucoside
141	278, 518			cyanidin-glucoside-succinate
48	271, 330sh, 502	519		pelargonidin-malonylglucoside
Flavonols				
131	257, 352	477	151, 301, 179, 107, 109, 121	quercetin-glucuronide
147	264, 346			kaempferol-glucuronide
162	264, 346	489	283, 255, 227, 285	kaempferol-acetyl-glucoside
169	268, 314	593	284, 285	kaempferol-coumaroyl-glucoside
Unknown Compounds				
5	248	603	279	simple phenolic
17	275	399		cinnamic acid-derivative

HPLC-DAD and LC-MS/MS Data of Reference Compounds

t_R (min)	λ_{max} (nm)	avg m/z $[M - H]^-$	MS/MS fragments	ref compd
27	278	577	425, 289, 407	procyanidin B3
30	277	289	245, 109	catechin
44	323	179	135, 89, 107, 79, 117	caffeic acid
69	309	163	147, 117, 119, 91, 89	p-coumaric acid
138	278	147		cinnamic acid
166	254, 371	301	151, 179, 107, 121	quercetin
172	262, 366	285	143, 108, 93, 117	kaempferol

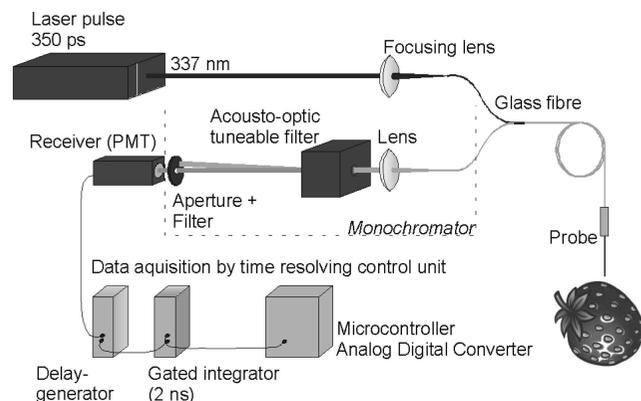
diameter of 600 μm , providing the measuring spot, and was connected to a Y-coupler with a length of 0.50 m. To avoid measuring diffuse reflectance, the surface of the fiber-optic probe was pasted into a high-grade steel tube shaped with an angle of 8°. The acousto-optic tuneable filter enables the scanning detection in 1 nm intervals in a spectral range of 350–820 nm. The signal was detected by a photomultiplier tube and subsequently processed with a high time resolution (100 ps gate width). The low frequency of the laser pulses and an additionally integrated electronic filter allowed recordings at different incident light conditions. To avoid systematical errors due to wavelength shifts and intensity changes of the experimental setup, we carried out measure-

ments in certain intervals on different standards such as in riboflavin solution (Carl Roth GmbH, Germany), and on 100% reflecting Spectralon (Labsphere, USA).

For every strawberry, one fluorescence spectra has been recorded directly at fruit epidermis. The spectral readings were done in room temperature conditions with a measuring time of about 5 min for every single spectrum.

Reflectance Spectroscopy. Fruit diffuse reflectance recordings were carried out with a laboratory device as explained in Zude (6). The spectrophotometer (MMS1 NIR-enhanced, Zeiss-Jena, Germany) was equipped with a photodiode-array detector recording photons in the wavelength range from 300 to 1100 nm with resolution of 3.3 nm. A halogen lamp (12V/20W) was used as light source and glass fibers allowed recording the reflected light using an integrated sphere directly from the fruit surface. The system was calibrated with white Spectralon (Labsphere, USA) by measured spectrum = (raw spectrum - dark spectrum)/(white spectrum - dark spectrum).

Data Processing. The data sets of the strawberry fluorescence spectra were processed using different preprocessing methods (PLS-Toolbox 3.0, Eigenvector Research, USA) such as smoothing, derivation, column mean centering, and scaling. Scaling here refers to columnwise mean centering and division by the standard deviation. The dependent parameter y (phenolic compound concentration) has always been scaled having previously tested different preprocessing methods. Smoothing and derivation of the fluorescence spectra have been calculated according to the Savitzky-Golay algorithm (21) over a window of seven values and a second-order polynomial. As additional preprocessing method the direct orthogonal signal correction (DOSC) method was applied using one and two DOSC factors and a tolerance value for the orthogonality of 0.001 (22).

**Figure 1.** Schematic view of the experimental setup with a nitrogen laser emitting at 337 nm serving as light source and a photomultiplier (PMT) as detector.

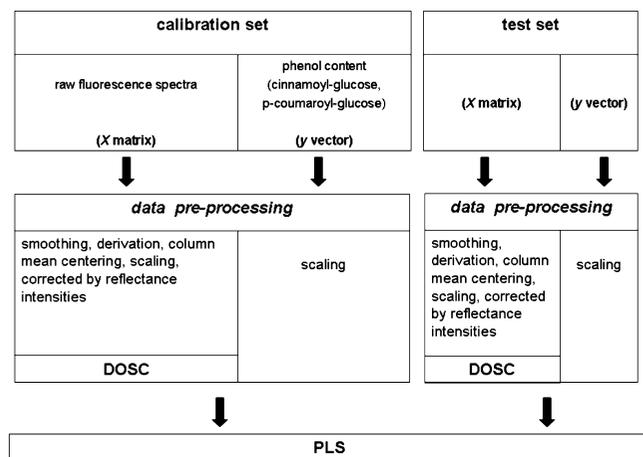


Figure 2. Schematic view of the different data-preprocessing steps and the direct orthogonal signal correction (DOSC) algorithm to calculate calibration models with the help of partial least-squares (PLS) regression based on the strawberry fluorescence spectral data (X matrix) and their phenol content (y vector).

The correction of fluorescence intensities using the diffuse reflectance data was carried out by (i) dividing the entire fluorescence spectra (400–820 nm) at each wavelength-dependent intensity by the corresponding reflectance intensities, or by (ii) using a single reflectance wavelength (800 nm), where low fluorescence and high scattering coefficients can be assumed. The reflectance spectra were treated with cubic spline interpolation in MATLAB 7.0 to adjust the wavelength steps of diffuse reflectance readings to the fluorescence data measured in 2 nm intervals.

The calibration models were developed using partial least-squares (PLS) regressions in MATLAB 7.0 (The Math Works, USA) applied to preprocessed data (Figure 2). Results of the PLS regression were determined using the SIMPLS algorithm and a leave-one-out cross validation. The percentage value of the root mean squares error of cross validation (rmsecv) has been calculated by means of dividing by the mean of y and multiplying by 100. The root mean squares error of prediction (rmsep) was evaluated on an independent test set. The number of latent variables was adjusted while minimizing the validation error.

RESULTS AND DISCUSSION

Identification and Contents of Phenolic Compounds in Strawberry Fruits. The identification of phenolic compounds in strawberry fruits (*Fragaria x ananassa*) cv. ‘Elsanta’ (Table 1) was carried out by the UV-absorbance spectra using a diode array detector, by cochromatography with authentic samples, if available, and by mass spectrometry (LC-MS/MS). The main anthocyanins were pelargonidin-glucoside and pelargonidin-malonyl-glucoside as formerly described by Määttä-Riihinen et al. (23). Minor amounts of cyanidin 3-glucoside-succinate were tentatively identified according to the data described by Lunkenbein and co-workers (24).

In the group of benzoic acids, a galloyl-ester was measured. Based on MS/MS measurement and in comparison with data from Seeram et al. (25) and Zheng et al. (26), ellagic acid and presumably a methyl-ellagic acid-pentose were identified, which occurred in marginal concentrations in the samples. On the basis of comparison with the literature (23, 24) three cinnamic acids were identified: cinnamoyl-glucose, *p*-coumaroyl-glucose and caffeoyl-glucose. In the case of cinnamoyl-glucose, an additional cochromatography was undertaken with an authentic sample provided by W. Schwab (27). The quantitatively most important monomeric flavanol of ‘Elsanta’ strawberry is catechin followed by its oligomeric derivatives procyanidin B3 and procyanidin

Table 2. Contents of Phenolic Compounds (mg g^{-1} of dry weight) in the Fruit Skin of Strawberries *Fragaria x ananassa* ‘Elsanta’ of Different Maturity Stages^a

	mean		
	unripe $n = 29$	ripe $n = 30$	overripe $n = 30$
Phenolic Compounds			
total benzoic acids	0.090 a	0.261 b	0.340 c
total cinnamic acids	0.397 a	1.141 b	1.348 b
total flavanols	4.004 b	2.425 a	2.844 a
total anthocyanins	0.111 a	5.717 b	10.171 c
total flavonols	0.147 a	0.522 b	0.888 c
Single Phenolic Compounds			
galloyl-ester	0.090 a	0.261 b	0.340 c
caffeoyl-glucoside	0.055 a	0.233 b	0.243 b
<i>p</i> -coumaroyl-glucose	0.038 a	0.060 ab	0.092 b
cinnamoyl-glucose	0.019 a	0.598 b	0.687 b
cinnamic acid derivate	0.284 a	0.250 a	0.326 a
procyanidin B3	1.204 a	0.817 b	0.942 ab
procyanidin B1	0.377 a	0.204 a	0.286 a
catechin	2.423 a	1.404 b	1.616 b
pelargonidin-glucoside	0.064 a	4.942 b	8.550 c
cyanidin-glucoside-succinate	0.009 a	0.189 ab	0.358 b
pelargonidin-malonyl-glucoside	0.038 a	0.586 b	1.263 c
quercetin-glucuronide	0.113 a	0.158 a	0.504 b
kaempferol-glucuronide	0.000 a	0.244 a	0.212 a
kaempferol-acetyl-glucoside	0.019 a	0.121 b	0.171 c
kaempferol-coumaroyl-glucoside	0.014 a	n.d.	n.d.

^a The data within rows were tested using Tukey-test. Different letters indicate significant differences within rows at the 5% level. n.d. = not detectable.

B1 identified by their reaction with 4-dimethylaminocinnamic aldehyde (18, 19) and by comparing their characteristics (UV spectra, retention times) with standards. The flavonols found in the fruits were quercetin-glucuronide, kaempferol-glucuronide, kaempferol-acetyl-glucoside, and kaempferol-coumaroyl-glucoside as previously found (23, 26).

The concentration of cinnamic acids and flavonols are almost the same in the skin and inner fruit flesh (data not shown). The flavanols and anthocyanins were particularly located in the outer cell layers, while minor contents were found in the fruit flesh. During fruit maturation (Table 2) the content of flavanols (e.g., catechin) decreased, whereas the anthocyanins accumulated (e.g., pelargonidin-glucoside, pelargonidin-malonyl-glucoside).

In the group of the cinnamic acids, the cinnamoyl-glucose was increased in the ripe and overripe fruits. Furthermore, the flavonols quercetin-glucuronide, kaempferol-glucuronide, and kaempferol-acetyl-glucoside increased during ripening.

Nondestructive Determination of Phenolic Compounds in Strawberries by Means of Fluorescence Spectroscopy. PLS regression analysis was carried out on the fluorescence spectra of the fruits (X matrix) and the chemically analyzed content (y vector) of (i) *p*-coumaroyl-glucose, and (ii) cinnamoyl-glucose. The two phenolic compounds selected have shown strong fluorescence in the cochromatographic analyses. They belong to the hydroxycinnamic acids that are known to be able to fluoresce (28, 29). Different preprocessing methods for the spectral data were compared with respect to the regression coefficients of calibration (r_c^2) and the root mean squares errors of cross validation (rmsecv). For the evaluation of the calibration models the loadings were analyzed with regard to the wavelength chosen for the PLS regression.

For the calibration based on strawberry fluorescence spectra and the content of cinnamoyl-glucose, the models based on raw or smoothed spectral data resulted in rmsecv values of 58.93% and 59.23%, respectively, and coefficients of determination of $r_c^2 = 0.72$ and $r_c^2 = 0.65$ using three latent variables (LV).

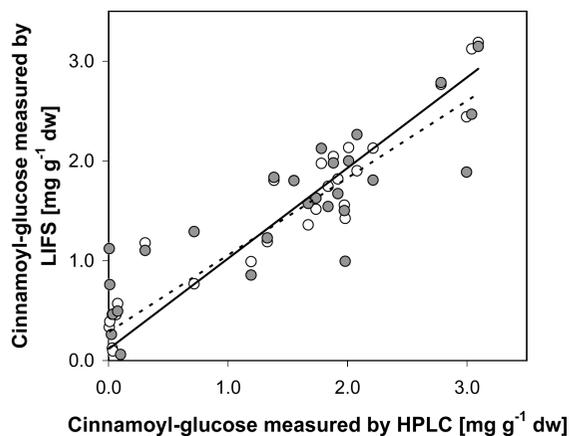


Figure 3. Calibration model built on the spectral data of strawberries and their content of cinnamoyl-glucose after preprocessing the fluorescence spectra by mean centering (full circle, dashed line; regression equation, $y = 0.77x + 0.28$; $r_c^2 = 0.773$) and scaling (empty circle, solid line; regression equation, $y = 0.91x + 0.12$; $r_c^2 = 0.908$).

This finding can be explained by the assumption that the noise, which was reduced by smoothing, was not the main reason for the measuring uncertainty in the apparent fluorescence spectra measured. On the other hand, derivation generally leads to increasing noise in the spectrum. Consistently a higher rmsecv value (76.07%) has been found together with an increased number of latent variables (LV = 4) for the model based on the second derivative of fluorescence spectra. However, the decision on the appropriate treatment regarding smoothing and the opportunity to apply derivative spectroscopy depends on the experimental setup used. When the calibration model using mean-centered fluorescence spectra was compared to scaled spectral data, mean centering resulted in a lower coefficient of determination ($r_c^2 = 0.77$) than scaling ($r_c^2 = 0.91$) with a slightly increased measuring uncertainty with rmsecv = 61.45% and rmsecv = 60.38%, respectively, using three latent variables (Figure 3). Mean centering the spectra before calibration is generally preferred to scaling, because spectral data variables (wavelengths) with high variations are assumed to be more important for the data interpretation than variables with smaller changes and should not be reduced in their valency. However, in the present study, no dominant peak occurred, but a sum signal. Concluding, the calibration models using smoothing for noise reduction, derivation to correct baseline shifts and standardization methods dealing with unequal weighting to preprocess the fluorescence spectral data did not improve or only partly improved the calibration in comparison to the calibration on raw data, but still leads to little coefficients of determination and high errors. Building calibration models on strawberry fluorescence data and their content of *p*-coumaroyl-glucose using the same different preprocessing methods confirm this conclusion.

On the basis of the assumption that the phenolic compound information contained in the fluorescence spectra may be influenced by reabsorption effects or masked by other auto-fluorescent compounds the direct orthogonal signal correction (DOSC) algorithm established by Westerhuis et al. (22) was tested to improve the calibration models. The DOSC algorithm (7, 30) as well as different orthogonal signal correction (31, 32) methods have shown promising results e.g. in near-infrared spectroscopy when applied as data preprocessing method to filter and correct the variations in the spectral data matrix that were not related to the dependent variable *y*. A following PLS regression after

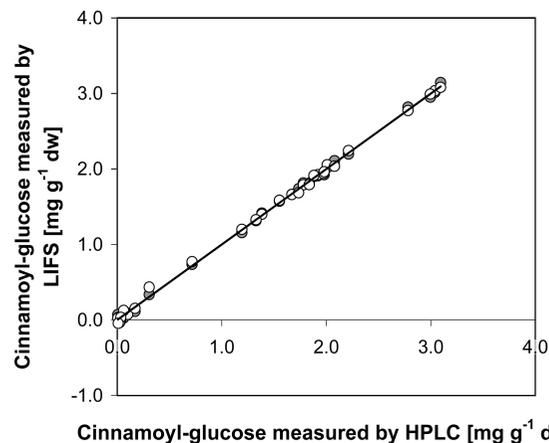


Figure 4. Calibration model built on the spectral data of strawberries and their content of cinnamoyl-glucose after preprocessing the fluorescence spectra by mean centering (full circle, dashed line; regression equation, $y = 0.99x + 0.00$; $r_c^2 = 0.999$) and scaling (empty circle -, regression equation: $y = 0.99x + 0.00$; $r_c^2 = 0.999$) and subtracting 1 DOSC factor.

DOSC preprocessing led to a less complex and assumably more robust model.

The calibration models built on strawberry DOSC-corrected fluorescence spectra and the content of *p*-coumaroyl-glucose or cinnamoyl-glucose resulted in high coefficients of determination ($r_c^2 > 0.90$). When the spectra have been mean centered before correcting with the DOSC algorithm the errors of cross validation were reduced and only two latent variables were kept. This is in accordance to the preprocessing used by Westerhuis et al. (22) compared to scaling as preprocessing step. Thereby the rmsecv values for the models for the *p*-coumaroyl-glucose content showed only minor differences when removing one (rmsecv = 4.62%) or two (rmsecv = 4.69%) DOSC factors after mean centering from the spectral data. Similarly, marginal differences have been found when calculating models based on scaled and DOSC corrected fluorescence spectra using one (rmsecv = 17.42%) or two (rmsecv = 14.79%) DOSC factors, while keeping three LVs. The calibration models using the nondestructive measured fluorescence data and the strawberry cinnamoyl-glucose content showed similar results (Figure 4). When the spectral data matrix has been mean centered before the correction with DOSC and calculating the PLS regression, the models needed only two latent variables instead of three LV. When scaling was applied, the rmsecv values were higher when subtracting one (mean centering, rmsecv = 5.46%; scaling, rmsecv = 12.55%) or two DOSC factors (mean centering, rmsecv = 4.89%; scaling, rmsecv = 10.38%). To avoid overfitting of the calibration model, we did not use more than two DOSC factors (22).

A comparison of the original fluorescence spectra of the strawberries with those after applying the direct orthogonal signal correction algorithm without preprocessing (Figure 5) shows that the spectral data where one DOSC factor has been removed was now graded according to the content of cinnamoyl-glucose in the different maturity stages (Table 3). The corrected fluorescence spectra by subtracting one DOSC factor with respect to the content of the *p*-coumaroyl-glucose confirm these results. Similar results for the use of orthogonal signal correction methods compared to other preprocessing methods have been found in application on plant extracts (33). Considerable increasing content of anthocyanins (e.g., pelargonidin-glucoside, Table 2) in the higher maturity stages of the strawberries and the marginal changes in the flavonol content (e.g., quercetin-

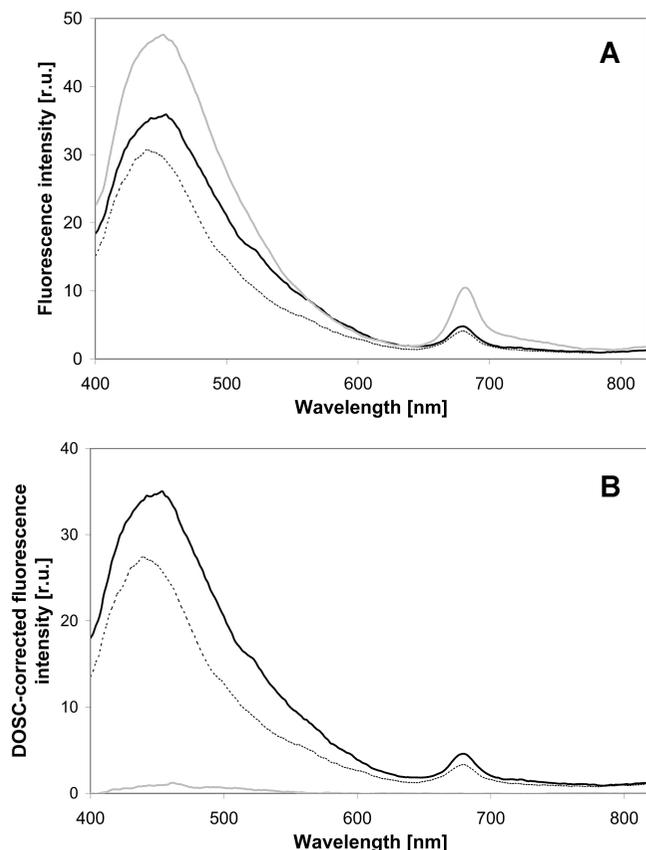


Figure 5. Smoothed average fluorescence spectra of (A) unripe (grey line; $n = 12$), ripe (black solid line; $n = 9$) and overripe (black dashed line; $n = 11$) fruits and (B) after removing one DOSC factor, calculated for the cinnamoyl-glucose content, from the spectral data matrix without preprocessing.

Table 3. Statistical Data of the Content of *p*-Coumaroyl-Glucose/Cinnamoyl-Glucose (mg g^{-1} of dry weight) in Strawberries of Different Maturity Stages

<i>p</i> -coumaroyl-glucose/ cinnamoyl-glucose	unripe	ripe	overripe
Calibration Set ($n = 32$)			
mean	0.07/0.05	0.22/2.23	0.22/1.61
standard deviation	0.05/0.05	0.08/0.57	0.14/0.71
minimum	0.02/0.01	0.08/1.55	0.09/0.31
maximum	0.17/0.17	0.37/3.09	0.48/3.04
Test Set ($n = 35$)			
mean	0.13/0.02	0.20/1.61	0.21/1.50
standard deviation	0.09/0.03	0.09/0.68	0.11/0.90
minimum	0.03/0.00	0.10/0.01	0.08/0.01
maximum	0.29/0.11	0.39/2.73	0.41/3.03

glucoside, kaempferol 3-glucuronide) interfered with the variation in the fluorescence spectra with respect to the *p*-coumaroyl-glucose and the cinnamoyl-glucose contents. However, the increasing reabsorption effects in the more mature stages could be removed by eliminating one or two DOSC factors from the spectral data matrix. The changes of flavanol content (e.g., catechin) during maturation do not affect the fluorescence signal of the cinnamic acids (*p*-coumaroyl-glucose, cinnamoyl-glucose) because they absorb light and emit fluorescence only in the UV wavelength range (<350 nm) (11).

The efficiency of the different preprocessing methods was evaluated by comparing the errors of cross validation of the calibration models. However, the fruit material is a living product, which is highly dependent on endogenous and exog-

Table 4. Root Mean Squares Errors of Calibration (rmsec) and Prediction (rmsep) and Coefficient of Determination of Calibration (r_c^2) and Validation (r_v^2) for Four Latent Variables (LV) of the Calibration Model Built on Fluorescence Spectra of Strawberries and Their Content *p*-Coumaroyl-Glucose and Cinnamoyl-Glucose Using Different Preprocessing Methods before Removing One DOSC Factor from the Spectral Data

preprocessing method	number of LV	r_c^2	rmsec (%)	r_v^2	rmsep (%)
before DOSC					
<i>p</i> -Coumaroyl-glucose					
mean centering	1	0.999	1.58	0.989	19.21
	2	0.999	1.04	0.988	19.19
	3	0.999	0.60	0.990	18.95
	4	1.000	0.36	0.990	19.17
scaling	1	0.901	22.57	0.923	16.69
	2	0.993	5.79	0.992	7.91
	3	0.998	3.32	0.981	10.36
	4	0.999	1.26	0.985	9.67
Cinnamoyl-glucose					
mean centering	1	0.998	4.08	0.986	43.02
	2	0.999	2.40	0.992	43.01
	3	0.999	0.92	0.995	43.00
	4	1.000	0.46	0.995	43.29
scaling	1	0.955	17.62	0.965	28.04
	2	0.996	5.21	0.984	24.68
	3	0.999	3.08	0.993	23.01
	4	0.999	1.39	0.992	23.07

enous effects affecting their phenolic compounds composition as well as other factors affecting the apparent fluorescence signal. Therefore, a validation of the calibration models using an independent test set of new fruit material is essential. In the present study, strawberries from the same cultivar but different harvesting date were subjected to the validation. An influence of endogenous factors such as varying molecule allocation processes as well as exogenous factors as environmental growing conditions can be expected on the fruit material. For this purpose also the number of latent variables in the calibration models based on cross-validation results was evaluated again by comparing the rmsec and rmsecv values and the root mean squares errors of prediction (rmsep) for the first four LV. Generally, using mean centering, scaling or the DOSC algorithm as preprocessing of the fluorescence spectra of the test-set independently from the calibration data set resulted in lower validation errors.

Calculating the rmsep values of scaled and subsequently DOSC-corrected fluorescence spectra showed improved calibration models (rmsep $< 8.00\%$ for *p*-coumaroyl-glucose, rmsep $< 23.10\%$ for cinnamoyl-glucose) compared to mean centering the spectra before removing one DOSC factor (Table 4). The subtraction of only one DOSC factor from the preprocessed spectral data matrix using scaling showed lower validation errors than removing two DOSC factors (rmsep $< 15.00\%$ for *p*-coumaroyl-glucose, rmsep $> 24.10\%$ for cinnamoyl-glucose). The use of two latent variables gave a robust model in the case of calibrating with the *p*-coumaroyl-glucose content with the lowest rmsep value (7.91%) and a high coefficient of determination of validation ($r_v^2 = 0.99$). The validation of the calibration models built on the fluorescence spectra of strawberries and their content of the cinnamoyl-glucose leads to rmsep = 23.01% and $r_v^2 = 0.99$ by using three LV. In contrast, using the total phenolic compound content of both, fluorescent and nonfluorescent phenolic fruit compounds, and the scaled and DOSC corrected strawberry fluorescence spectra for the calibration models led to increased errors of validation (rmsep $> 51\%$) compared to the models based on single fluorescent phenolic compound contents.

The coefficients of determination in the validation of the calibration models based on the fruit fluorescence spectra and their content of *p*-coumaroyl-glucose and cinnamoyl-glucose were always higher than 0.92. However, a rmsep value around 20% led to the assumption that even after removing non relevant information for the phenolic compound content from the spectral data with the help of the DOSC algorithm not all the variables with an interfering influence on the fluorescence signal of these two phenolic compound contents could be eliminated.

Alternatively, processing the fluorescence spectra with the help of simultaneously recorded reflectance spectra is often applied in fluorescence spectroscopy to reduce the reabsorption effects in the spectral data matrix (16, 17). Therefore, the fluorescence spectra were corrected by dividing the fluorescence intensity at each wavelength with the corresponding reflectance intensity in a wavelength range from 400 to 820 nm. Preprocessing the spectral data by mean centering resulted in rmsecv = 97.68% and rmsep = 95.02% and low coefficients of determinations (r_c^2 and $r_v^2 < 0.38$) for one LV for the content of cinnamoyl-glucose. In comparison, scaling led also to high values for the root-mean-square error of calibration (rmsecv = 92.86%) and validation (rmsep = 94.64%) and low coefficients of determination keeping two LV.

When using only a single reflectance intensity at 800 nm to correct the reabsorption effects in the fluorescence spectra for the calibration of the cinnamoyl-glucose content, the r_v^2 values slightly improved, but the rmsep values increased when preprocessing the spectra by mean centering (rmsep = 95.83%) using one LV and by scaling (rmsep = 123.61%) using two LV for the models. Similar results were found for the *p*-coumaroyl-glucose content. Additionally, using the DOSC algorithm on the preprocessed corrected spectra did not further improve the calibration models and the validation results.

In conclusion, using the information included in the simultaneously recorded reflectance spectra to correct reabsorption effects on the fluorescence signal leads to less robust models. It can be supposed that the use of the reflectance spectral data includes information in the spectral data matrix (X) that may not be relevant for the prediction of the content of *p*-coumaroyl-glucose or cinnamoyl-glucose.

To test the feasibility of using fluorescence spectroscopy to nondestructively detect the content of health-promoting compounds in fruits and vegetables, it has to be taken into account that horticultural products such as strawberries provide a complex matrix with varying optical properties leading to variation in the fluorescence signal. Particularly, reabsorption and quenching effects are influencing the fluorescence spectral data. In contrast to the general opinion that these disturbing effects are reduced when correcting the fluorescence emission spectra with the information included in the simultaneously recorded reflectance spectral data, using this often-applied approach in fluorescence spectroscopy resulted in less-robust models in the present study. In comparison by means of the direct orthogonal signal correction algorithm, two single phenolic fruit compounds (here *p*-coumaroyl-glucose and cinnamoyl-glucose) out of 18 phenolic compounds estimated by rp-HPLC in strawberry fruits were quantifiable.

The rmsep values of 8–24% were characteristic for the validation of calibration models developed for horticultural product. Therefore, the calibration models have to be improved by enlarging the calibration data set for considering the variability and the composition of fruit compound contents similar to approaches in near-infrared spectroscopy. However, the fluorescence spectroscopy seems to provide an adequate

method for special purposes such as for quantification of *p*-coumaroyl-glucose and cinnamoyl-glucose in strawberry fruits compared to the time and cost-intensive, destructive, analyzing methods.

ABBREVIATIONS USED

DOSC, direct orthogonal signal correction; rp-HPLC, reversed-phase high-performance liquid chromatography; HPLC-CRD, high-performance liquid chromatography with chemical reaction detection; HPLC-DAD, high-performance liquid chromatography with diode-array detector; LIFS, laser-induced fluorescence spectroscopy; LC-MS/MS, HPLC linked with a mass spectrometer; rmsec, root mean squares error of calibration; rmsecv, root mean squares error of cross-validation; rmsep, root mean squares error of prediction; UV, ultraviolet.

ACKNOWLEDGMENT

The authors acknowledge Kerstin Zofka for technical assistance.

LITERATURE CITED

- (1) Hannum, S. M. Potential impact of strawberries on human health: a review of the science. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* **2004**, 1–17.
- (2) Regnault Roger, C. The nutritional incidence of flavonoids: some physiological and metabolic considerations. *Experientia* **1988**, *44*, 725–804.
- (3) Santos-Buelga, C.; Scalbert, A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds-nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 1094–1117.
- (4) Chun, O. K.; Kim, D.-O.; Smith, N.; Schroeder, D.; Han, J. T.; Lee, C. Y. Daily consumption of phenolics and total antioxidant capacity from fruit and vegetables in the American diet. *J. Sci. Food Agric.* **2005**, *85*, 1715–1724.
- (5) Merzlyak, M. N.; Gitelson, A. A.; Chivkunova, O. B.; Rakitin, V. Y. Non-destructive optical detection of pigment changes during leaf senescence and fruit ripening. *Physiol. Plant.* **1999**, *106*, 135–141.
- (6) Zude, M. Comparison of indices and multivariate models to non-destructively predict the fruit chlorophyll by means of visible spectrometry in apples. *Anal. Chim. Acta* **2003**, *481*, 119–126.
- (7) Zude, M.; Birlouez-Aragon, I.; Paschold, P. J.; Rutledge, D. N. Non-invasive spectrophotometric sensing of carrot quality from harvest to consumption. *Postharvest Biol. Technol.* **2007**, *45*, 30–37.
- (8) Krause, G. H.; Weis, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1991**, *42*, 313–349.
- (9) Chappelle, E. W.; Wood Jr, F. M.; McMurtrey III, J. E.; Newcomb, W. W. Laser-induced fluorescence of green plants. I: A technique for the remote detection of plant stress as species differentiation. *Appl. Opt.* **1984**, *23*, 134–138.
- (10) Lichtenthaler, H. K.; Lang, M.; Heisel, F.; Miehé, J. A. Detection of vegetation stress via a new high resolution fluorescence imaging system. *J. Plant Physiol.* **1996**, *148*, 599–612.
- (11) Wulf, J. S. Polyphenol Analysis in Horticultural Products Based on Laser-Induced Fluorescence Spectroscopy. PhD Thesis, Faculty of Agriculture and Horticulture, Humboldt University of Berlin, Berlin, Germany, 2006.
- (12) Cheikhousman, R.; Zude, M.; Bouveresse, D. J.; Rutledge, D. N.; Birlouez-Aragon, I. Fluorescence spectroscopy for monitoring deterioration of extra olive oil during heating. *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *382*, 1438–1443.
- (13) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; 3rd ed.; Springer: New York, 2006; p 9.
- (14) Bro, R.; van den Berg, F.; Thybo, A.; Andersen, C. M.; Jorgensen, B.; Andersen, H. *Trends Food Sci. Technol.* **2002**, *13*, 235–244.
- (15) Geladi, P. Some recent trends in the calibration literature. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2002**, *60*, 211–224.

- (16) Gitelson, A. A.; Buschmann, C.; Lichtenthaler, H. K. Leaf chlorophyll fluorescence corrected for re-absorption by means of absorption and reflectance measurements. *J. Plant Physiol.* **1998**, *152*, 283–296.
- (17) Löhmansröben, H. G.; Schober, L. Combination of laser-induced fluorescence and diffuse-reflectance spectroscopy for the in situ analysis of diesel-fuel-contaminated soils. *Appl. Opt.* **1999**, *38*, 1404–1410.
- (18) Treutter, D.; Santos-Buelga, C.; Gutmann, M.; Kolodziej, H. Identification of flavan-3-ols and procyanidins by high-performance liquid chromatography and chemical reaction detection. *J. Chromatogr.* **1994**, *667*, 290–297.
- (19) Treutter, D. Chemical reaction detection of catechins and proanthocyanidins with 4-dimethylaminocinnamic aldehyde. *J. Chromatogr.* **1989**, *467*, 185–193.
- (20) Roemmelt, S.; Peterek, S.; Treutter, D.; Andreotti, C.; Costa, G.; Halbwirth, H.; Rademacher, W.; Speakman, J. B.; Sponza, G.; Tortoreto, L.; Bazzi, C.; Zimmermann, N.; Stich, K.; Forkmann, G. Alteration of phenylpropanoid biosynthesis of fruit trees as a tool for enhancement of fire blight resistance. *Acta Hortic.* **2002**, *590*, 477–484.
- (21) Savitzky, A.; Golay, M. Smoothing and differentiation of data by simplified least square procedures. *Anal. Chem.* **1964**, *36*, 1627–1639.
- (22) Westerhuis, J. A.; de Jong, S.; Smilde, A. K. Direct Orthogonal Signal Correction. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2001**, *56*, 13–25.
- (23) Määttä-Riihinen, K. R.; Kamal-Eldin, A.; Törrönen, A. R. Identification and quantification of phenolic compounds in berries of *Fragaria* and *Rubus* species (family *Rosaceae*). *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 6178–6187.
- (24) Lunkenbein, S.; Coiner, H.; De Vos, C. H. R.; Schaart, J. G.; Boone, M. J.; Krens, F. A.; Schwab, W.; Salentijn, E. M. J. Molecular Characterization of a Stable Antisense Chalcone Synthase Phenotype in Strawberry (*Fragaria X ananassa*). *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 2145–2153.
- (25) Seeram, N. P.; Lee, R.; Scheuller, S.; Heber, D. Identification of phenolic compounds in strawberries by liquid chromatography electrospray ionization mass spectroscopy. *Food Chem.* **2006**, *97*, 1–11.
- (26) Zheng, Y.; Wang, S.; Wang, C. Y.; Zheng, W. Changes in strawberry phenolics, anthocyanins, and antioxidant capacity in response to high oxygen treatments. *Food Sci. Technol.* **2007**, *40*, 49–57.
- (27) Schwab, J. F.; Klucas, R. V.; Grayer, R. J.; Abian, J.; Harborne, J. B. Characterization of Phenolic Glucosides from Soybean Root Nodules by Ion-Exchange High-Performance Liquid Chromatography, Ultraviolet Spectroscopy and Electrospray Mass Spectrometry. *Phytochem. Anal.* **1998**, *9*, 171–176.
- (28) Buschmann, C.; Langsdorf, G.; Lichtenthaler, H. K. Imaging of the blue, green, and red fluorescence emission of plants: An overview. *Photosynthetica* **2000**, *38* (4), 483–491.
- (29) Morales, F.; Cartelat, A.; Alvarez-Fernandez, A.; Moya, I.; Cerovic, Z. G. Time-resolved spectral studies of blue-green fluorescence of artichoke (*Cynara cardunculus* L. Var. *Scolymus*) leaves: Identification of chlorogenic acid as one of the major fluorophores and age-mediated changes. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53* (25), 9668–9678.
- (30) Luypaert, J.; Heuerding, S.; de Jong, S.; Massart, D. L. An evaluation of direct orthogonal signal correction and other preprocessing methods for the classification of clinical study lots of a dermatological cream. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2002**, *30*, 453–466.
- (31) Sjöblom, J.; Svensson, O.; Josefson, M.; Kullberg, H.; Wold, S. An evaluation of orthogonal signal correction applied calibration transfer of near infrared spectra. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **1998**, *44*, 229–244.
- (32) Sáiz-Abajo, M. J.; González-Sáiz, J. M.; Pizarro, C. Orthogonal signal correction applied to the classification of wine and molasses vinegar samples by near-infrared spectroscopy. Feasibility study for the detection and quantification of adulterated vinegar samples. *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *382*, 412–420.
- (33) Qu, H.; Ou, D.; Cheng, Y. Background correction in near-infrared spectra of plant extracts by orthogonal signal correction. *J. Zhejiang Univ. Sci.* **2005**, *6*, 838–843.

Received for review August 20, 2007. Revised manuscript received March 7, 2008. Accepted March 13, 2008. The authors thank the Deutsche Forschungsgemeinschaft for financial support of the project HESPERIDES.

JF072495I

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Iva Puhl, geb. Smrdelj
geboren am 11.04.1977 in Dubrovnik/Kroatien
Staatsangehörigkeit Kroatisch
verheiratet, eine Tochter

BERUFLICHE TÄTIGKEITEN

Juli 2003 bis Mai 2008 wissenschaftliche Angestellte, Lehrstuhl für Obstbau, Technische Universität München

STUDIUM

Okt. 1995 bis Okt. 2000 Studium der Agronomie an der Universität Zagreb/Kroatien

27. Okt. 2000 Studienrichtung: Weinbau, Obstbau und Önologie
Abschluss: Dipl. - Agr. Ing. (Universität Zagreb)
Diplomarbeit: „Die Verfahren der Weinherstellung der Sorte ‚Plavac mali‘ auf Pelješac“

Okt.2001 bis Juli 2003 Masterstudiengang Landnutzung an der Technischen Universität München - Weihenstephan

4. Juli 2003 **Abschluss: Master of Science (M.Sc.)**
Masterarbeit: „Einfluss des Wachstumsregulators Prohexadion-Ca auf den Metabolismus phenolischer Verbindungen von verschiedenen Sorten der Gattung *Vitis vinifera* L.“

SCHULBILDUNG

1983 bis 1991 Grund- und Hauptschule in Dubrovnik, Kroatien

1991 bis 1995 „Gymnasium Dubrovnik“ in Dubrovnik

27.06.1995 Abschluss: Abitur