

Technische Universität München
Wissenschaftszentrum Weihenstephan
Fachgebiet für Obstbau

Phenolische Inhaltsstoffe der Birne und ihre Bedeutung in der Resistenz gegen den Feuerbrand

Silke Peterek

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 Agrarwissenschaften (Dr. agr.) genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. J. Meyer

Prüfer der Dissertation:

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

2. Univ.-Prof. Dr. G. Forkmann

3. ao. Univ.-Prof. Dr. K. Stich,

Technische Universität Wien / Österreich

Die Dissertation wurde am 10. Mai 2004 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 22. Juli 2004 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Der Feuerbranderreger <i>Erwinia amylovora</i>	2
1.2	Der Bioregulator Prohexadion-Ca	4
1.3	Phenolische Inhaltsstoffe der Birne	7
1.3.1	Biosynthese der Phenylpropanoide	7
1.3.2	Phenylpropanoiden in Birnen (<i>Pyrus communis</i>)	10
1.3.3	Einfluss exogener und endogener Faktoren auf die Phenylpropanoid- biosynthese	15
1.3.4	Bedeutung der Phenylpropanoide für die Resistenzinduktion	17
2	Material und Methoden	19
2.1	Pflanzenmaterial	19
2.1.1	Gewächshaus und Freiland	19
2.1.2	Gewebelabor	20
2.2	Behandlung mit Prohexadion-Ca	22
2.2.1	Gewächshaus und Freiland	22
2.2.2	Gewebelabor	22
2.3	Inokulation mit dem Feuerbranderreger <i>Erwinia amylovora</i>	22
2.3.1	Anzucht der Bakterienstämme	22
2.3.2	Suspensionsherstellung	23
2.3.3	Inokulation der Blätter mit <i>Erwinia amylovora</i>	23
2.4	Quantitative Analytik der phenolischen Inhaltsstoffe mit HPLC	24
2.4.1	Probenvorbereitung und Extraktion für die chemische Analyse	24
2.4.2	HPLC-Gradient und Detektion	24
2.4.3	Quantitative Auswertung und Responsfaktoren	26

2.5	Identifizierung und Isolierung der phenolischen Inhaltsstoffe	28
2.5.1	Fraktionierung mit HPLC	28
2.5.2	Probenvorbereitung und Extraktion für die Säulenchromatographie	28
2.5.3	Fraktionierung durch Säulenchromatographie an Sephadex LH-20	28
2.5.4	Dünnschichtchromatographie	29
2.5.5	Saure Hydrolyse	29
2.5.6	Cochromatographie	30
2.6	Biochemische Analysen der Enzymaktivitäten	30
2.6.1	Präparation des Rohextrakts	30
2.6.2	Standardtests der Enzyme PAL, CHS, FHT, DFR, FNR	30
3	Ergebnisse	33
3.1	Isolierung und Identifizierung phenolischer Inhaltsstoffe von Birnenblättern	33
3.1.1	Fraktionierung durch Sephadex-Säulenchromatographie	33
3.1.2	Charakterisierung der phenolischen Inhaltsstoffe mit HPLC und DC	38
3.1.3	Diskussion	47
3.2	Quantitative und qualitative Zusammensetzung der Phenolmuster von Birnenblättern und deren Beeinflussung durch verschiedene Faktoren	51
3.2.1	Interaktion zwischen <i>Erwinia amylovora</i> und den Phenylpropanoiden verschiedener Birnengenotypen	52
3.2.1.1	Wirkung von Inokulationen mit unterschiedlichen Bakterienstämmen auf den Phenolstoffwechsel	52
3.2.1.2	Sortenbedingte Reaktionen im Phenolstoffwechsel auf den Feuerbrand-erreger	56
3.2.1.3	Diskussion	58
3.2.2	Beeinflussung der Flavonoidbiosynthese durch eine Prohexadion-Ca-Behandlung	61
3.2.2.1	Behandlung mit Prohexadion-Ca vor einer Feuerbrandinokulation	61
3.2.2.2	Entwicklungen in der Flavonoidbiosynthese nach einer Prohexadion-Ca-Behandlung	69
3.2.2.3	Diskussion	75

3.2.3	Einfluß exogener und endogener Faktoren auf die Phenolbiosynthese nach einer Prohexadion-Ca-Behandlung	78
3.2.3.1	Einfluss des Blattalters auf die Akkumulation phenolischer Verbindungen	78
3.2.3.2	Sortenbedingte Unterschiede in der Akkumulation von Phenylpropanoiden auf eine Prohexadion-Ca-Behandlung	83
3.2.3.3	Auswirkungen einer Feuerbrandinokulation auf die Phenylpropanoide nach einer Prohexadion-Ca-Behandlung	89
3.2.3.4	Diskussion	93
4	Gesamtdiskussion	98
5	Zusammenfassung	110
6	Literaturverzeichnis	112

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Chemische Struktur von Prohexadion-Ca (links), 2-Oxoglutarsäure (Mitte) und Ascorbinsäure (rechts)	5
Abb. 2: Biosynthese der phenolischen Verbindungen (verändert nach FORKMANN und HELLER 1999 und XIE et al. 2004)	8
Abb. 3: Flavonoid-Grundgerüst	9
Abb. 4: Chemische Struktur von Arbutin (Hydrochinon)	11
Abb. 5: Chemische Struktur von Hydroxyimtsäuren	12
Abb. 6: Chemische Struktur von Neochlorogensäure (3- <i>O</i> -Caffeoylchinasäure)	12
Abb. 7: Chemische Struktur von Flavonolen	13
Abb. 8: Chemische Struktur der monomeren Flavan-3-ole (+)-Catechin (links) (-)-Epicatechin (rechts)	14
Abb. 9: Chemische Struktur der Procyanidine B2 (links) und B1 (rechts)	14
Abb. 10: Schaubild der Fraktionen der Ethylacetat-Phase	34
Abb. 11: HPLC-Chromatogramme von ausgewählten Fraktionen (schwarze Linie = bei 280nm detektiert; rote Linie = bei 640nm detektiert) (Teil 1)	35
Abb. 12: HPLC-Chromatogramme von ausgewählten Fraktionen (schwarze Linie = bei 280nm detektiert; rote Linie = bei 640nm detektiert) (Teil 2)	36
Abb. 13: UV-Spektren konstitutiver und neu induzierter phenolischer Inhaltsstoffe von Birnenblättern	40
Abb. 14: Chemische Struktur von Luteoliflavan (3-Deoxycatechin) im Vergleich zu Catechin	50
Abb. 15: Chemische Struktur von Eriodicytol (links) und Eriodicytol 7-glukosid (rechts)	51
Abb. 16: Krankheitsindex der Birnensorten `Abate Fetel´ und `Harrow Sweet´ nach Inokulation mit verschiedenen Bakterienstämmen [Ea = <i>Erwinia amylovora</i>]	54
Abb. 17: Konzentration der gesamten Phenylpropanoide und der Hydrochinone der Birnensorten `Abate Fetel´ und `Harrow Sweet´ nach Inokulation mit verschiedenen Bakterienstämmen (Mittelwerte der 5 Wiederholungen mit Standardabweichung)	54
Abb. 18: Konzentration der Hydroxylimtsäuren und der Flavonolglykoside der Birnensorten `Abate Fetel´ und `Harrow Sweet´ nach Inokulation mit verschiedenen Bakterienstämmen (Mittelwerte der 5 Wiederholungen mit Standardabweichung)	55

-
- Abb. 19: Konzentration der Flavanole der Birnensorten `Abate Fetel´ und `Harrow Sweet´ nach Inokulation mit verschiedenen Bakterienstämmen (Mittelwerte der 5 Wiederholungen mit Standardabweichung) 55
- Abb. 20: Konzentration [mg/g TS] der einzelnen Phenolklassen in den Blättern der Birnensorte `Abate Fetel´, ohne und mit Inokulation mit dem Feuerbranderreger 57
- Abb. 21: Konzentration [mg/g TS] der einzelnen Phenolklassen in den Blättern des Birnengenotyps `Pyrodwarf´, ohne und mit Inokulation mit dem Feuerbranderreger 57
- Abb. 22: Konzentration [mg/g TS] der einzelnen Phenolklassen in den Blättern der Birnensorte `Harrow Sweet´, ohne und mit Inokulation mit dem Feuerbranderreger 58
- Abb. 23: Entwicklung des Krankheitsverlaufes nach Prohexadion-Ca-Vorbehandlung in Abhängigkeit des Einsatzzeitpunktes und der Konzentration (Mittelwerte der 15 Pflanzen mit Standardabweichung) [Tv = Tage vor Behandlung] 62
- Abb. 24: Versuchsschema mit allen Varianten und Probenahmeterminen [Tv = Tage vor Behandlung; I = Inokulation] 63
- Abb. 25: Mittelwerte der spezifischen Enzymaktivitäten [nkat/kg Protein] in den Kontrollpflanzen 64
- Abb. 26: Übersicht über die spezifischen Enzymaktivitäten der unbehandelten und mit Prohexadion-Ca vorbehandelten, nicht-inokulierten und inokulierten Blätter der Birnensorte `Abate Fetel´ 65
- Abb. 27: Entwicklung des Gesamtphenolgehalte nach Prohexadion-Ca-Behandlung vor einer Inokulation [Inok = Inokulation; Pro-Ca = Prohexadion-Ca] 66
- Abb. 28: Entwicklung der Hydroxyzimtsäuregehalte nach Prohexadion-Ca-Behandlung vor einer Inokulation [Inok = Inokulation; Pro-Ca = Prohexadion-Ca] 66
- Abb. 29: Entwicklung der Flavonolglykosidgehalte nach Prohexadion-Ca-Behandlung vor einer Inokulation [Inok = Inokulation; Pro-Ca = Prohexadion-Ca] 67
- Abb. 30: Entwicklung der Flavanolgehalte nach Prohexadion-Ca-Behandlung vor einer Inokulation [Inok = Inokulation; Pro-Ca = Prohexadion-Ca] 68
- Abb. 31: Entwicklung der Eriodictyol 7-glukosid-Gehalte nach Prohexadion-Ca-Behandlung vor einer Inokulation [Inok = Inokulation; Pro-Ca = Prohexadion-Ca] 68
- Abb. 32: Entwicklung der Luteoliflavangehalte nach Prohexadion-Ca-Behandlung vor einer Inokulation [Inok = Inokulation; Pro-Ca = Prohexadion-Ca] 69

-
- Abb. 33: Entwicklung der Konzentrationen der Gesamtphenole, der Hydroxyzimtsäuren und der Flavonolglykoside nach Prohexadion-Ca-Behandlung über den Versuchszeitraum von 28 Tagen (Mittelwerte der 5 Wiederholungen mit Standardabweichung) [Pro-Ca = Prohexadion-Ca] 70
- Abb. 34: Entwicklung der Konzentrationen der Gesamtflavanole, der monomeren Flavanole Catechin und Epicatechin und der Procyanidine B1 und B2 nach Prohexadion-Ca-Behandlung über den Versuchszeitraum von 28 Tagen (Mittelwerte der 5 Wiederholungen mit Standardabweichung) [Pro-Ca = Prohexadion-Ca] 72
- Abb. 35: Entwicklung der Konzentrationen von Eriodictyol 7-glukosid, Luteoliflavan und anderer neu induzierter Flavanole nach Prohexadion-Ca-Behandlung über den Versuchszeitraum von 28 Tagen (Mittelwerte der 5 Wiederholungen mit Standardabweichung) [Pro-Ca = Prohexadion-Ca] 73
- Abb. 36: Spezische Aktivitäten der Enzyme PAL und CHS in Birnenblättern der Sorte `Abate Fetel` 74
- Abb. 37: Spezische Aktivitäten des Enzyms FHT in Birnenblättern der Sorte `Abate Fetel` 74
- Abb. 38: Spezische Aktivitäten der Enzym FNR und DFR in Birnenblättern der Sorte `Abate Fetel` 75
- Abb. 39: Gehalte der Gesamtphenole 3 Tage und 14 Tage nach Behandlung mit Wasser (Kontrolle) und Prohexadion-Ca (250ppm und 125ppm) in Abhängigkeit vom Blattalter (Mittelwerte der 6 Wiederholungen mit Standardabweichung) [Pro-Ca = Prohexadion-Ca] 79
- Abb. 40: Gehalte der Hydroxyzimtsäuren 3 Tage und 14 Tage nach Behandlung mit Wasser (Kontrolle) und Prohexadion-Ca (250ppm und 125ppm) in Abhängigkeit vom Blattalter (Mittelwerte der 6 Wiederholungen mit Standardabweichung) [Pro-Ca = Prohexadion-Ca] 80
- Abb. 41: Gehalte der Flavonolglykoside 3 Tage und 14 Tage nach Behandlung mit Wasser (Kontrolle) und Prohexadion-Ca (250ppm und 125ppm) in Abhängigkeit vom Blattalter (Mittelwerte der 6 Wiederholungen mit Standardabweichung) [Pro-Ca = Prohexadion-Ca] 80
- Abb. 42: Gehalte der Flavanole 3 Tage und 14 Tage nach Behandlung mit Wasser (Kontrolle) und Prohexadion-Ca (250ppm und 125ppm) in Abhängigkeit vom Blattalter (Mittelwerte der 6 Wiederholungen mit Standardabweichung) [Pro-Ca = Prohexadion-Ca] 80

-
- Abb. 43: Gehalte von Catechin 3 Tage und 14 Tage nach Behandlung mit Wasser (Kontrolle) und Prohexadion-Ca (250ppm und 125ppm) in Abhängigkeit vom Blattalter (Mittelwerte der 6 Wiederholungen mit Standardabweichung) [Pro-Ca = Prohexadion-Ca] 81
- Abb. 44: Gehalte von Epicatechin 3 Tage und 14 Tage nach Behandlung mit Wasser (Kontrolle) und Prohexadion-Ca (250ppm und 125ppm) in Abhängigkeit vom Blattalter (Mittelwerte der 6 Wiederholungen mit Standardabweichung) [Pro-Ca = Prohexadion-Ca] 81
- Abb. 45: Gehalte von Eriodictyol 7-glucosid 3 Tage und 14 Tage nach Behandlung mit Wasser (Kontrolle) und Prohexadion-Ca (250ppm und 125ppm) in Abhängigkeit vom Blattalter (Mittelwerte der 6 Wiederholungen mit Standardabweichung) [Pro-Ca = Prohexadion-Ca] 82
- Abb. 46: Gehalte von Luteoliflavan 3 Tage und 14 Tage nach Behandlung mit Wasser (Kontrolle) und Prohexadion-Ca (250ppm und 125ppm) in Abhängigkeit vom Blattalter (Mittelwerte der 6 Wiederholungen mit Standardabweichung) [Pro-Ca = Prohexadion-Ca] 82
- Abb. 47: Relative und absolute Gehalte der Phenolklassen und der einzelnen Flavanolgruppen von 'Abate Fetel' 84
- Abb. 48: Relative und absolute Gehalte der Phenolklassen und der einzelnen Flavanolgruppen von 'Pyrodwarf' 84
- Abb. 49: Relative und absolute Gehalte der Phenolklassen und der einzelnen Flavanolgruppen von 'Harrow Sweet' 85
- Abb. 50: Frischgewicht und Sprosslänge verschiedener Genotypen mit und ohne Prohexadion-Ca-Behandlung (Mittelwerte der 5 Wiederholungen mit Standardabweichung) [Pro-Ca = Prohexadion-Ca] 86
- Abb. 51: Gesamtphenol-, *p*-Cumarsäure- und Flavonolglykosidgehalte verschiedener Genotypen mit und ohne Prohexadion-Ca-Behandlung (Mittelwerte der 5 Wiederholungen mit Standardabweichung) [Pro-Ca = Prohexadion-Ca] 87
- Abb. 52: Gesamtflavanol-, Catechin-, Epicatechin-, Procyanidin B1 und B2-Gehalte verschiedener Genotypen mit und ohne Prohexadion-Ca-Behandlung (Mittelwerte der 5 Wiederholungen mit Standardabweichung) [Pro-Ca = Prohexadion-Ca] 88
- Abb. 53: Gehalt der neu induzierten Substanzen Eriodictyol 7-glucosid und Luteoliflavan verschiedener Genotypen nach einer Prohexadion-Ca-Behandlung (Mittelwerte der 5 Wiederholungen mit Standardabweichung) [Pro-Ca = Prohexadion-Ca] 89

-
- Abb. 54: Gehalte der Gesamt-Phenole, der Hydroxyzimtsäuren und der Flavonolglykoside in inokulierten und nicht-inokulierten, mit und ohne Prohexadion-Ca vorbehandelten Blättern in Abhängigkeit des Blattalters (Mittelwerte der 3 Wiederholungen mit Standardabweichung) [Tv = Tage vorher behandelt; Inok = Inokulation; Pro-Ca = Prohexadion-Ca] 91
- Abb. 55: Gehalte von Flavanolen, Catechin und Epicatechin in inokulierten und nicht-inokulierten, mit und ohne Prohexadion-Ca vorbehandelten Blättern in Abhängigkeit des Blattalters (Mittelwerte der 3 Wiederholungen mit Standardabweichung) [Tv = Tage vorher behandelt; Inok = Inokulation; Pro-Ca = Prohexadion-Ca] 92
- Abb. 56: Gehalte der neu induzierten Flavonoide in inokulierten und nicht-inokulierten, mit und ohne Prohexadion-Ca vorbehandelten Blättern in Abhängigkeit des Blattalters (Mittelwerte der 3 Wiederholungen mit Standardabweichung) [Tv = Tage vorher behandelt; Inok = Inokulation; Pro-Ca = Prohexadion-Ca] 93
- Abb. 57: Biosynthese der phenolischen Verbindungen und Effekte von Prohexadion-Ca (verändert nach FORKMANN und HELLER 1999 und XIE et al. 2004) 104
- Abb. 58: Umsetzungsschritte von Eriodictyol zu Luteoliflavan 105

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Zusammensetzung der Makro- und Mikro-Nährstoffe der <i>in-vitro</i> -Medien.....	21
Tab. 2: Zusammensetzung der verwendeten Medien (VP für Vermehrung; P1 für Versuch) (Teil 1).....	21
Tab. 3: Zusammensetzung der verwendeten Medien (VP für Vermehrung; P1 für Versuch) (Teil 2).....	22
Tab. 4: Lösungsmittel-Gradient für HPLC-Analyse (TREUTTER et al. 1994).....	25
Tab. 5: Liste der HPLC-Geräte mit Diodenarraydetektor und Nachsäulenderivatisierung.....	25
Tab. 6: Liste der verwendeten Responsfaktoren.....	27
Tab. 7: Konzentrationen [mg/g TS] der bei 280nm detektierten Peaks in den Sephadex- Fraktionen.....	37
Tab. 8: Konzentrationen [mg/g TS] der bei 640nm detektierten Peaks in den Fraktionen.....	38
Tab. 9: Liste der phenolischen Inhaltsstoffe in Birnenblättern (Detektion bei 280nm)	45
Tab. 10: Liste der Flavanole in Birnenblättern (Detektion bei 640nm nach Derivatisierung mit DMAZA).....	46
Tab. 11: 10-stufiges Boniturschema zur Erfassung des Feuerbrandbefalls.....	53

Abkürzungen

ANR	A nthocyanidinreduktase
ANS	A nthocyanidinsynthase
CHI	C halkonisomerase
CHS	C halkonsynthase
CoA	C oenzym A
d	Tag (d ay)
DAD	D iodenarraydetektor
DC	D ünnschichtchromatographie
DFR	D ihydroflavonol 4- R eduktase
DMAZA	<i>p</i> - D imethylaminozimtaldehyd
Ea	<i>Erwinia amylovora</i>
F3'H	F lavonoid 3'- H ydroxylase
FHT	F lavanon 3- H ydroxylase
FLS	F lavonolsynthase
FNR	F lavanon 4- R eduktase
FNS	F lavon s ynthase
GA	Gibberellinsäure (g ibberellin a cid)
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (h igh p ressure l iquid c hromatography)
Inok	Inokulation
LAR	L eucoanthocyanidinreduktase
MeOH	Methanol
PAL	P henylalanin a mmoniumlyase
Pro-Ca	Prohexadion-Ca
RT	Retentionszeit (r etention t ime)
RF	Responsfaktor (r esponse f actor)
R _f	r elated to f ront
Tv	T age vor B ehandlung
TS	T rocken s ubstanz

1 Einleitung

„*Fire blight as a disease and its causal agent Erwinia amylovora as a plant-pathogenic bacterium are both unique. After more than a century of studies and thousands of publications, we know a great deal about both the disease and the pathogen. Yet we still do not know why only E. amylovora causes fire blight, and why fire blight concerns only some plant species that belong to the Rosaceae*“ (VANNESTE 2000). Dieses Zitat aus einem der aktuellsten Fachbüchern über den Feuerbranderreger verdeutlicht, dass es auch heute noch offene Fragen bezüglich dieser Krankheit gibt und dass der weltweite Forschungsbedarf zu diesem Thema nicht an Bedeutung verloren hat.

Mit der zunehmenden Resistenz von *Erwinia amylovora* gegen das Antibiotikum Streptomycin (LOPER et al. 1991; STOCKWELL et al. 1996), den wirtschaftlichen Einsparungen bei den Obstbauern und bei den Pflanzenschutzmittelfirmen sowie den strikteren Zulassungsaufgaben bei den Bekämpfungsmitteln, steigt die Notwendigkeit nach Strategien und Maßnahmen, welche die Krankheit bekämpfen und Umwelt und Menschen nicht belasten.

Phenolische Inhaltsstoffe sind in der Öffentlichkeit schon seit einigen Jahren ein Begriff. Als Verursacher von Verbräunungsreaktionen bei der Obstlagerung und -verwertung (BLANKENSHIP und RICHARDSON 1985; JU et al. 1996) und durch den adstringierenden bitteren Geschmack mancher Früchte (FEUCHT und TREUTTER 1989; WATZL und LEITZMANN 1995), galten die Phenole lange Zeit als störende Produkte von Obstpflanzen. Und auch in der Biochemie wurden die Phenole aufgrund ihres „nachgeschalteten“ Bildungsweges zunächst zu den Abfallprodukte der pflanzlichen Biosynthesen gezählt. Durch vermehrte Erforschung dieses Themas stellte sich bald heraus, dass phenolische Inhaltsstoffe neben den wertvollen Eigenschaften für die menschliche Gesundheit (z.B. anticancerogene, antibakterielle, antivirale etc. Wirkung) auch in der Pflanzenwelt keine Zufalls- und Nebenprodukte sind, sondern vielmehr auch hier bedeutende Funktionen wie die Blütenfarbgebung, die Zellstabilisierung (Holzbildung) u.v.m. innehaben. Die herausragendste Besonderheit dieser biochemischen Gruppe ist die Beziehung zwischen den Sekundärstoffen und der Abwehrreaktion der Pflanze gegen Pathogene (Insekten, Pilze, Viren und Bakterien), sozusagen der „Beitrag zur Gesundheit von Pflanzen“ (HARBORNE 1988).

Das ursprünglich für Kernobst als Wachstumsregulator entwickelte Mittel Prohexadion-Ca, zeigte in Untersuchungen überraschenderweise eine reduzierende Wirkung bei Feuerbrand-, Schorf- und Mehlnaubefall (YODER et al. 1999; COSTA et al. 2001, 2002; ALDWINCKLE et al. 2002; BUBÁN et al. 2002; BAZZI et al. 2003). Da Prohexadion-Ca keine eigenen biozide

Eigenschaften aufweist, bekanntermaßen aber in der Gibberellinbiosynthese eine Enzymblockade bewirken kann (RADEMACHER 2000), stellte sich die Frage nach weiteren Modifikationen in der Biochemie der Obstgehölze. Am Fachgebiet Obstbau wurde neben den Veränderungen der konstitutiven Phenolgehalte auch eine Induktion von neuartigen phenolischen Verbindungen in Prohexadion-Ca behandelten Apfelpflanzen nachgewiesen (RÖMMELT et al. 1999b). Im Rahmen eines EU-Projektes, in welchem auch diese Dissertation lief, wurde der Zusammenhang zwischen der stimulierten Flavonoidbiosynthese und dem reduzierten Feuerbrandbefall an Apfel und Birne näher erforscht (HALBWIRTH et al. 2003b).

In den eigenen an Birnenpflanzen durchgeführten Versuchen standen folgende Versuchsfragen im Vordergrund:

- Welche phenolische Inhaltsstoffe sind generell in Birnenblättern vorhanden?
- In welcher Weise beeinflusst eine Feuerbrandinokulation den Stoffwechsel der Phenylpropanoide?
- Welche Wirkung hat der Einsatz des Bioregulators Prohexadion-Ca auf die Zusammensetzung der phenolischen Inhaltsstoffe von Birnenblättern?
- Welche Bedeutung hat das Blattalter bei den Phenolkonzentrationen?
- Wie unterscheiden sich verschiedene Genotypen bezüglich ihrer Phenolkonzentrationen?
- Welche Unterschiede lassen sich innerhalb dieser Versuchsfragen bei Birne im Vergleich zu Apfel feststellen?

1.1 Der Feuerbranderreger *Erwinia amylovora*

Trotz seiner über 200 Jahre alten „Geschichte“ wird die Krankheit Feuerbrand und deren Erreger *Erwinia amylovora* [(Burill) Winslow et al.] aufgrund verschiedener charakteristischer Besonderheiten als einzigartige Bakteriose beschrieben. Zum ersten Mal wurde der Erreger in Nordamerika beobachtet und breitet sich seitdem in kultivierten wie auch in wilden Pflanzen der Familie der Rosaceen weltweit aus. Dieser erste Fund im Jahr 1780 wurde im Hudson Valley im Staat New York gemeldet (DENNING 1784, zitiert bei BONN und VAN DER ZWET 2000) und mit den ersten Siedlern und deren Anpflanzungen von Obstbäumen verlief die Verbreitung zunächst Richtung Westen. Ungefähr 135 Jahre nach dieser Entdeckung war der Feuerbrand in allen Regionen der USA vorzufinden. Insbesondere die Birnenproduktion war dabei am stärksten betroffen (VAN DER ZWET und KEIL 1979). Der früheste Bericht von Feuerbrand außerhalb von Nordamerika stammte 1903 aus Japan. In Europa wurde die Krankheit erstmalig 1957 in England diagnostiziert und von dort aus

breitete sie sich rasch über den gesamten europäischen Kontinent aus (VAN DER ZWET 2002). Vor über 30 Jahren (1971) wurde in Deutschland der erste Feuerbrandbefall auf der Insel Sylt und im nördlichen Teil Schleswig-Holsteins registriert und seitdem hat sich die Krankheit trotz Quarantänemaßnahmen und Rodeaktionen über die gesamte Bundesrepublik ausgebreitet. Mittlerweile wird der Feuerbrand in Deutschland als endemisch eingestuft und vor allem in den wärmeren Regionen im Süddeutschen Raum (Bodensee, Rheinland-Pfalz) gehen in Jahren mit befallsgünstigen Witterungslagen zahlreiche Meldungen über verheerende Schäden im Erwerbs- sowie Streuobstbau ein (BONN und VAN DER ZWET 2000). Die Nachricht eines massiven Auftretens des Feuerbranderreger im Sommer 2003 auf den Obstanbauflächen der Bundesanstalt für Züchtungsforschung (BAZ) in Quedlinburg, zeigt, dass die Gefahr eines Befalls mit dieser Bakteriose weiterhin besteht (HANKE 2003). Jedoch nicht nur in Deutschland verursacht *Erwinia amylovora* immense Schäden und dadurch hohe wirtschaftliche Verluste, sondern inzwischen ist das Auftreten von Feuerbrand aus 40 Ländern der Welt gemeldet worden (VAN DER ZWET 2002).

Abgesehen von den weiten Distanzen zwischen den einzelnen Befallsherden ist die Besonderheit dieser Verbreitung insbesondere die hohe Wirtspflanzenspezifität (MOMOL und ALDWINCKLE 2000). Bisher ist das Auftreten von *Erwinia amylovora* ausschließlich an Pflanzen aus der Familie der Rosaceen und hierbei meistens an Vertretern der Unterfamilie der Pomoidae nachgewiesen worden. Eine Gemeinsamkeit dieser Arten ist sicherlich in der sehr ähnlichen Blütenmorphologie und -anatomie zu sehen (VANNESTE 2000), weitere Indikatoren weshalb nur diese Familie vom Feuerbrand betroffen ist, sind bisher jedoch noch nicht genauer bekannt. Innerhalb dieser Obstarten sind Birnenpflanzen im Vergleich zu Äpfeln weitaus anfälliger (LESPINASSE und ALDWINCKLE 2000; DECKERS und SCHOOF 2002). Der Züchtungsbedarf an neuen weniger anfälligen bzw. resistenten Sorten und Unterlagen dieser beiden, wirtschaftlich bedeutenden Kernobstarten ist dabei sehr hoch (LESPINASSE und ALDWINCKLE 2000). Dass außer der genetischen Variabilität, die Unterlage, das Baumalter, die Bodenart und die Inokulumdichte wesentlichen Einfluss auf die Widerstandsfähigkeit von Sorten haben, zeigte sich in einem Versuch von VAN DER ZWET et al. (1984), bei dem die getesteten Birnenselektionen und -sorten an verschiedenen Standorten unterschiedliche Anfälligkeit aufwiesen. Im Zusammenhang mit der Resistenzzüchtung sollte auch die Gefahr einer verstärkten Ausbreitung des Erregers in Asien, dem Ursprungsland und daher großen Genreservoirs von Apfel und Birne, nicht vergessen werden.

Aufgrund der zahlreichen Kenntnisse des Feuerbranderreger und dessen Lebenszyklus besteht die Möglichkeit geeignete Bekämpfungsstrategien zu entwickeln. Ein Großteil der

Bekämpfungsmaßnahmen wird in der besonders kritischen Periode der Blühphasen durchgeführt. Denn gerade in dieser klimatisch günstigen Zeit – Temperaturen ab 18°C fördern die Vermehrungsrate des Erregers – und der Vielzahl an Eintrittsmöglichkeiten in das Pflanzengewebe – Blüten sind dabei mit ihren natürlichen Öffnungen wie den Stigmen und Antheren, den Hydathoden und Nektarthoden sehr geeignet – ist das Befallsrisiko besonders kritisch (ROSEN 1935). Das Vorhandensein von Sekundärblüten, eine erneute Wachstumsphase der Pflanzen sowie durch starken Wind, Hagel oder Insektenbefall verursachte Verletzungen, stellen jedoch für Sekundärinfektionen ebenso ideale Befallsorte dar. Birnensorten, welche vermehrt Nach- und Sekundärblüten bilden, sind dabei besonders anfällig, aber auch junge Blätter und Triebe sind zum einen durch ihr empfindliches Pflanzengewebe und zum anderen durch die im Laufe der Jahreszeit gebildete hohe Inokulumsdichte vermehrt gefährdet. Durch die raschen Ausbreitungsmöglichkeiten des Erregers im Xylem, Phloem und ebenso im kortikalen Parenchymgewebe in dieser sehr aktiven Phase der Obstgehölze, kann es schnell zu einem massiven Befall von größeren Baumpartien bis hin zu einem kompletten Absterben der Pflanzen kommen (VANNESTE und EDEN-GREEN 2000).

Abgesehen von Maßnahmen wie der regelmäßigen Kontrolle in Baumschulen – um ein Einschleppen des Erregers in Neupflanzungen zu vermeiden – und in Anbauflächen und angrenzenden Wirtspflanzenbeständen sowie einem raschem Entfernen von infiziertem Pflanzenmaterial – um eine weitere Übertragung und Neuinfektion zu verhindern – stehen mit der Entwicklung und Erforschung von Bekämpfungsmitteln, welche in die Physiologie der Obstpflanzen eingreifen, eine Reihe von Strategien zur Verfügung (STEINER 2000). Die Einschränkung der weiteren Ausbreitung der Feuerbrandkrankheit in befallsfreie Länder als auch die Reduktion von wirtschaftlichen Ausfällen in betroffenen Obstanbaugebieten kann nur durch eine Kombination von Wissen über den Erreger und die Krankheit mit den daraus entwickelten Bekämpfungsmaßnahmen erreicht werden.

1.2 Der Bioregulator Prohexadion-Ca

Ein ausgeglichenes vegetatives und generatives Wachstum von Obstbäumen ist vor allem hinsichtlich regelmäßiger Erträge und guter Fruchtqualitäten erforderlich (FORSHEY und ELFVING 1987). Um dies zu erzielen, werden im kommerziellen Anbau Wachstumsregulatoren zur Reduzierung des Längenwachstums eingesetzt. Die meisten Wachstumshemmer inhibieren dabei die Biosynthese der wachstumsfördernden

Gibberellinsäuren (GA) (RADEMACHER 1991). Neben den Wirkstoffen Daminozid, Chlormequatchlorid, Paclobutrazol und Trinexapacethyl greift Prohexadion-Ca ebenfalls in die Gibberellinbiosynthese ein und der ursprüngliche Einsatz dieses Mittels war daher der wachstumsregulierende Effekt (RADEMACHER 2000). Es zeigte sich jedoch in der Entwicklungsphase, dass mit Prohexadion-Ca behandelte Obstbäume ausser einem verringerten Sprosswachstum auch einen geringeren Befall an Feuerbrand, Schorf und Mehltau aufwiesen (YODER et al. 1999; COSTA et al. 2001, 2002; ALDWINCKLE et al. 2002; BUBÁN et al. 2002; BAZZI et al. 2003). Diese positive Wirkung gegenüber Pathogeninfektionen wurde im Rahmen eines von der Europäischen Kommission geförderten Projektes ausführlich untersucht und der Mechanismus konnte aufgeklärt werden (HALBWIRTH et al. 2003b).

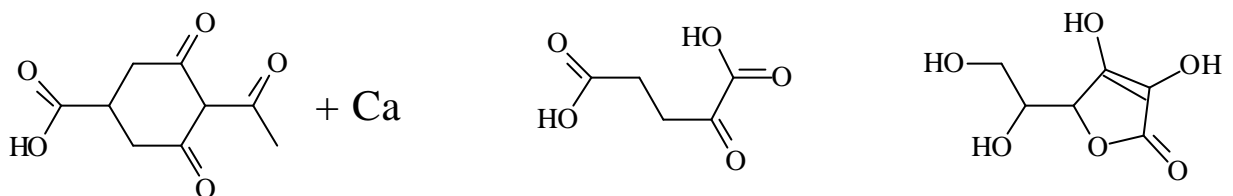


Abb. 1: Chemische Struktur von Prohexadion-Ca (links), 2-Oxoglutarinsäure (Mitte) und Ascorbinsäure (rechts)

Prohexadion-Ca weist deutliche Strukturähnlichkeiten mit der 2-Oxoglutarinsäure und der Ascorbinsäure auf (Abb. 1). 2-oxoglutarinsäureabhängige Dioxygenasen, welche um dieselben Bindungsstellen konkurrieren, können somit in ihrer Aktivität kompetitiv gehemmt werden. Diese Dioxygenasen sind sowohl bei der Gibberellinbiosynthese als auch bei der Ethylen- und der Flavonoidbiosynthese beteiligt (RADEMACHER 2000).

Gibberelline sind für die Zellstreckung und Zellteilung der Pflanzen von großer Bedeutung. Um nun eine Reduktion des Längenwachstums zu erreichen, greifen die meisten Wachstumsregulatoren als Inhibitoren in die Gibberellinsynthese ein und unterbinden die Bildung bestimmter Gibberelline (RADEMACHER 2000). Die Acylcyclohexandione, zu denen das Prohexadion-Ca zählt, hemmen aufgrund ihrer Struktur zwei entscheidende Enzyme, welche für ihre Aktivität 2-Oxoglutarinsäure als Co-Substrate und Fe^{2+} und Ascorbinsäure als Co-Faktoren benötigen. Eine der beiden Dioxygenasen ist das Schlüsselenzym GA_{20} -3 β -Hydroxylase, sie katalysiert die Bildung des biologisch hoch aktiven GA_1 aus dem inaktiven GA_{20} . Die Hydroxylierung an Position 2 β , was z.B. die Umwandlung des aktiven GA_1 in das

inaktive GA₈ zur Folge hat, kann durch Prohexadion-Ca ebenfalls blockiert werden. Die Blockade dieser beiden Enzymschritte sind die primären Wirkungsorte von Prohexadion-Ca in der Gibberellinbiosynthese (GRIGGS et al. 1991; NAKAYAMA et al. 1990).

Eine weitere Dioxygenase welche von Prohexadion-Ca gehemmt werden kann, ist die ACC-Oxidase in der Ethylensynthese. Dieses Enzym katalysiert, unter Beteiligung der Ascorbinsäure als Co-Substrat, die Bildung von Aminocyclopropancarboxylsäure (ACC) zu Ethylen (TURRIAGAGOITIA-BUENO et al. 1996). Ethylen ist wie die Gibberellinsäure ein wichtiges Phytohormone und ist daher an einer Vielzahl von Stoffwechselfvorgängen wie dem Blatt- und Fruchtfall, der Fruchtreife und auch an der Induktion von Blütenknospen beteiligt. Nach einer Behandlung mit Prohexadion-Ca wurden niedrigere Ethylengehalte und eine verzögerte Seneszenz festgestellt (GROSSMANN et al. 1989) und so kam es nach einer Behandlung oftmals zu verringertem Fruchtfall. Allerdings wurde bei Birnbäumen durch eine Überdosierung von Prohexadion-Ca ein Rückgang an Blütenknospenanlagen beobachtet.

Der dritte und für die vorliegende Arbeit wichtigste Eingriff von Prohexadion-Ca in einen Metabolismus ist der Effekt auf die Flavonoidbiosynthese. Durch die Strukturähnlichkeit mit der 2-Oxoglutarsäure können Dioxygenasen wie die Flavanon-3-Hydroxylase (FHT), die Flavonsynthase I (FNS I), die Flavonolsynthase (FLS) und die Anthocyanidinsynthase (ANS) von Prohexadion-Ca gehemmt werden (FORKMANN und HELLER 1999). Die Folgen der Blockade dieser Biosyntheseschritte sind zum einen die Nicht-Umsetzung zu bestimmten Substanzen wie z.B. den Dihydroflavonolen, welche wiederum Vorstufen zu weiteren Flavonoiden wie den Flavon(ol)en, den Flavanole und den Anthocyanidinen sind, und zum anderen die Akkumulation von Flavonoiden wie beispielsweise den Flavanonen. Zusätzlich zu den quantitativen Veränderungen im regulären Stoffwechsel werden durch die Anwendung von Prohexadion-Ca neue Phenylpropanoide induziert und somit qualitative Änderungen in der Flavonoidbiosynthese ausgelöst (RÖMMELT et al. 1999b, 2002, 2003a,b). Der reduzierte Befall von Feuerbrand und Schorf an Prohexadion-Ca-behandelten Apfel- und Birnbäumen beruht neben den pflanzenphysiologischen Veränderungen durch den Bioregulator somit vielmehr auf den Modifikationen im Sekundärstoffwechsel und den damit verknüpften resistenzinduzierenden phenolischen Inhaltsstoffen.

Aufgrund der Eingriffe von Prohexadion-Ca in diese drei Biosynthesen und den daraus resultierenden Veränderungen in und an den Pflanzen, wird dieser Wirkstoff nicht nur mehr als Wachstumsregulator, sondern vielmehr als Bioregulator mit einem breiten Wirkungsspektrum beschrieben. Allerdings unterscheidet sich der Anwendungsbereich von Prohexadion-Ca von Land zu Land ebenfalls. So wird der Wirkstoff beispielsweise zur

Verbesserung der Standfestigkeit bei Reispflanzen (in Japan) und bei Getreide (in Frankreich) angewandt (ÖSTERREICHER 2003). In den meisten Ländern ist Prohexadion-Ca jedoch als Wachstumsregulator und dabei vor allem im Apfel- und Birnenanbau zugelassen (RADEMACHER und KOBER 2003). Mit einer Sonderzulassung ist seit April 2002 in Deutschland im Kernobstanbau der Einsatz von Regalis[®] (mit einem Wirkstoffanteil von 10% Prohexadion-Ca) auch gegen Sekundärinfektionen des Feuerbrandereggers *Erwinia amylovora* genehmigt (SCHRÖDER et al. 2003). Dadurch, dass das Mittel sehr günstige toxikologische und ökotoxikologische Eigenschaften (sehr kurze biologische Halbwertszeit) aufweist, ist es mittlerweile auch im Integrierten Obstanbau zugelassen (EVANS et al. 1999; RADEMACHER und KOBER 2003).

Für eine optimale Wirkungsweise von Prohexadion-Ca sollten verschiedene Punkte beachtet werden: Der Wirkstoff wird hauptsächlich über das Blatt aufgenommen und in der Pflanze vor allem akropetal, zu einem geringen Teil auch basipetal, zu den wachstumsintensivsten Regionen transportiert. Die Wirkstoffaufnahme erfolgt innerhalb von 8 Stunden (EVANS et al. 1999), günstig wirkt sich dabei ein lang anhaltender Flüssigkeitsbelag auf der Blattoberfläche aus. Der wachstumshemmende Effekt zeigte sich bei Birnen im Vergleich zu Äpfeln erst bei einer 25-50% höheren Aufwandmenge (RADEMACHER und KOBER 2003). Generell sollten bei der Dosierung sowie beim Einsatzzeitpunkt die Parameter Pflanzenart, Sorte, Unterlage, Baumalter, Fruchtansatz, Wasser- und Nährstoffversorgung wie auch klimatische Bedingungen berücksichtigt werden (RADEMACHER und KOBER 2003).

1.3 Phenolische Inhaltsstoffe der Birne

1.3.1 Biosynthese der Phenylpropanoide

Phenylpropanoide sind in allen höheren Pflanzen vertreten und stellen einen der wichtigsten Bestandteile in Obstarten dar. Ihr Vorkommen ist nicht auf bestimmte Pflanzenteile beschränkt, sondern sie sind sowohl in Früchten, Blättern und Blüten als auch in Wurzeln, Holz und in der Rinde vorhanden. Ihre Funktion in der Biochemie, der Physiologie und in der Ökologie von Pflanzen ist ebenso breit gefächert wie ihre strukturelle Vielfalt. Die wichtigsten Schritte der einzelnen Klassen, ihre Modifikationen und die regulierenden Enzyme sind heute bis auf wenige Lücken bekannt. Die verschiedenen Biosyntheseschritte mit den jeweiligen Enzymen sind zum Überblick in Abb. 2 dargestellt.

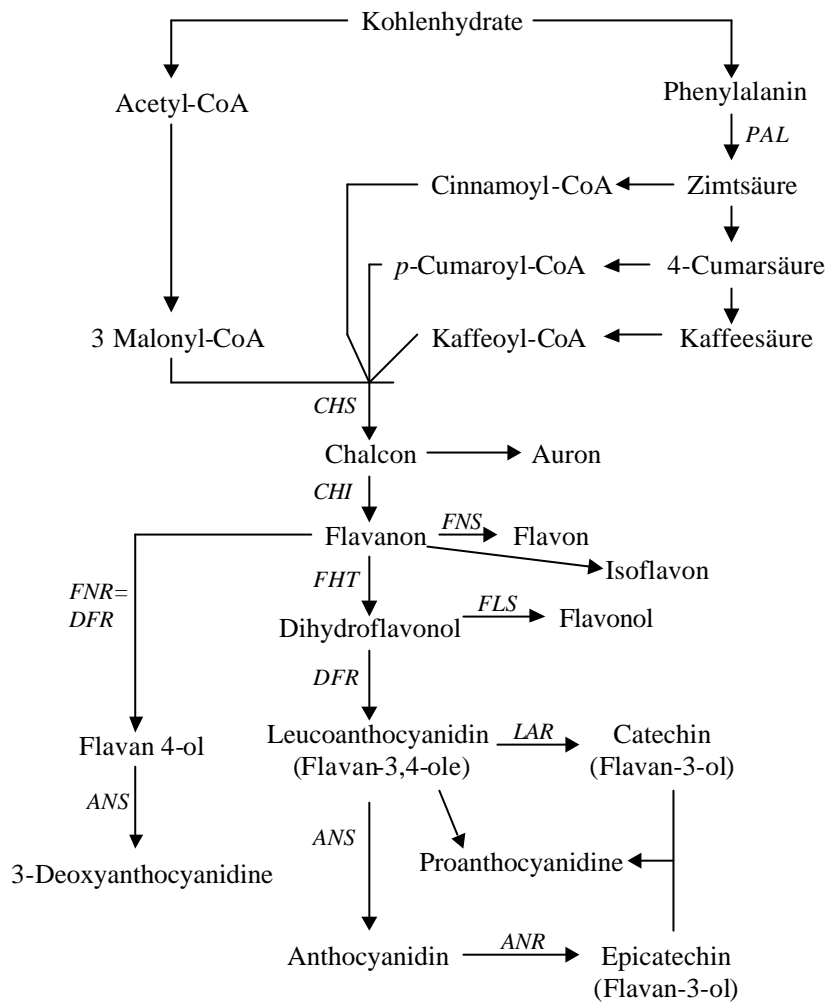


Abb. 2: Biosynthese der phenolischen Verbindungen (verändert nach FORKMANN und HELLER 1999 und XIE et al. 2004)

Mit einem Endprodukt des Shikimatweges, der aromatischen Aminoäure Phenylalanin, beginnt gleichzeitig der Phenolstoffwechsel. Durch Abspaltung der Aminogruppe wird Phenylalanin durch das Schlüsselenzym Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) zur *trans*-Zimtsäure umgewandelt. In dem anschließenden Schritt wird die *trans*-Zimtsäure durch Hydroxylierung durch die Zimtsäure 4-Hydroxylase (C4H) zur *p*-Cumarsäure umgesetzt und aus dieser kann durch weitere Hydroxylierung und Methylierung Kaffee-, Ferula-, oder Sinapinsäure gebildet werden. Alle diese Substanzen bestehen einheitlich aus einem C₆C₃-Grundkörper. Mit Hilfe der entsprechenden CoA-Ligasen können diese Substanzen zu den jeweiligen CoA-Estern umgewandelt werden. Diese Hydroxyzimtsäure-CoA-Ester bilden

nicht nur die Vorstufen zu den Flavonoiden, sondern sie sind auch Ausgangssubstanzen der Stilbene, Tannine und Lignine.

Nach der Aktivierung in eine der Hydroxyzimtsäure-CoA-Ester, wird diese schrittweise mit drei Molekülen Malonyl-CoA mittels der Chalkonsynthase (CHS) – welche als das Schlüsselenzym der Flavonoidbiosynthese angesehen wird – zum entsprechenden Chalkon kondensiert. Die Chalkone entstehen als erste Substanzen des Phenolstoffwechsels aus dem für die Flavonoide charakteristischen C_{15} -Grundgerüst. Durch Isomerisierung der Chalkone durch die Chalkonisomerase (CHI) entstehen die Flavanone, aus welchen wiederum durch Redoxreaktionen die verschiedenen Klassen der Flavonoide gebildet werden (HELLER und FORKMANN 1988).

Das C_{15} -Grundgerüst der Flavonoide besteht aus zwei aromatischen Ringen (Ring A und B) und einem Heterozyklus (Ring C) (Abb. 3).

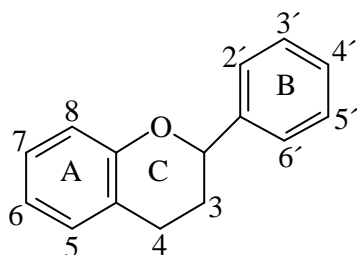


Abb. 3: Flavonoid-Grundgerüst

Flavanone sind direkte Vorstufen der Isoflavone, Flavone und Dihydroflavonole. Erstere entstehen durch einen Ring-Shift des B-Rings und die Flavone werden durch Einführung einer Doppelbindung im Heterozyklus zwischen C_2 und C_3 gebildet. Die Flavanon 3-Hydroxylase (FHT) katalysiert durch Hydroxylierung an Position 3 die Flavanone zu den Dihydroflavonolen. Bei der FHT handelt es sich um eine 2-oxoglutarat-abhängige Dioxygenase, welche neben dem 2-Oxoglutarat, Fe^{2+} , Ascorbinsäure und molekularem Sauerstoff als Cofaktoren benötigt. Auch die Flavonolsynthase (FLS) zählt wie die FHT zu den 2-oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen der Flavonoidbiosynthese. Durch das Einfügen einer Doppelbindung zwischen dem C_2 - und C_3 -Atom des C-Rings wandelt die FLS Dihydroflavonole zu Flavonolen um. Die Reduktion der Ketogruppe an Position 4 der Dihydroflavonole führt dagegen zu den Flavan 3,4-diolen, welche auch Leucoanthocyanidine genannt werden. Diese Reaktion wird von der Dihydroflavonol 4-Reduktase (DFR), einem

NADPH-abhängigen Enzym katalysiert. Flavan 3,4-diole stellen wiederum die unmittelbaren Vorstufen der Catechine und Anthocyanidine dar. Die Reduktion der Flavan 3,4-diole zu den Catechinen (= Flavan 3-ol) wird dabei durch die Leucoanthocyanidinreduktase (LAR) katalysiert und für die Umsetzung zu den Anthocyanidinen ist die Anthocyanidinsynthase (ANS) verantwortlich. Ausgehend von den Anthocyanidinen wird nach den aktuellen Erkenntnissen von XIE et al. (2004) durch die Anthocyanidinreduktase (ANR) das Flavan 3-ol Epicatechin gebildet. Die Enzyme, welche für die Synthese der Proanthocyanidine benötigt werden, sind bisher nicht genau bekannt. Es wird jedoch angenommen, dass diese Substanzen durch Kondensation von Catechin- und Epicatechin-Einheiten gebildet werden.

Die enorme strukturelle Vielfalt der Phenylpropanoide wird durch Hydroxylierung (Substitution von H-Atomen durch OH-Gruppen), Methylierung (Einführung einer CH₃-Gruppe anstelle von Hydroxylgruppen), Glykosidierung (Verknüpfung z.B. mit Glucose, Rutinose, Rhamnose, Galactose) und Acylierung (Verbindung z.B. mit Apfelsäure, Weinsäure oder Hydroxyzimtsäure) ermöglicht. Zusätzlich zu diesen Modifikationen der einzelnen Substanzen, können durch Kondensation von zwei oder mehreren Monomeren, oligomere oder polymere Substanzen gebildet werden (HELLER et al. 1994; FORKMANN und HELLER 1999).

1.3.2 Phenylpropanoiden in Birnen (*Pyrus communis*)

Die Birne (*Pyrus communis*) gehört wie der Apfel zu der Unterfamilie der Pomoidae der Familie der Rosaceen. Aufgrund dieser engen Verwandtschaft weisen diese Kernobstarten viele Ähnlichkeiten bezüglich ihrer phenolischen Inhaltsstoffe auf. Doch trotz der hohen Übereinstimmung in zahlreichen Syntheseschritten des Phenolstoffwechsels, differieren die beiden Arten sowohl in den Konzentrationen einiger Substanzen wie auch in der qualitativen Zusammensetzung von Phenylpropanoiden.

Vor allem in den 70er und 80er Jahren wurde die Birne hinsichtlich ihrer phenolischen Inhaltsstoffe untersucht. Der Schwerpunkt lag hierbei hauptsächlich auf dem generellen Vorkommen von Phenolen beispielsweise für die Chemotaxonomie (DUGGAN 1969; CHALLICE und WILLIAMS 1968 und 1970; CHALLICE 1973) als auch auf dem Zusammenhang zwischen bestimmten phenolischen Substanzen und der Resistenzinduktion (HILDEBRAND 1970; CHALLICE 1972).

Die Beteiligung der phenolischen Inhaltsstoffe der Birne an Abwehrreaktionen gegenüber Insekten (GERARD et al. 1993; SCUTEREAU et al. 1996, 1999) und Mikroorganismen

(TREUTTER und FEUCHT 1990b; KODOMA et al. 1998) ist auch in den aktuellen Studien Forschungsgegenstand. Zusätzlich beschäftigte man sich in einer Reihe an Untersuchungen mit den Unterscheidungsmerkmalen von Birnen und anderer Obstarten um z.B. in der Safftherstellung Qualitätsmerkmale festlegen zu können (WALD et al. 1989; SPANOS und WROLSTAD 1992; SCHIEBER et al. 2001). Die meisten dieser Untersuchungsergebnisse beziehen sich auf Inhaltsstoffe von Fruchtfleisch und –schalen von Birnenfrüchten (OLESZEK et al. 1994; HERRMANN 1996; ESCARPA und GONZALES 2000) und nur wenige mit Blatinhaltsstoffen (CHALLICE 1973; RYUGO et al. 1990; SCUTEREANU et al. 1999).

Der in der Frucht und im Blatt dominierende Hauptbestandteil von Birnen ist das Hydrochinon Arbutin (DUGGAN 1969; HILDEBRAND 1970; CHALLICE 1972; WALD et al. 1989; SPANOS und WROLSTAD 1992). BOURQUELOT und FICHTENHOLZ (zitiert nach WILLIAMS 1960) identifizierten diese Substanz in Birnen bereits 1911 und bislang wurde das Arbutin ausschließlich in Birnen nachgewiesen. Arbutin wird, aufgrund seiner chemischen Struktur nicht zu den phenolischen Säuren und nicht zu den Flavonoiden gezählt; es ist ein Hydrochinon-Monoglukosid d.h. der Grundkörper besteht aus einer C₆-Einheit (Abb. 4). Als Möglichkeiten der Synthese des Grundkörpers Chinon wird neben der Bildung über Intermediate des Shikimatweges oder über Hydroxycimtsäuren, die Entstehung aus Acetat- und Malonat-Bausteinen über Acetogenine und aus Mevalonsäure beschrieben (LEISTNER 1981; GROSS 1981). Nähere Angaben über die Biosynthese von Arbutin liegen jedoch nicht vor.

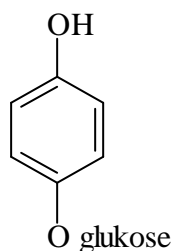


Abb. 4: Chemische Struktur von Arbutin (Hydrochinon)

Durch Glykosidierung von Arbutin durch die β -Glucosidase kann das Aglykon Hydrochinon entstehen, welches auf Mikroorganismen (HILDEBRAND und SCHROTH 1964b) z.B. auf *Erwinia amylovora* toxisch wirkt (BERG und GIBBINS 1983). ANDRADE et al. (1998) und SCHIEBER et al. (2001) weisen auf die hohe Polarität von Arbutin hin, welche sich in einer

geringen Retentionszeit in ihren Chromatographie-Systemen zeigt. Zusätzlich beschreiben SCHIEBER et al. (2001) in ihrer Untersuchung sortenbedingte Konzentrationsunterschiede bei dieser Substanz. So konnten sie nur geringe Hydrochinongehalte in den Früchten der Birnensorten `Alexander Lukas` und `Rote Williams` messen und in der Sorte `d'Anjou` konnte gar kein Arbutin nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu lagen in anderen Studien zwar ebenso sortenbedingte Differenzen im Gehalt dieses Hydrochinonglukosids vor, allerdings wurden hierbei Konzentrationen von 10-19mg/kg Frischgewicht im Fruchtfleisch und sehr hohe Gehalte in den Fruchtschalen in unterschiedlichen Sorten wie z.B. von `d'Anjou`, `Conference` und `Decana` von 34-630mg/kg Frischgewicht angegeben (SPANOS und WROLSTAD 1992; ESCARPA und GONZALES 2000).

An Hydroxyzimtsäure-Verbindungen konnten in Birnen die *p*-Cumarsäure, die Kaffeesäure und die Ferulasäure (ESCARPA und GONZALES 2000; SCHIEBER et al. 2001) (Abb. 5), die 3,5-*O*- und die 4,5-*O*-Dicaffeoylchinasäure (WALD et al. 1988; LATTANZIO et al. 2002), die *p*-Cumaroylchinasäure (SCHIEBER et al. 2001), und die 3-*O*-,4-*O*- und 5-*O*-Caffeoylchinasäure (Neo-, Krypto-, Chlorogensäure) (RISCH und HERRMANN 1988; AMIOT et al. 1995; ESCARPA und GONZALES 2000) (Abb. 6) identifiziert werden.

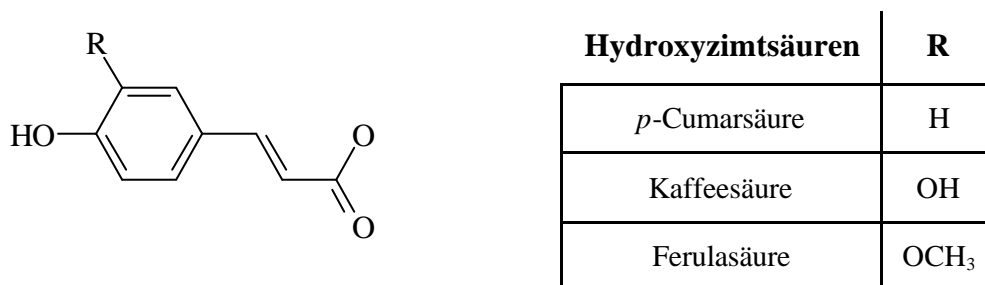


Abb. 5: Chemische Struktur von Hydroxyzimtsäuren

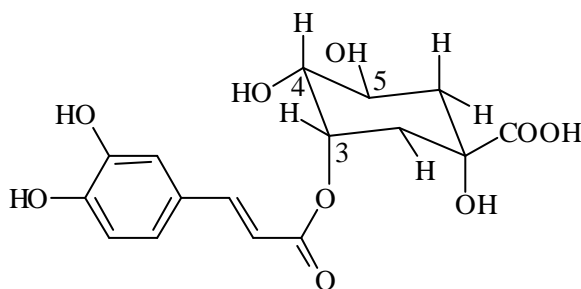


Abb. 6: Chemische Struktur von Neochlorogensäure (3-*O*-Caffeoylchinasäure)

Die Flavanone sowie die Flavone haben bei den in Birnen nachgewiesenen Phenolklassen eher eine Außenseiterrolle. So beschreiben nur (CHALLICE und WILLIAMS 1970) eine Umsetzungsaktivität einer Phenolase von Dihydrochalkonen zu dem Flavanon Naringenin. Ebenfalls nach CHALLICE und WILLIAMS (1970) kommen nur in ostasiatischen Birnen Apigenin- und Luteolinglykoside aus der Phenolklasse der Flavone vor.

Als Aglyka der in Birnen vorkommenden Flavonolglykoside werden Quercetin und Isorhamnetin und Kämpferol angegeben (DUGGAN 1969; WALD und GALENSA 1989)

(Abb. 7).

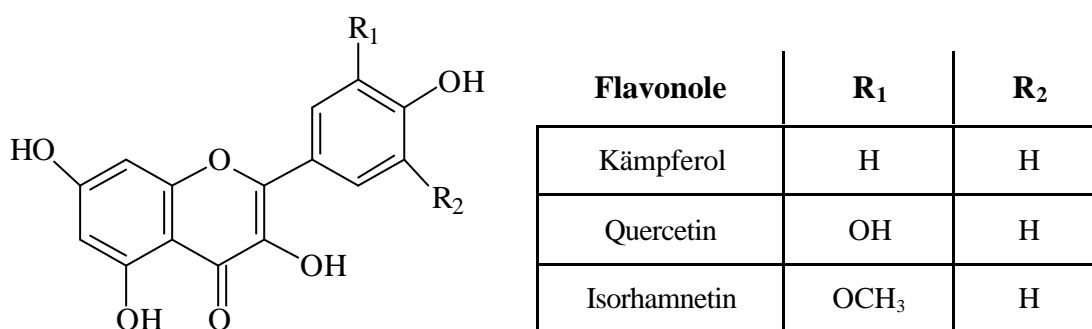


Abb. 7: Chemische Struktur von Flavonolen

Neben den dominierenden Substanzen Quercetin-3-*O*-glukosid, Quercetin-3-*O*-rutinosid, Quercetin-3-*O*-galaktosid, Isorhamnetin-3-*O*-glukosid und Isorhamnetin-3-*O*-rutinosid (WALD und GALENSA 1989; SPANOS und WROLSTAD 1990 und 1992; SCHIEBER et al. 2001) sind mit geringen Konzentrationen Quercetin-, Isorhamnetin-, Kämpferol-Malonyl-Glykoside, Quercetin-3-*O*-xylosid, Isorhamnetin-3-*O*-galaktosid und Isorhamnetin-3-*O*-galaktorhamnosid (WALD et al. 1989; OLESZEK et al. 1994) in Birnen nachgewiesen worden. Außer den relativ hohen Gehalten an Isorhamnetin-3-*O*-glukosid mit 3-9mg/kg Frischgewicht in Birnenfrüchten, hat dieses Flavonolglykosid die Sonderstellung, dass es wie Arbutin nicht im Apfel aber in der Birne vorkommt (WALD und GALENSA 1989; SCHIEBER et al. 2001).

Von den Catechinen (= Flavan-3-olen) liegen in Birnen hauptsächlich die monomeren Einheiten (+)-Catchin und (-)-Epicatechin vor (Abb. 8). Die Gehalte von Epicatechin sind dabei im Vergleich zu den Catechin-Gehalten zum Teil um das dreifache höher (HERRMANN 1996; ESCARPA und GONZALES 2000).

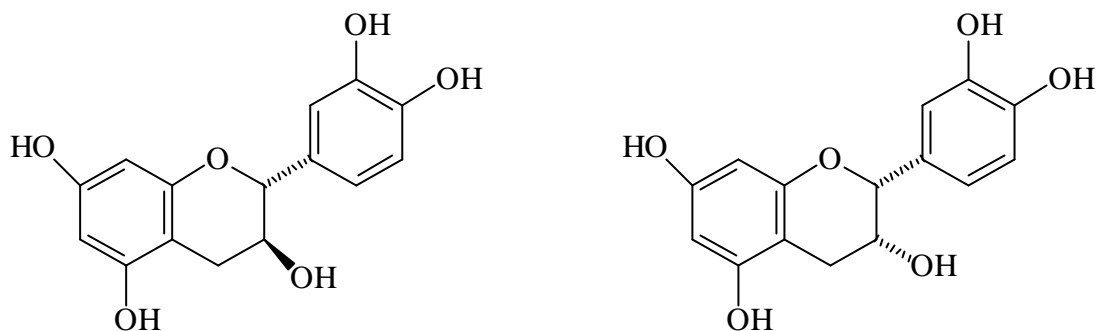


Abb. 8: Chemische Struktur der monomeren Flavan-3-ole (+)-Catechin (links) (-)-Epicatechin (rechts)

SPANOS und WRÖLSTAD (1990 und 1992) konnten in den Fruchtschalen von Birnen die Procyanidine B1, B2, B3, B4, trimere und tetramere sowie weitere 8 bisher nicht weiter identifizierte Procyanidine nachweisen (Abb. 9).

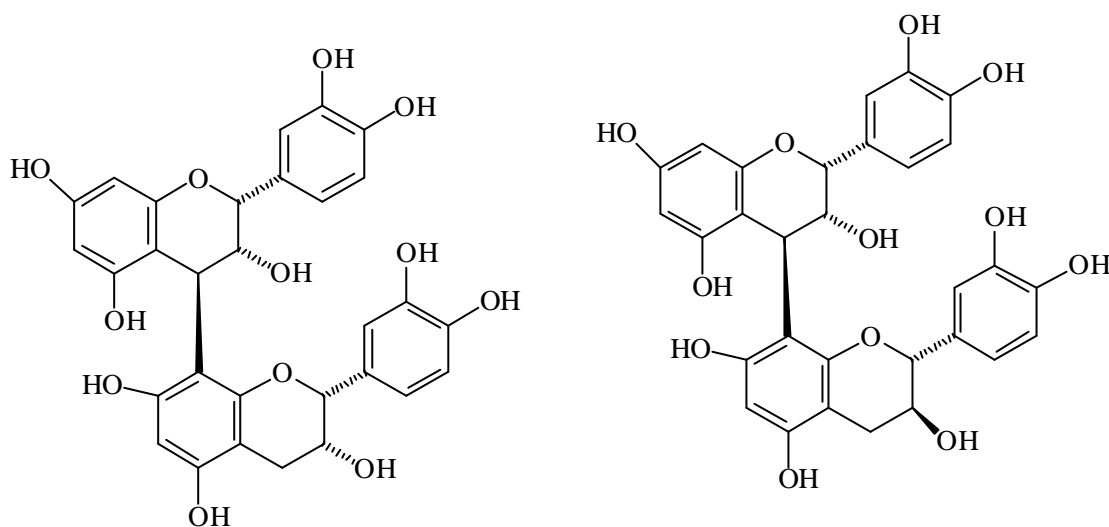


Abb. 9: Chemische Struktur der Procyanidine B2 (links) und B1 (rechts)

1.3.3 Einfluss exogener und endogener Faktoren auf die Phenylpropanoid-biosynthese

Der Vergleich von Ergebnissen phenolischer Inhaltsstoffe aus verschiedenen Studien wird nicht allein durch die Verwendung unterschiedlicher HPLC-Systeme (z.B. Lösungsmittel und Gardienten) beeinträchtigt, sondern es gibt eine Vielzahl von exogenen und endogenen Faktoren, welche einen Einfluss auf die Zusammensetzung dieser Gruppe der Inhaltsstoffe haben und welche somit eine entscheidende Rolle bei dem zu untersuchenden Pflanzenmaterial haben.

Da die Pflanze ein komplexes System mit unzähligen miteinander verknüpften Prozessen darstellt, zeigte sich in Untersuchungen, dass der Phenolstoffwechsel z.B. von Standortbedingungen (BAUER 1991) ebenso abhängig ist wie von der alters- und jahreszeitlich bedingten Entwicklung der Pflanze (MAYR et al. 1995).

Bei den Nährstoffelementen hat besonders der Stickstoff eine große Bedeutung bezüglich des Phenolgehaltes (FEUCHT und TREUTTER 1989). Ein Wechselspiel zwischen dem Phenolstoffwechsel und dem in Konkurrenz stehenden Stickstoffwechsel wurde bereits 1977 von MARGNA angenommen. Demnach kommt es bei einem hohen Stickstoffangebot zu einer Bevorzugung des Primärstoffwechsels und zu einer Reduzierung des energieaufwendigeren Sekundärstoffwechsels. RÜHMANN et al. (2002) stellten in ihren Untersuchungen ebenfalls einen Zusammenhang zwischen dem Stickstoffangebot und dem Phenolstoffwechsel fest, indem sie herausfanden, dass starkwachsende Apfelbäume einen niedrigeren Phenolgehalt als schwachwachsende Bäume aufweisen und zum anderen, dass eine luxuriöse Stickstoffversorgung neben einer Verminderung des Phenolgehalts auch zu einer erhöhten Schorfanfälligkeit führt. Eine Reduktion der Aktivität der an der Flavonoidbiosynthese beteiligten Enzyme und damit einhergehend eine Erniedrigung des Phenolgehalts aufgrund eines erhöhten Stickstoffangebotes bestätigte sich bei STRISSEL et al. (2003).

Sowohl die Schnittstelle zwischen dem Primär- und Sekundärstoffwechsel, das Enzym Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) (CHAPPELL und HAHLBROCK 1984; JU et al. 1995), als auch die Anthocyanidinsynthase (ANS) sind von dem Faktor Licht beeinflussbar (DRUMMHERREL 1987). Besonders deutlich ist diese Abhängigkeit bei der ANS beispielsweise bei einer schwachen Fruchtausfärbung in weniger belichteten Obstbaumbereichen zu beobachten. Desweiteren ist bekannt, dass die Temperatur sowie die Wasserversorgung die Phenolbildung beeinflussen kann (FEUCHT und TREUTTER 1989; LEYVA et al. 1995). Neben dem Einfluss der hier angeführten Kulturmaßnahmen auf den Phenolstoffwechsel spielen auch endogene

Faktoren wie Sorten und Blattalter eine Rolle bezüglich der Phenolzusammensetzung. TREUTTER und FEUCHT (1990a) konnten bei einem Vergleich von schorffresistenten und – anfälligen Apfelsorten einen konstitutiv höheren Gehalt an Flavanolen in den resistenten Sorten nachweisen. Nach einer Infektion mit dem Schorferreger zeigten die resistenten Blätter sogar einen um das 6,5fache höheren Gehalt dieser Phenolklasse als in anfälligen Blättern. Zusätzlich zu diesen quantitativen Unterschieden waren ebenso qualitative Unterschiede in der Zusammensetzung der Flavanolmuster zu erkennen.

Der Gehalt an Phenolen ist ebenfalls von der Blatt- und Fruchtentwicklung abhängig. Hinweise auf eine niedrigere PAL-Aktivität in jungen Blättern und Sprossspitzen als in älteren voll entwickelten Blättern ergaben sich in Untersuchungen von MICHALEK (1997) und MAYR et al. (1997). Die Folge dieser Einschränkungen dieses für die Flavonoidbiosynthese limitierenden Enzyms waren geringere Gehalte an monomeren Flavanolen und Chlorogensäure im jüngsten Pflanzenmaterial. HILDEBRAND und SCHROTH (1964b) stellten zwar in Birnen keine Veränderungen im Gehalt von Arbutin bei zunehmendem Blattalter fest, allerdings war die β -Glucosidase-Aktivität in jungen Blättern generell höher. Eine bei Pathogenbefall erhöhte Oxidationsrate von Arbutin durch Phenoloxidasen (PPO) fand dagegen vor allem in älteren Blättern statt und die Konsequenz daraus war eine Abnahme des Arbutinlevels aufgrund der vermehrt gebildeten Oxidationsprodukte (POWELL und HILDEBRAND 1970). Eine Reduktion des Gesamtphenolgehaltes von Birnen bei zunehmendem Blattalter bestätigte sich in Studien von LATTANZIO et al. (2002).

Modifikationen im Phenolstoffwechsel können zusätzlich auch durch Stresssituationen wie Verwundung oder Pflanzenschutzmittelbehandlungen ausgelöst werden. Eine Akkumulation von Chlorogensäure und Flavanolen in Apfelblättern und –früchten konnte durch verschiedene Arten der Verwundung erzielt werden (MAYR et al. 1994). Dass Pflanzenstärkungsmittel ebenfalls als chemische Stressoren wirken können und damit eine Induktion der Phenolbildung hervorgerufen werden kann, was wiederum die Abwehrreaktion gegen Pathogenbefall unterstützt, beschrieben MICHALEK et al. (1999). Seit ein paar Jahren ist außerdem bekannt, dass der Bioregulator Prohexadion-Ca zusätzlich zu den Veränderungen des Pflanzenhabitus, die Flavonoidbiosynthese beeinflusst (RÖMMELT et al. 1999; SCHLANGEN et al. 2003; GOSCH et al. 2003).

1.3.4 Bedeutung der Phenylpropanoide für die Resistenzinduktion

Bei der Resistenzwirksamkeit sind meist nicht allein die einzelnen Verbindungen ausschlaggebend, sondern ebenso wichtig ist die Schnelligkeit einer Pflanzenzelle eine ausreichende Menge an Substanzen an der richtigen Stelle produzieren zu können (HARBORNE 1982). Generell können die Phenole dabei unterteilt werden in unlösliche Verbindungen, welche hauptsächlich als physikalische Barrieren das Eindringen von Schaderregern in Pflanzengewebe und Wunden verhindern (z.B. Lignin, Suberin/Cutin) und in lösliche Substanzen. Die löslichen, niedermolekularen Substanzen lassen sich dabei nach dem Zeitpunkt ihrer Bildung weiter in Abwehrstoffe, die vor einer Infektion schon vorhanden sind sogenannte präinfektionelle, konstitutive Verbindungen und in nach einer Infektion gebildete (= postinfektionelle) Substanzen unterscheiden (FEUCHT und TREUTTER 1989). Die phenolischen Verbindungen, welche an der unter anderem durch Chemikalien oder Mikroorganismen ausgelösten „Induzierten Resistenz“ beteiligt sind, stammen nicht nur aus einer einzigen Phenolklasse. Vielmehr sind Substanzen aus verschiedenen Stufen des Phenolstoffwechsels induzierbar. Auf eine Beziehung zwischen den induzierten Substanzen und den konstitutiv vorhandenen phenolischen Inhaltsstoffen weist HARBORNE (1994) hin, nachdem er nach einer Infektion anstelle der typischen Phytoalexine von Rosaceen (Biphenyle und Di-Benzofurane) Substanzen nachgewiesen hat, welche eine Verwandtschaft mit konstitutiven Phenolen aufweisen. So wird beispielsweise in Birnen aus Arbutin – einem konstitutiven Hauptbestandteil von Birnen - enzymatisch das toxisch wirksame Hydrochinon gebildet (HARBORNE 1994).

Nach einer Feuerbrandinfektion an Apfelpflanzen beschrieben RÖMMELT et al. (2002) außer einem erhöhten Gesamtphenolgehalt die Neubildung von verschiedenen Hydroxyzimtsäure-Derivaten. Auch SCUTERIANU et al. (1999) wiesen sowohl nach einem Birnenblattsaugerbefall als auch nach künstlicher Verwundung von Birnenblättern, neu induzierte Verbindungen aus der Klasse der Hydroxyzimtsäuren nach.

Als Folge einer Birnenverfall-Krankheit (pear decline) wurde im Gegensatz zu gesunden Blättern in befallenen Blättern das Anthocyanidin Cyanidin-3-O-glukosid synthetisiert (LATTANZIO et al. 2002).

Dass eine Neusynthese von phenolischen Verbindungen nicht nur nach einem Pathogenbefall vorzufinden ist, zeigen Untersuchungen an Äpfeln nach einem Bioregulatoreinsatz. Die neugebildeten Substanzen gehören zu den Phenolklassen der Hydroxyzimtsäuren, der Flavanone und zusätzlich zu den 3-Deoxycatechinen. Die

Besonderheit der 3-Deoxycatechine, welche zu der Klasse der 3-Deoxyflavonoide zählen, ist, dass diese Gruppe der Phenole nur in wenigen Pflanzenarten gebildet wird (HARBORNE 1966; STICH und FORKMANN 1988a,b; MÜLLER-HARVEY und REED 1992; LO et al. 1999) und normalerweise in der Familie der Rosaceen nicht vorliegt.

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial

2.1.1 Gewächshaus und Freiland

Das, in den Experimenten der Kap. 3.2.1, 3.2.2, 3.2.3.1 und 3.2.3.3 verwendete Blattmaterial stammte von Birnenpflanzen, welche in einem Gewächshaus kultiviert und zu den jeweiligen Versuchen in abgeschlossene Gewächshauskammern umgestellt wurden. Für die einzelnen Versuche wurden Pflanzen im gleichen Alter mit einem Haupttrieb und von einheitlichem Wuchs und Größe ausgewählt. Um den Einfluss des ontogenetischen Blattalters einzugrenzen wurden zu Versuchsbeginn die drei bzw. zwei jüngsten (fertig ausgebildeten, entrollten) Blätter eines Triebes markiert.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden mit drei, in ihrer Feuerbrandanfälligkeit unterschiedliche Birnengenotypen verwendet. Nachfolgend werden die einzelnen Genotypen mit einigen Merkmalen charakterisiert:

‘Abate Fétel’

Diese Sorte wird hauptsächlich in Italien, Frankreich und Spanien als Tafelbirne im Erwerbsanbau angebaut. Sie ist 1869 in Frankreich entstanden. Sie ist leicht schorf- und chloroseanfällig. In künstlichen Inokulationsexperimenten mit dem Feuerbranderreger *Erwinia amylovora* wurde diese Sorte aufgrund einer Befallshäufigkeit von 3 (= mittlere Stufe) und einem Befallsgrad von 4 (= 2.höchste Stufe) in der 3. Klasse (von insgesamt 5 Klassen) des Sortenanfälligkeitsindex eingestuft (LE LEZEC et al. 1997). Auch von VAN DER ZWET und BELL (1995) und CALZOLARI et al. (1999) beschreiben diese Sorte als hochanfällig gegen *Erwinia amylovora*.

‘Pyrodwarf’

Diese Unterlage stammt aus einer 1980 in Geisenheim durchgeführten Kreuzung der Birnensorten ‘Old Home’ x ‘Gute Luise’. Sie wird als schwachwüchsig, mit einer sehr guten Sortenverträglichkeit angegeben. Von Bedeutung für die vorliegende Arbeit war allerdings, dass sie den feuerbrandresistenten Elternteil ‘Old Home’ enthält und ihre Feuerbrandempfindlichkeit daher als mittelanfällig eingestuft wird (JAKOB 1997 und 1998).

‘Harrow Sweet’

Diese Sorte ist 1965 in der kanadischen Forschungsstation Harrow, Ontario, aus Kreuzungen von ‘Williams’ und ‘Purdue 80-51’ (‘Old Home’ x ‘Early Sweet’) entstanden. Ihre

herausragende Besonderheit ist die hohe Feuerbrandresistenz (HUNTER et al. 1992). LE LEZEC et al. (1997) ordnet 'Harrow Sweet' als die resistenteste Birnensorte in der 1. Klasse des Sortenanfälligkeitsindex mit einem Befallsgrad von 2 und einer Befallshäufigkeit von 1 ein.

Für die Isolierung und Identifizierung der phenolischen Inhaltsstoffe wurden ausschließlich Blätter der Birnensorten 'Conference', 'Bunte Juli' und 'Williams' verwendet. Geerntet wurden das erste, zweite und dritte Blatt von vergleichbaren Trieben von ca. 200 Bäumen. Die Nutzung dieser im Versuchsgelände der Fachhochschule Weihenstephan, Institut für Baumschule, angepflanzten Birnbäume wurde dankenswerter Weise von Herrn Helm und Herrn Sturm ermöglicht.

2.1.2 Gewebelabor

Die Anzucht und Versuchsdurchführung wurde im Gewebelabor durchgeführt. Die Pflanzen für das Experiment in Kap. 3.2.3.2 wurden zur Vermehrung auf einem für Birnenpflanzen modifizierten Murashige-Skoog-Medium (Tab. 1, 2 und 3) in 15cm hohen Gläsern mit einem Durchmesser von 2cm, kultiviert. Zur Versuchsdurchführung wurden jeweils fünf Pflanzen zusammen in ein größeres Glas (5cm hoch, Durchmesser 6cm) auf ein zweites modifiziertes Murashige-Skoog-Medium (Tab. 1, 2 und 3), welches die Seitensprossproduktion weitestgehend unterdrückt, umgesetzt. Auf einen relativ einheitlichen Wuchs der Pflanzen (Sprosslänge, Blattanzahl) in den einzelnen Gläsern innerhalb eines Genotyps sowie beim Vergleich zwischen den Genotypen wurde Wert gelegt. Für den *in-vitro*-Versuch wurden dieselben Genotypen wie im Gewächshaus, 'Abate Fétel', 'Pyrodwarf' und 'Harrow Sweet', verwendet. Vor einer Behandlung wurde auf das viertjüngste voll entwickelte Blatt jeder Pflanze mit Nagellack ein Markierungspunkt gesetzt. Messdaten wie Frischgewicht, Sprosslänge, Blattanzahl und Seitensprossanzahl wurden von jeder einzelnen Pflanze aufgezeichnet. Um jedoch eine Mindestmenge an Blattmaterial für die HPLC-Analysen zu erreichen, wurden die fünf Pflanzen (bzw. jeweils die drei über dem markierten Blatt gewachsenen Blätter) von jedem Glas zu einer Mischprobe zusammengefasst.

Tab. 1: Zusammensetzung der Makro- und Mikro-Nährstoffe der *in-vitro*-Medien

<i>Makro MS:</i> ad 1000ml (Murshige & Skoog 1962)	<i>Makro VK:</i> ad 1000ml	<i>Mikro MS:</i> ad 100ml (Murshige & Skoog 1962)
(NH ₄)NO ₃ : 16,5g	(NH ₄)NO ₃ : 14,1g	MnSO ₄ *H ₂ O: 1690mg
KNO ₃ : 19,0g	KNO ₃ : 19,0g	KJ: 83mg
CaCl ₂ *2H ₂ O: 4,4g	Ca(NO ₃)*4H ₂ O: 7,1g	ZnSO ₄ *7H ₂ O: 870mg
KH ₂ PO ₄ : 1,7g	KH ₂ PO ₄ : 1,7g	Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O: 1ml
MgSO ₄ *7H ₂ O: 3,7g	MgSO ₄ *7H ₂ O: 3,7g	H ₃ BO ₃ : 620mg
		CuSO ₄ *5H ₂ O: 1ml
		CoCl ₂ *6H ₂ O: 1ml

Tab. 2: Zusammensetzung der verwendeten Medien (VP für Vermehrung; P1 für Versuch) (Teil 1)

	<i>VP</i>	<i>P1</i>
Mikro MS	1	1
Makro VK	100	
Makro MS		100
Agar [g]	9	9
GA ₃ (0,5mg/ml) [ml]	-	1
IBS (0,5mg/ml) [ml]	0,2	0,4
BAP (0,25mg/ml) [ml]	4	2
Saccharose [g]	30	30
NaFeEDTA [ml]	4	4
FeSO ₄ /Na ₂ EDTA [ml]	10	10
Glycin (2mg/ml) [ml]	2	-

Tab. 3: Zusammensetzung der verwendeten Medien (VP für Vermehrung; P1 für Versuch) (Teil 2)

	<i>VP</i>	<i>P1</i>
Nicotinsäure (10mg/ml) [ml]	0,01	-
Pyridoxin*HCl (50mg/ml) [ml]	0,02	-
Thiamin (0,4mg/ml) [ml]	2,5	1
Myo-Inosit (100mg/ml) [ml]	1	1
pH vor Autoklavieren	5,7	5,7
pH nach Autoklavieren	6,4	6,4

2.2 Behandlung mit Prohexadion-Ca

2.2.1 Gewächshaus und Freiland

Im Gewächshaus erfolgte die Behandlung mit Prohexadion-Ca mit Pumpzerstäubern. Die Blätter wurden dabei mit der Lösung in der Konzentration 250ppm oder 125ppm tropfnaß besprüht. 250ppm bzw. 100ppm entspricht bei 10% Wirkstoffanteil in der zur Verfügung stehenden Formulierung BAS 125 10W 2,5g bzw. 1,25g Granulat in 1 Liter Leitungswasser. Bei den im Freiland angepflanzten Birnbäume wurde die Applikation der Prohexadion-Ca-Lösung, mit der Konzentration von 250ppm, mit einer Rückenspritze durchgeführt.

2.2.2 Gewebelabor

Um phytotoxische Reaktionen zu vermeiden wurde in dem Experiment mit *in-vitro*-Pflanzen die Konzentration von 100ppm verwendet. 100ppm entspricht bei 10% Wirkstoff in der Formulierung BAS 125 10W: 1,0g Granulat in 1Liter destilliertem Wasser. Diese Prohexadion-Ca-Lösung wurde autoklaviert und 100µl Lösung wurde unter sterilen Bedingungen jeweils auf das Medium der vorbereiteten Versuchsgläser (siehe Kap. 2.1.2) pipettiert.

2.3 Inokulation mit dem Feuerbranderreger *Erwinia amylovora*

2.3.1 Anzucht der Bakterienstämme

Für die Inokulationsversuche wurden von Hr. K.Richter von der Bundesanstalt für Züchtungsforschung (BAZ) an Kulturpflanzen in Aschersleben bereitgestellte

Bakterienstämme verwendet. Die von Birnbäumen isolierten Stämme erwiesen sich in den Virulenzprüfungen der BAZ als hoch virulent (KLAUS RICHTER, pers. Mitteilung 2001).

Zur Erhaltung wurden die Isolate auf dem YDC-Medium (für 1 Liter Medium: 10g Hefe-Extrakt, 20g Glucose, 30g Calciumcarbonat, 17g Agar, pH-Wert 7,4) aufbewahrt. Für die Experimente und zur Vermehrung wurden die Bakterien auf modifiziertes Miller-Schroth-Medium (für 1 Liter Medium: 8g Nutrient Broth, 50g Saccharose, 20g Agar, pH-Wert 7,6) umgesetzt.

2.3.2 Suspensionsherstellung

Zwei Tage vor Versuchsdurchführung wurden die Bakterien auf das Vermehrungsmedium aufgetragen und bei 27°C vorkultiviert. Nach diesem zweitägigen Wachstum wurden die Bakterien mit steriler 0,6%igen Natrium-Chlorit-Lösung abgeschwemmt und die Konzentration im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 660nm auf eine Extinktion von 0,2 eingestellt. Diese Konzentration von 1×10^8 Zellen/ml wurde anschließend für die Inokulation auf eine Konzentration von 1×10^7 Zellen/ml verdünnt.

2.3.3 Inokulation der Blätter mit *Erwinia amylovora*

Die Inokulationsexperimente erfolgten ausschließlich in geschlossenen Gewächshauskammern der Bayerischen Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau, Institut Pflanzenschutz. Freundlicherweise wurden diese Gewächshauskammern, welche die speziellen Auflagen zur Feuerbrandversuchsverordnung erfüllen, von Dr. W. Kreckl zur Verfügung gestellt.

Die Blattspitzen eines markierten Triebes wurden mit einer Schere, welche zuvor in die Bakteriensuspension eingetaucht wurde, abgeschnitten. Zusätzlich wurden die Schnittstellen anschließend für wenige Sekunden ebenfalls in die Suspension getaucht. Um die Wundreaktionen ebenso zu erfassen, wurden die Blätter der Kontrollpflanzen mit sterilen Scheren angeschnitten und in Wasser getaucht.

Nach der Inokulation wurde die Temperatur in der Pflanzenkammer auf 25°C und die relative Luftfeuchte auf 80% eingestellt. 24 Stunden später ist die Temperatur langsam auf 20°C abgesenkt und die relative Luftfeuchte auf etwa 50% gehalten worden.

2.4 Quantitative Analytik der phenolischen Inhaltsstoffe mit HPLC

2.4.1 Probenvorbereitung und Extraktion für die chemische Analyse

Für die chemische Analyse wurden die Blätter einzeln in Alufolie verpackt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur Lyophilisierung mittels Gefriertrocknung blieben die Blattproben bei -20°C eingefroren. Im Anschluß an die Gefriertrocknung von zwei Tagen wurden die Blätter in einem Mörser pulverisiert und mit Methanol aufgenommen. Pro 100g Trockengewicht der Probe wurden 5ml des internen Standards Flavon (0,1 mg/ml) hinzugefügt. In einem gekühlten Ultraschallbad wurden die Proben für 30 Minuten extrahiert, anschließend 10 Minuten zentrifugiert und der Extrakt vom unlöslichen Rückstand getrennt. Danach wurde der Extrakt in einer Vakuumzentrifuge (Firma Kraupa) bis zur Trockene eingengt. Die Wiederaufnahme der Proben für die HPLC-Analysen erfolgte mit der Zugabe von 5ml Methanol pro 100g Trockensubstanz.

2.4.2 HPLC-Gradient und Detektion

Die Trennung und quantitative Bestimmung der phenolischen Inhaltsstoffe von Birnenblättern erfolgte mit einer Kombination aus Hochdruckflüssigkeitschromatographie mit UV-Detektion (bei 280nm) und einer Nachsäulenderivatisierung (TREUTTER 1989). Grund für die Verwendung der Nachsäulenderivatisierung mit dem Färbereagenz *p*-Dimethylaminozimtaldehyd (DMAZA) ist die Überlagerung der Catechine und Proanthocyanidine von Hydroxyzimtsäuren (TREUTTER 1991). Zusätzlich ist die Bestimmung der Flavanole wegen ihrer relativ geringen molaren Extinktion mit einer UV-Detektion bei 280nm nur eingeschränkt möglich. Mit der Zumischung des Reagenz DMAZA nach der Trennung der phenolischen Verbindungen mit der HPLC entstehen durch selektive Bindung des Reagenz an Flavanole vorübergehend Derivatisierungsprodukte, welche bei der Wellenlänge von 640nm sensitiv detektiert werden können (TREUTTER 1989).

Die Trennung der phenolischen Inhaltsstoffe mit HPLC-Analysen wurden mit folgendem Gradienten (Tab. 4) an den nachfolgenden Geräten (Tab. 5) durchgeführt:

Tab. 4: Lösungsmittel-Gradient für HPLC-Analyse (TREUTTER et al. 1994)

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

Tab. 5: Liste der HPLC-Geräte mit Diodenarraydetektor und Nachsäulenderivatisierung

	<i>System 1</i>	<i>System 2</i>
Probengeber	Gilson-Abimed Modell 231	Gilson-Abimed Modell 231
Pumpen	Kontron Modell 422	Kontron Modell T-414
	Gynkotec Modell 300 C	Gynkotec Modell 300 C
Gradientenformer		Kontron Modell 205
Detektoren	Diodenarraydetektor, Bio Tek Kontron 540+, 280nm	Kontron Uvikon Modell 740 LC, 280nm
	Kontron Detektor 432, 640nm	Gynkotec VIS, 640nm
Datenverarbeitung	Chromatographie-Datensystem Gynkosoftware Version 3.12 Kroma 2000/ Kroma 3000	Chromatographie-Datensystem Gynkosoftware Version 5.50
Säule	250mm x 4mm (ID), gefüllt mit Shandon ODS Hypersil 3µm	250mm x 4mm (ID), gefüllt mit Shandon ODS Hypersil 3µm
Lösungsmittel	A: 5 %ige Ameisensäure B: Methanol gradient grade	A: 5 %ige Ameisensäure B: Methanol gradient grade

Durchfluss	0,5 ml/min	0,5 ml/min
Nachsäulen-derivatisierung	gestrickte PTFE-Kapillare, Länge 9m, Innendurchmesser 0,5mm; 1% DMAZA in MeOH p.A. / H ₂ SO ₄ , 3N (11/1) (v/v)	gestrickte PTFE-Kapillare, Länge 9m, Innendurchmesser 0,5mm; 1% DMAZA in MeOH p.A. / H ₂ SO ₄ , 3N (11/1) (v/v)

2.4.3 Quantitative Auswertung und Responsfaktoren

Mit folgender Formel kann die Konzentration (bezogen auf die Trockensubstanz) der einzelnen Substanzen über deren Peakfläche mit den jeweiligen Responsfaktoren bestimmt werden:

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

Konz Konzentration [mg/g Trockensubstanz]

RF Responsfaktor = Stoffmenge pro Peakfläche

A Peakfläche

i Einzelpeak

iS interner Standard Flavon

MF Multiplikationsfaktor (bezieht Konzentration auf 1g Trockensubstanz)

Tab. 6: Liste der verwendeten Responsfaktoren

	<i>System 1</i>	<i>System 2</i>
interner Standard Flavon	$6,38 \times 10^{-6}$	$7,36 \times 10^{-6}$
Arbutin	$7,2 \times 10^{-5}$	$1,73 \times 10^{-4}$
Chlorogensäure	$2,3 \times 10^{-5}$	$2,25 \times 10^{-5}$
<i>p</i> -Cumarsäure	$5,95 \times 10^{-6}$	$7,92 \times 10^{-6}$
Rutin	$3,6 \times 10^{-5}$	$3,63 \times 10^{-5}$
Isorhamnetin-rutinosid	$4,12 \times 10^{-5}$	$3,91 \times 10^{-5}$
Eriodictyol 7-glucosid	$1,4 \times 10^{-5}$	$1,89 \times 10^{-5}$
Catechin	$2,1 \times 10^{-5}$	$6,33 \times 10^{-6}$
Epicatechin	$1,4 \times 10^{-5}$	$4,29 \times 10^{-6}$
Luteoliflavan	$6,7 \times 10^{-5}$	$1,77 \times 10^{-5}$
Procyanidin B1, B2, B5	$5,3 \times 10^{-5}$	$1,11 \times 10^{-5}$
Procyanidin C1, E-B5	$1,1 \times 10^{-4}$	$2,71 \times 10^{-5}$

Die Ermittlung der hier aufgelisteten Responsfaktoren (Tab. 6) erfolgte mit den jeweiligen Testsubstanzen der Firmen Merck, Roth oder Extrasynthese. Die Procyanidine, welche als Testsubstanzen nicht verfügbar waren, wurden mit den Responsfaktoren von MAYR (1995) berechnet.

Für die Bestimmung der Konzentration des Arbutinderivates wurde der Responsfaktor (RF) von Arbutin, für die Hydroxyzimtsäurederivate der RF der Chlorogensäure, für die Quercetinglykoside der RF von Rutin, für die Isorhamnetinglykoside der RF von Isorhamnetin-rutinosid und für die nicht identifizierten Flavanole der RF von Epicatechin verwendet.

2.5 Identifizierung und Isolierung der phenolischen Inhaltsstoffe

2.5.1 Fraktionierung mit HPLC

Um die phenolischen Substanzen näher zu charakterisieren wurden Einzelsubstanzen isoliert aufgetrennt. Dazu wurden bei einer HPLC-Analyse alle 2min jeweils 1,5ml in Eppendorffgefäßen aufgefangen. Anhand der Retentionszeit der Substanzen wurden die jeweiligen Eppendorffgefäße ausgewählt und in der Vakuumzentrifuge eingengt. Im Gegensatz zur Dünnschichtchromatographie, bei der die Fraktionen einer HPLC-Analyse verwendet wurden, wurde die saure Hydrolyse mit den zusammengefassten Fraktionen aus jeweils 5 HPLC-Analysen derselben Probe durchgeführt.

2.5.2 Probenvorbereitung und Extraktion für die Säulenchromatographie

Für die Reinigung der phenolischen Inhaltsstoffe an Sephadex LH-20 wurden Birnenblätter der Sorten `Conference`, `Bunte Juli` und `Williams` genutzt. Die Blätter der drei Sorten wurden als Mischprobe gesammelt, in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -20°C bis zur Extraktion gelagert. Das gefrorene Blattmaterial wurde nach Zugabe von 3-4ml eisgekühltem Methanol (gradient grade) pro Gramm Frischgewicht, portionsweise mit einem Stabmixer zerkleinert und anschließend dreimal für 30min im gekühlten Ultraschallbad extrahiert, filtriert und der Überstand abgegossen.

Die Extrakte wurden vereinigt und im Vakuumrotationsverdampfer auf 3 Liter aufkonzentriert. Um Lipide und Chlorophyll von den phenolischen Substanzen abzutrennen (THOMPSON et al. 1972) wurde der Extrakt in Portionen à 200ml je zehn mal mit je 300ml Petrolether extrahiert. Dieser Extrakt wurde im Vakuumrotationsverdampfer auf 2 Liter eingengt und anschließend in 250ml Portionen sechs mal mit je 300ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Durch das Ausschütteln mit Ethylacetat konnten die in der Wasserphase gelösten Zucker von den in der Ethylacetatphase gelösten phenolischen Substanzen abgetrennt werden. Nach der abschließenden Lyophilisation hatte die Wasserphase ein Gewicht von 117g und die Ethylacetatphase 34g.

2.5.3 Fraktionierung durch Säulenchromatographie an Sephadex LH-20

Zur Reinigung und Fraktionierung der phenolischen Verbindungen wurden 30cm von einer Glassäule (60cm Länge, 2,9mm Durchmesser) mit dem Säulenmaterial (= feste Phase) Sephadex LH-20 befüllt und mit 10%igem Methanol äquilibriert. Die getrocknete

Ethylacetatphase wurde mit 100ml 10%igem Methanol gelöst und auf die Säule gebracht. Die Elution der Phenole erfolgte mit einem Lösungsmittelgemisch aus Methanol und Wasser, wobei der Anteil an Methanol schrittweise von 10% auf 100% erhöht wurde. Die Eluate wurden in Reagenzgläsern mit jeweils 25ml aufgefangen. Jede zweite und ab Glas 130 jede vierte Portion wurde mit Spektralphotometer und DC überprüft und die sich in diesen Analysen ähnelnden Portionen wurden zu größeren Fraktionen vereinigt. Diese Fraktionen wurden wiederum im Vakuumrotationsverdampfer eingeeengt, getrocknet und eingewogen und mit HPLC überprüft. Insgesamt haben sich nach der Vereinigung der Teilfraktionen mit gleicher Zusammensetzung 57 Fraktionen ergeben.

2.5.4 Dünnschichtchromatographie

Für den Nachweis von phenolischen Substanzen eignet sich die eindimensionale Dünnschicht-chromatographie auf Cellulose-Platten (10x20cm) (Firma Merck) mit dem Fließmittel 1-Butanol : Essigsäure : Wasser (BAW) (4:1:2,2;v:v:v). Nach der Trennung wurden die Platten unter UV-Licht (350nm) betrachtet, mit Ammoniak bedampft und anschließend mit dem Naturstoffreagenz (1% Naturstoffreagenzkomplex A (Firma Roth) und 5% Polyethylenglykol (Firma Roth) in Methanol gelöst) besprüht. Zur Sichtbarmachung der Flavanole wurden die Platten zum Abschluss mit dem Farbreagenz DMAZA besprüht.

Um die Catechine, Procyanidine und das Luteoliflavan nach ihrem Polymerisationsgrad und nach der Anzahl der OH-Gruppen aufzutrennen, wurden Kieselgelplatten (10x20cm) (Firma Merck) mit dem Fließmittel Toluol : Aceton : Ameisensäure (TAA) (3:6:1;v:v:v) eingesetzt. Diese Platten wurden nach Besprühen mit DMAZA unter sichtbarem Licht betrachtet.

Neben den spezifischen Farbreaktionen geben die R_f -Werte erste Hinweise auf die Charakteristik der aufgetragenen Substanzen. Der R_f -Wert wird berechnet durch das Verhältnis des Abstandes vom Auftragspunkt zum Zentrum der Phenolbande zu dem Abstand vom Auftragspunkt zum Laufmittellende. In Abhängigkeit des Laufmittels (Zusammensetzung, Alter) kann sich eine Verschiebung des R_f -wertes um $\pm 5\%$ ergeben.

2.5.5 Saure Hydrolyse

Zur Spaltung der Glykoside in ihre Aglykone und Zuckeranteile wurden saure Hydrolysen durchgeführt. Dafür wurden die Proben (in 50 μ l MeOH gelöst) mit 50 μ l 1N methanolischer HCl versetzt und 20min im Wasserbad gekocht. Die Spaltprodukte wurden im Anschluss

daran durch dreimaliges Ausschütteln mit je 100µl Ethylacetat extrahiert. Für die Bestimmung der Spaltprodukte aus der Ethylacetatphase wurde diese Phase bis zur Trockene in der Vakuumzentrifuge eingengt und für die Überprüfung mit DC und HPLC in 50µl MeOH wieder aufgenommen.

2.5.6 Cochromatographie

Um das Vorkommen bestimmter phenolischer Verbindungen zu bestätigen, wurden Co-Chromatographien über HPLC durchgeführt. Mit den von den Firmen Merck, Roth und Extrasynthese bezogenen Testsubstanzen Arbutin, Kaffeesäure, Chlorogensäure, *p*-Cumarsäure, Eriodictyol 7-glukosid, Naringenin 7-glukosid, Hyperin, Isoquercitrin, Rutin, Avicularin, Isorhamnetin-rutinosid, Isorhamnetin-glucosid, Catechin, Epicatechin und von Luteoliflavan (RÖMMELT 2002) konnten einige Flavonoide nachgewiesen werden.

2.6 Biochemische Analysen der Enzymaktivitäten

Die in diesem Kapitel beschriebenen Analysemethoden der Enzymaktivitäten wurden in den Experimenten von Kap 3.2.2 angewandt. Die Durchführungen dieser Analysen liefen an der TU Wien im Rahmen der Dissertation von Dr. K. Schlangen (2003).

2.6.1 Präparation des Rohextrakts

Zur Gewinnung des Birnen-Rohextraktes wurden 0,5g des tiefgefrorenen Blattmaterials in einer Reibschale mit 0,25g Polyclar AT, 0,25g Quarzsand und 6ml 0,1M Tris/HCl+0,4% Ascorbat, pH=7,25 homogenisiert. Die Homogenate wurden in Eppendorfreaktionsgefäßen 10min bei 4°C und 10 000g zentrifugiert.

2.6.2 Standardtests der Enzyme PAL, CHS, FHT, DFR, FNR

Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL)

Der Enzymansatz enthielt in einem Volumen von 100µl:

40µl RE

5µl (¹⁴C)-Phenylalanin (0,063nmol, 548Bq)

55µl 0,1M H₃BO₃+ 0,4% Na-Ascorbat, pH=8,5

Der Puffer und der Rohextrakt wurden in ein Eppendorfreaktionsgefäß pipettiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe des (¹⁴C)-Phenylalanins gestartet. Nach 30 min Inkubation bei 30°C wurde die Reaktion mit 10µl Essigsäure gestoppt. Die gebildete (¹⁴C)-p-Zimtsäure wurde mit 200µl Ethylacetat (EtOAc) extrahiert. 100µl wurden für die Messung am Szintillationszähler (Winspectral, Wallac) verwendet. Neben den Tests wurde ein Blindwert mitgemessen, da bei diesen Tests neben den Produkten ein kleiner konstanter Teil des radioaktiv markierten Phenylalanins in die Ethylacetatphase übergeht. Diese dpm-Anzahl wurde von den jeweiligen Messungen abgezogen.

Chalkonsynthase/Chalkonisomerase (CHS/CHI)

Der Enzymansatz enthielt in einem Volumen von 200µl:

- 110µl RE
- 10µl (¹⁴C)-Malonyl-CoA (3,0nmol, 2 600Bq)
- 10µl *p*-Cumaroyl-CoA (2,0nmol)
- 50µl 0,1M KP_i Puffer+0,4% Ascorbat, pH=7,5

Flavanon-3-Hydroxylase (FHT)

Der Enzymansatz enthielt in einem Volumen von 100µl:

- 0,046nmol (¹⁴C)-Naringenin (108Bq)
- xµl RE
- 5µl 2-Oxoglutarat (1,46mg/ml H₂O)
- 5µl FeSO₄x7 H₂O (0,56mg/ml H₂O)
- 90 - xµl 0,1M Tris/HCl +0,4% Ascorbat, pH=7,25

108Bq des in Methanol gelösten (¹⁴C)-Naringenins wurden in Eppendorfreaktionsgefäßen pipettiert. Die Lösung wurde in einem Vakuumexsikkator bis zur Trockene eingedampft, anschließend wurde das Substrat mit dem Puffer aufgenommen. Nach der Zugabe des Rohextraktes und des 2-Oxoglutarats wurde die Reaktion mit der FeSO₄x7H₂O- Lösung gestartet. Die Menge des eingesetzten Rohextraktes von 20-40µl richtete sich nach der FHT-Aktivität. Nach 30min Inkubationszeit bei 30°C wurde die Reaktion mit 10µl Essigsäure gestoppt und die phenolischen Verbindungen mit 70µl Ethylacetat (EtOAc) extrahiert. Die Ethylacetatphase wurde auf die DC-Celluloseplatte aufgetragen. 108Bq Naringenin wurden als Referenz mit auf die Platten aufgetragen. Nach der anschließenden Chromatographie in CAW wurde mittels DC-Linearanalyser das Radiochromatogramm erstellt. Durch die

Integration der gemessenen Substanzen erfolgte die Quantifizierung der Umsätze von Naringenin zu DHK.

Dihydroflavonol-4-Reduktase (DFR)

Der Enzymansatz enthielt in einem Volumen von 50 μ l:

0,046nmol (14 C)-Dihydroquercetin (108Bq)

x μ l Rohextrakt

5 μ l NADPH (4,186mg/100 μ l H₂O)

45 - x μ l 0,1M KP_i Puffer+0,4% Ascorbat, pH=6,25

Das in Methanol gelöste (14 C)-Dihydroquercetin wurde in Eppendorfreaktionsgefäße pipettiert und in einem Vakuumexsikkator bis zur Trockene eingedampft. Das Substrat wurde mit dem Puffer aufgenommen, der Rohextrakt zugegeben und die Reaktion durch Zugabe der NADPH-Lösung gestartet. Die Menge des eingesetzten Rohextraktes von 20-30 μ l richtete sich wiederum nach der DFR-Aktivität des zu untersuchenden Gewebes. Nach 30min Inkubationszeit bei 30°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 70 μ l Ethylacetat gestoppt und die Ethylacetat-Phase auf die DC-Celluloseplatte aufgetragen. Nach Entwicklung in CAW wurde mittels DC-Linearanalyser das Radiochromatogramm erstellt.

Flavanon-4-Reduktase (FNR)

Der Enzymansatz enthielt in einem Volumen von 40 μ l:

0,046nmol (14 C)-Eriodictyol (108Bq)

x μ l Rohextrakt

5 μ l NADPH (4,186mg/100 μ l H₂O)

35 - x μ l 0,1M KP_i Puffer+0,4% Ascorbat, pH=6,25

108Bq (14 C)-Eriodictyol wurden in ein Eppendorfreaktionsgefäß pipettiert und das Lösungsmittel Methanol in einem Vakuumexsikkator abgedampft. Das Substrat (14 C)-Eriodictyol wurde mit dem Puffer aufgenommen, der 40 μ l Rohextrakt zugegeben und die Reaktion durch Zugabe der NADPH-Lösung gestartet. Nach 30min Inkubationszeit bei 30°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 70 μ l Ethylacetat gestoppt und die Ethylacetat-Phase auf die DC-Celluloseplatte aufgetragen. Nach der anschließenden Chromatographie in CAW wurde mittels DC-Linearanalyser das Radiochromatogramm erstellt. Durch die Integration der gemessenen Substanzen erfolgte die Quantifizierung der Umsätze von Eriodictyol zu Luteoforol.

3 Ergebnisse

3.1 Isolierung und Identifizierung phenolischer Inhaltsstoffe von Birnenblättern

Da die Bedeutung der Flavonoidbiosynthese im Hinblick auf die Resistenzinduktion untersucht werden sollte und um die Veränderungen in der Biosynthese durch Feuerbrandinfektionen bzw. nach Prohexadion-Ca-Behandlungen (Kap. 3.2) beurteilen zu können, war die Isolierung und Identifizierung der phenolischen Inhaltsstoffe von Birnenblättern ein Hauptziel der vorliegenden Arbeit.

Eine erste Reinigung und gruppenweise Fraktionierung der Phenylpropanoide wurde durch die Säulenchromatographie mit Sephadex erzielt. Mit der Durchführung saurer Hydrolysen und mit der Verwendung von HPLC (mit CRD-Technik) und DC erfolgte letztendlich die Charakterisierung der phenolischen Verbindungen.

3.1.1 Fraktionierung durch Sephadex-Säulenchromatographie

Durch die Analyse der Wasser- und Ethylacetatphase mit HPLC stellte sich heraus, dass im Vergleich zu den nicht aufgereinigten Proben und zu der Ethylacetatphase ein geringerer Anteil an bestimmten Substanzen in der Wasserphase vorhanden war. Desweiteren konnten die Verbindungen, welche in mit Prohexadion-Ca behandelten Pflanzenmaterial bei 280 und 640nm zuvor detektiert wurden, in der Wasserphase entweder nur in niedrigen Konzentrationen oder gar nicht nachgewiesen werden. Einzige Ausnahme bildet der Peak 1, welcher in beiden Phasen detektiert wurde, jedoch in der Wasserphase in deutlich höherer Konzentration als in der Ethylacetatphase vorhanden war.

Für die weiteren Isolierungs- und Identifizierungsschritte wurde die Ethylacetatphase verwendet. Die nach der Säulenchromatographie getrennten Teilfraktionen wurden mittels HPLC und DC analysiert und in größere Teilfraktionen zusammengefasst. Aufgeteilt nach ihrem jeweiligen Methanolgradienten wurde das Elutionsvolumen sowie die Anzahl der Fraktionen der Ethylacetatphase in Abb. 10 dargestellt.

10% MeOH 15 Fraktionen 1465ml = 8785mg	
20% MeOH 12 Fraktionen 4730ml = 13431mg	S17 (1645-1945ml) S19 (2145-2495ml) S21 (2845-3195ml) S23 (3675-3895ml) S25 (4595-5495ml) S27 (5845-6195ml)
30% MeOH 12 Fraktionen 4780ml = 3452mg	S31 (7075-7725ml) S39 (10625-10975ml)
40% MeOH 4 Fraktionen 1520ml = 312mg	S43 (12045-12495ml)
50% MeOH 3 Fraktionen 1800ml = 507mg	S44 (12495-13195ml)
60% MeOH 4 Fraktionen 2200ml = 789mg	S47 (14295-14945ml)
100% MeOH 2 Fraktionen 400ml = 1035mg	S51 (16495-16695ml)

Abb. 10: Schaubild der Fraktionen der Ethylacetat-Phase

Anhand von Chromatogrammen ausgewählter Fraktionen (Abb. 11 und 12) wird ein Überblick des Verlaufs der Säulenchromatographie gegeben. Die Chromatogramme zeigen dabei die bei 280nm (schwarze Linien) und 640nm (rote Linien) detektierten Phenolmuster mit den einzelnen Peaks. Die bei 280nm detektierten Peaks wurden nummeriert und die bei 640nm detektierten mit Buchstaben bezeichnet. Substanzen, welche vor allem bei 640nm aber auch bei 280nm nachgewiesen wurden, sind mit Buchstaben und Nummern gekennzeichnet. Im Anschluss daran sind die Konzentrationen der einzelnen Peaks in den Tabellen 7 und 8 aufgelistet.

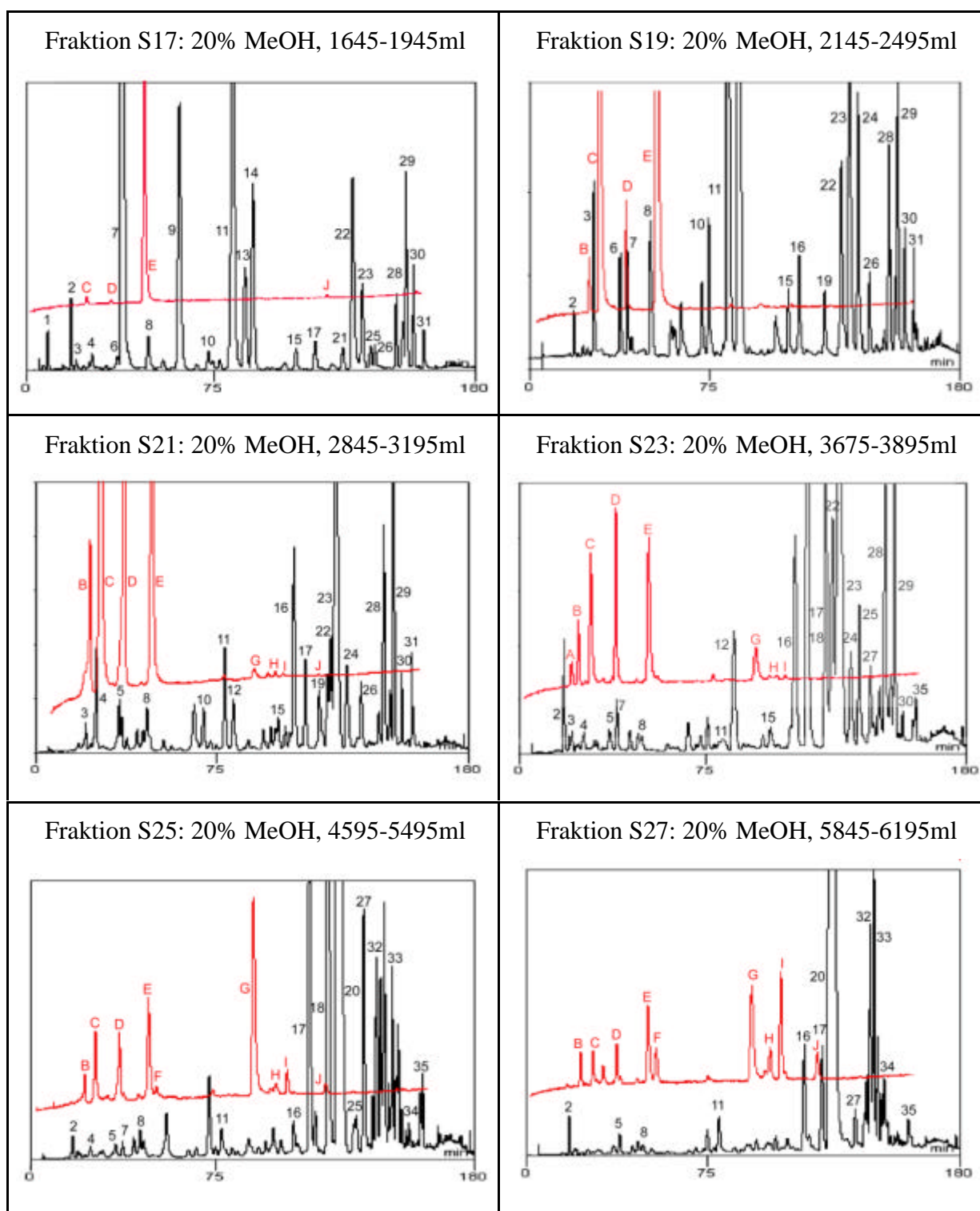


Abb. 11: HPLC-Chromatogramme von ausgewählten Fraktionen (schwarze Linie = bei 280nm detektiert; rote Linie = bei 640nm detektiert) (Teil 1)

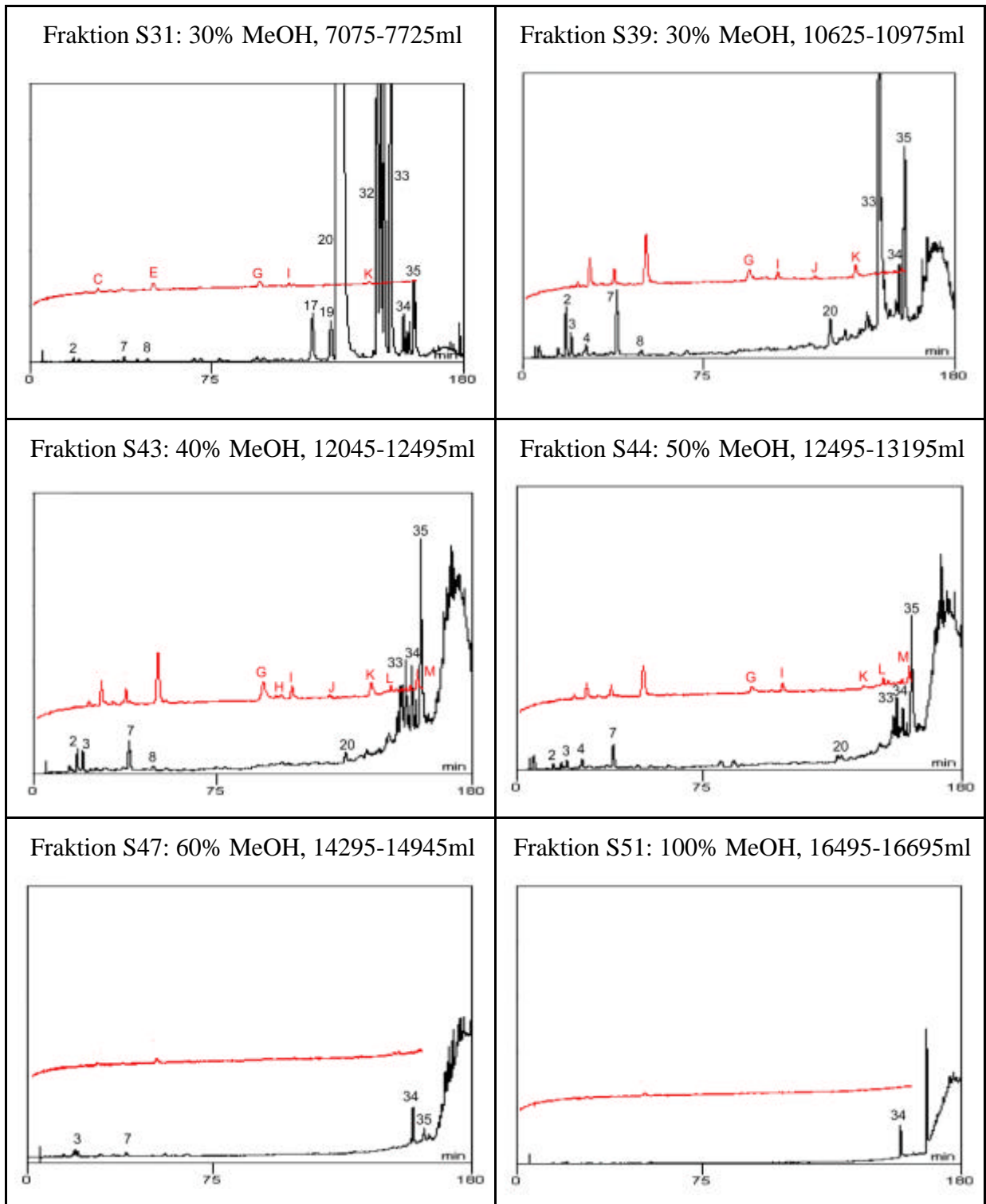


Abb. 12: HPLC-Chromatogramme von ausgewählten Fraktionen (schwarze Linie = bei 280nm detektiert; rote Linie = bei 640nm detektiert) (Teil 2)

Tab. 7: Konzentrationen [mg/g TS] der bei 280nm detektierten Peaks in den Sephadex-Fractionen

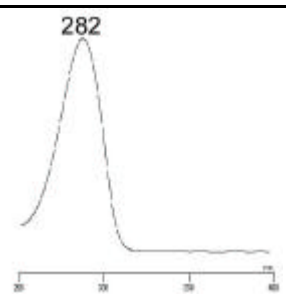

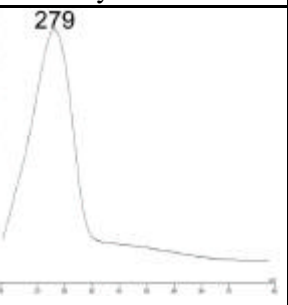
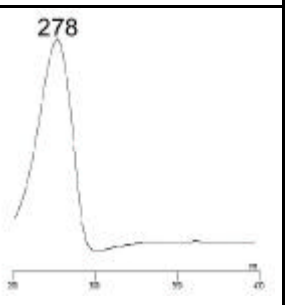
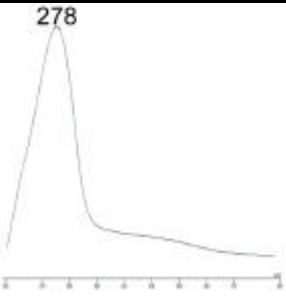

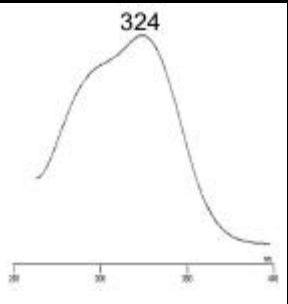
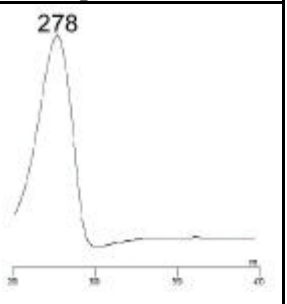
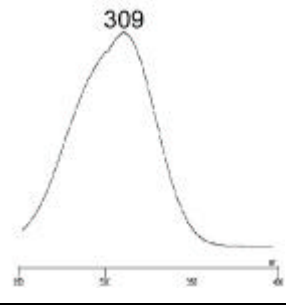

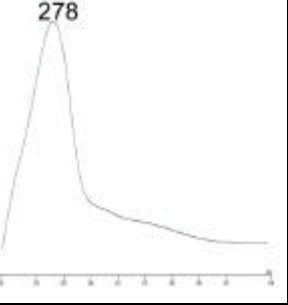
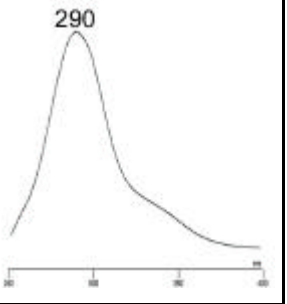
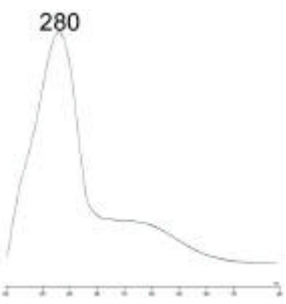
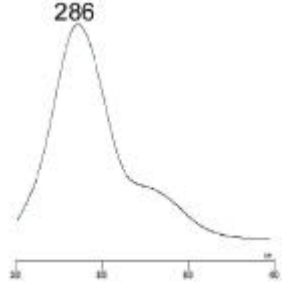
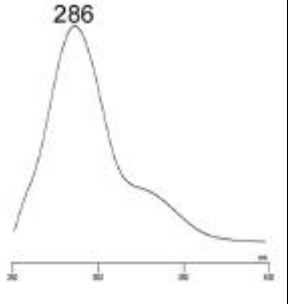
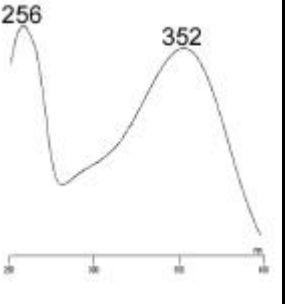
Peak	S17 1645- 1945ml	S19 2145- 2495ml	S21 2845- 3195ml	S23 3675- 3895ml	S25 4595- 5495ml	S27 5845- 6195ml	S31 7075- 7725ml	S39 10625- 10975ml	S43 12045- 12495ml	S44 12495- 13195ml	S47 14295- 14945ml	S51 16495- 16695ml
1	19,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	7,8	5,1	0,6	14,3	2,8	4,4	0,5	5,7	2,5	0,7	-	-
6	0,9	6,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	497,0	14,7	4,6	8,4	2,3	3,1	0,8	10,3	4,7	3,6	0,6	-
9	21,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	1,7	10,4	3,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	83,1	134,6	11,3	1,9	2,7	3,9	-	-	-	-	-	-
12	-	-	6,7	20,3	-	-	-	-	-	-	-	-
13	7,9	74,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	18,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	2,6	6,1	3,6	3,7	-	-	5,9	-	-	-	-	-
16	-	10,8	23,1	35,0	4,6	13,2	4,8	-	-	-	-	-
17	1,8	-	4,9	43,8	25,7	6,6	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	33,8	52,4	-	-	-	-	-	-	-
19	-	7,5	7,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	192,6	406,7	459,5	2,5	0,7	0,6	-	-
21	6,5	60,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	84,5	174,3	40,7	112,9	-	-	-	-	-	-	-	-
23	29,4	77,7	219,0	371,4	-	-	-	-	-	-	-	-
24	-	16,9	33,0	36,2	-	-	-	-	-	-	-	-
25	1,3	-	-	8,3	2,3	1,3	-	-	-	-	-	-
26	4,8	-	21,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	-	-	-	4,7	13,0	2,4	-	-	-	-	-	-
28	17,3	44,1	58,5	86,3	-	-	-	-	-	-	-	-
29	45,6	66,0	89,2	86,3	-	-	-	-	-	-	-	-
30	18,7	20,5	12,8	5,8	-	-	-	-	-	-	-	-
31	7,5	18,1	17,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	-	-	-	-	30,5	26,4	43,2	-	-	-	-	-
33	-	-	-	-	29,1	16,5	55,4	64,5	9,7	4,4	-	-
34	-	-	-	-	3,6	1,6	2,7	1,8	3,4	1,9	1,1	1,1
35	-	-	-	3,1	2,6	1,3	5,1	12,8	12,3	7,0	0,8	-

Tab. 8: Konzentrationen [mg/g TS] der bei 640nm detektierten Peaks in den Fraktionen

Peak	S17 1645- 1945ml	S19 2145- 2495ml	S21 2845- 3195ml	S23 3675- 3895ml	S25 4595- 5495ml	S27 5845- 6195ml	S31 7075- 7725ml	S39 10625- 10975ml	S43 12045- 12495ml	S44 12495- 13195ml	S47 14295- 14945ml	S51 16495- 16695ml
A	-	-	-	0,45	-	-	-	-	-	-	-	-
B (3)	-	1,33	3,27	1,17	0,53	0,62	-	-	-	-	-	-
C (4)	0,24	45,15	41,80	4,51	3,20	0,98	0,21	-	-	-	-	-
D (5)	0,18	2,62	12,01	3,18	1,62	0,80	-	-	-	-	-	-
E (8)	6,20	54,76	18,30	4,18	3,85	2,22	0,27	-	-	-	-	-
F	-	-	-	-	0,29	0,90	-	-	-	-	-	-
G	-	0,14	0,10	-	9,49	3,26	0,19	0,44	0,77	0,14	-	-
H	-	-	0,07	-	0,29	0,62	-	-	-	-	-	-
I	-	0,13	0,05	-	0,50	2,56	0,05	0,15	0,32	0,20	-	-
J	0,14	0,12	0,04	-	0,33	0,66	-	0,07	0,08	-	-	-
K	-	-	-	-	-	-	0,04	0,39	0,49	0,07	-	-
L	-	-	-	-	-	-	-	-	0,08	0,12	-	-
M	-	-	-	-	-	-	-	0,06	0,34	0,30	-	-

3.1.2 Charakterisierung der phenolischen Inhaltsstoffe mit HPLC und DC

Aufgrund ihrer UV-Spektren wurden die Peaks in die jeweiligen Phenolklassen eingeteilt (Abb. 13). Zusätzliche Hinweise über die Charakteristik der einzelnen Verbindungen ergaben die Retentionszeiten (HPLC) und die spezifischen Farbreaktionen sowie die R_f -Werte bei Dünnschichtchromatographie (Tab. 9 und 10).

Peak 1: Arbutin	Peak 2: Neochlorogensäure	Peak B (3): Procyanidin B1	Peak C (4): Catechin
			
Peak D (5): Procyanidin B2	Peak 6: Kaffeensäure	Peak 7: Chlorogensäure	Peak E (8): Epicatechin
			
Peak 9: <i>p</i> -Cumarsäure	Peak 11: Eriodicytol 7-glukosid	Peak G: Luteoliflavan	Peak 12: ?
			
Peak 15: Naringenin 7-glukosid	Peak 16: ?	Peak 19: ?	Peak 21: Hyperin
			

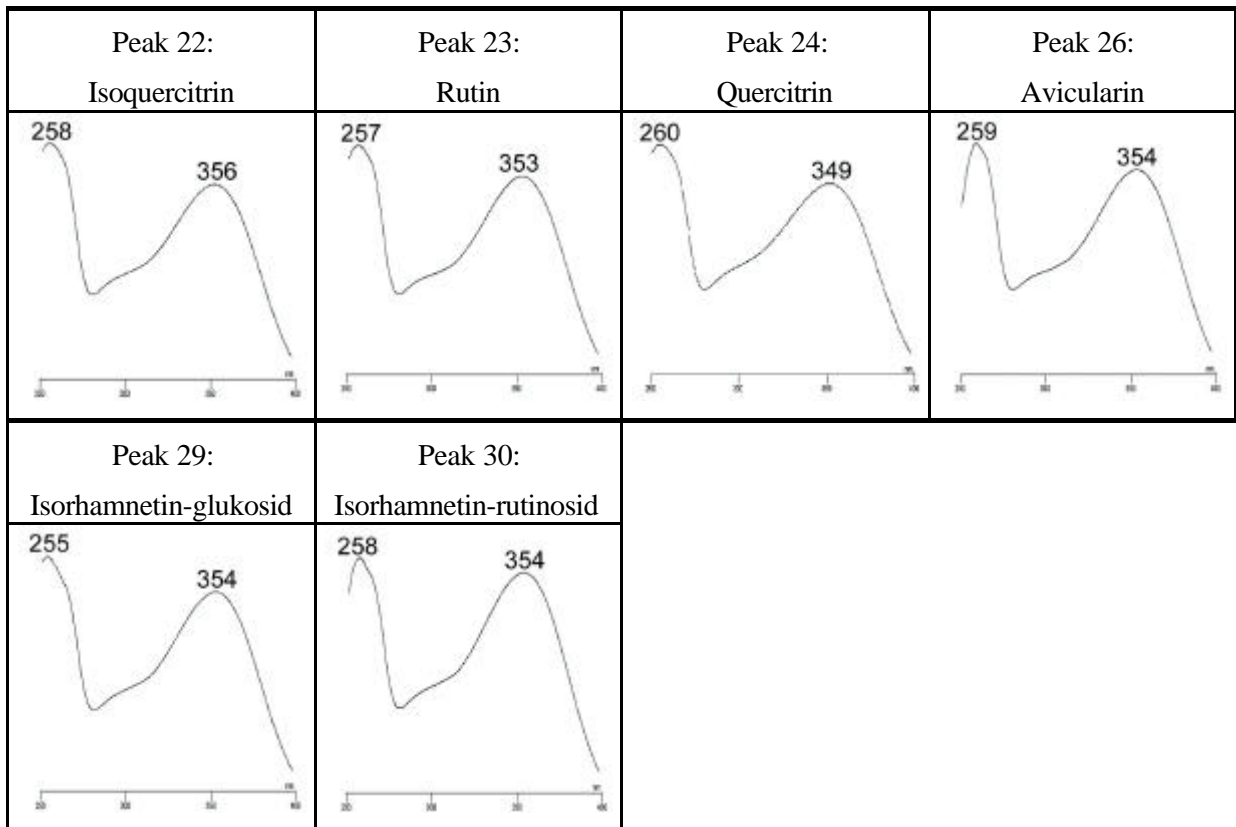


Abb. 13: UV-Spektren konstitutiver und neu induzierter phenolischer Inhaltsstoffe von Birnenblättern

Hydrochinone:

Als eine der Hauptkomponenten von Birnenblättern ist Peak 1 in allen HPLC-Analysen ohne vorangegangene Reinigung durch die Sephadex-Säulenchromatographie nachgewiesen worden. In den Fraktionen der Ethylacetatphase war die Konzentration dieser Substanz dagegen vergleichsweise gering (Tab. 7) und die Elution erfolgte bereits in einer der ersten Fraktionen. Mit Cochromatographie und durch Vergleich der Retentionszeit (RT) und des UV-Spektrums mit der Testsubstanz wurde dieser Peak als das Hydrochinonglukosid Arbutin identifiziert (Abb. 13 und Tab. 9). Charakteristisch für Arbutin ist die sehr frühe RT von 7min und ein λ_{\max} von 282nm. In den HPLC-Analysen ohne Sephadex-Reinigung wurde zusätzlich ein weiterer Peak mit demselben UV-Spektrum nachgewiesen. Die RT ist um 14min länger, was für eine Derivatisierung spricht.

Hydroxyzimtsäuren:

Die meisten der im Birnenblatt vorhandenen phenolischen Verbindungen sind der Klasse der Hydroxyzimtsäuren zuzuordnen. Aufgrund ihres UV-Spektrums können die Hydroxy-

zimsäuren in die zwei Gruppen der Kaffeesäurederivate und der *p*-Cumarsäurederivate unterschieden werden. Das Absorptionsmaximum λ_{\max} der Kaffeesäurederivaten liegt bei 324nm und das der *p*-Cumarsäurederivate bei 309nm. Mit DC (Cellulose-Platten mit Laufmittel BAW) sind beide Gruppen bei Betrachtung unter UV-Licht als blaue Banden sichtbar. Nach Bedampfen mit Ammoniak unterscheiden sich die Hydroxyzimsäuren durch verschiedene Blautöne (z.B. hellblau = Kaffeesäure; dunkelblau = *p*-Cumarsäure; blau mit hellgrünem Stich = Chlorogensäure).

Peak 7 wurde mit λ_{\max} bei 324nm und einer RT von 37min als Chlorogensäure identifiziert (Abb. 13 und Tab. 9). Auf DC-Platten reagierte diese Substanz nach Bedampfen mit Ammoniak mit der typischen grünlichen Farbe. Der R_f -Wert lag bei 0,46. Die höchste Konzentration der Chlorogensäure nach der Sephadex-Säulenchromatographie wurde in der frühen Fraktion S17 mit 497mg/g TS ermittelt (Tab. 7).

Ein ähnliches UV-Spektrum wie die Chlorogensäure weist Peak 2 auf (λ_{\max} bei 327nm), allerdings war die RT von 18min knapp 20min kürzer als die RT der Chlorogensäure. Durch den Vergleich der Angaben zur Neochlorogensäure in der Arbeit von ÖLSCHLÄGER (2002) im gleichen HPLC-System, kann Peak 2 als das Isomer der Chlorogensäure, der Neochlorogensäure bestimmt werden (Abb. 13 und Tab. 7 und 9).

Sowohl mittels DC (R_f -Wert 0,78) als auch mit HPLC (RT 35, λ_{\max} 322nm) wurde Peak 6 als Kaffeesäure identifiziert. Ohne Sephadex-Reinigung sowie in den meisten Fraktionen nach der Reinigung wurde die Kaffeesäure von der Chlorogensäure überlagert. Nur in der Fraktion S19 lag diese Substanz rein mit einem Gehalt von 6mg/g TS vor (Abb. 13 und Tab. 7 und 9).

Peak 9 wies wie die Reinsubstanz *p*-Cumarsäure eine RT von 83min und ein λ_{\max} bei 309nm auf (Abb. 13 und Tab. 9). Neben dem hohen R_f -Wert von 0,95 zeigte sich nach Bedampfen mit Ammoniak die charakteristische dunkelblaue Farbe. In der Fraktion S17 beträgt der Gehalt der *p*-Cumarsäure 21mg/g TS (Tab. 7).

Die Peaks 10, 13, 14, 17, 18, 20, 25, 27, 32, 33, 34 und 35 wurden aufgrund ihrer UV-Spektren den Hydroxyzimsäuren zugeordnet. Durch ihr jeweiliges λ_{\max} war es möglich, sie in Kaffeesäurederivate (Peak 10, 14, 18, 20, 33, 35) und *p*-Cumarsäurederivate (Peak 13, 17, 25, 27, 32, 34) zu unterteilen. Auch die Farbreaktionen mit DC bestätigten die Einteilung dieser Peaks in die Klasse der Hydroxyzimsäuren. Die Peaks wurden bei geringen als auch bei hohen Retentionszeiten detektiert. Interessanterweise waren die Konzentrationen einzelner Peaks zum Teil sehr hoch. Peak 20 erreichte z.B. in Fraktion S31 einen Gehalt von 460mg/g TS. Um die Struktur der Peaks näher beschreiben zu können, wurden Hydrolysen

durchgeführt. Allerdings konnten die Bestandteile mit saurer Hydrolyse nicht bestimmt werden (Tab. 9).

Flavanone:

Peaks der Flavonoidklasse der Flavanone konnten in Birnenblättern nur nach einer Behandlung mit Prohexadion-Ca nachgewiesen werden. Möglicherweise sind diese Verbindungen zwar konstitutiv vorhanden, die Konzentrationen liegen jedoch unter der Nachweisgrenze der HPLC-Systeme.

Die UV-Daten, λ_{\max} 284nm und die typische Form des Flavanon-UV-Spektrums, von Peak 11 stimmen mit der Testsubstanz Eriodicytol 7-glukosid überein. Die Cochromatographie über HPLC und der Farbumschlag nach dem Besprühen der Cellulose-Platte mit dem Naturstoffreagenz zu brombeer, bestätigten das Vorliegen dieses Flavanonglykosids. Nach saurer Hydrolyse dieser Substanz konnte das Aglykon Eriodicytol mit DC und HPLC nachgewiesen werden. Bereits in den Fraktionen bei 20% Methanol wurde Eriodicytol 7-glukosid eluiert. Die Fraktion S19 enthielt mit 135mg/g TS die höchste Konzentration dieser Substanz (Tab. 7 und 11).

Die Peaks 12, 15, 16 und 19 wiesen ein ähnliches UV-Spektrum wie Eriodicytol 7-glukosid (Peak 11) auf. Allerdings wurden Peak 15, 16 und 19 bei deutlich höheren Retentionszeiten als Peak 11 detektiert. Die RT von Peak 15 entspricht der RT der Testsubstanz Naringenin 7-glukosid. Durch Cochromatographie mit der Testsubstanz wurde Peak 15 als Naringenin 7-glukosid identifiziert. Peak 16 und 19 zeigten mit DC zunächst keinerlei Farbreaktionen, erst nach saurer Hydrolyse konnte über DC und HPLC das Aglykon als Eriodicytol bestimmt werden. Da von Peak 12 keine weiteren Merkmale vorlagen, kann dieser Peak nur aufgrund seines UV-Spektrums vorläufig als ein unbekanntes Flavanon bezeichnet werden (Abb. 13 und Tab. 7 und 11).

Flavonolglykoside:

Die Flavonolglykoside waren hauptsächlich in den Fraktionen bei 20% Methanol enthalten. Die Hydroxyzimtäurederivate (Peak 18, 20, 25, 27, 32-35) welche ohne Sephadex-Reinigung sehr ähnliche Retentionszeiten wie die Flavonolglykoside aufweisen, wurden dagegen erst in den Fraktionen bei 30% Methanol eluiert. Somit konnten die einzelnen Flavonolglykoside erst durch die Sephadex-Säulenchromatographie getrennt voneinander erfaßt und näher charakterisiert werden (Abb. 11 und 13 und Tab. 7 und 9).

Die unterschiedlichen Farbreaktionen der isolierten Flavonole bei DC nach Besprühen mit dem Naturstoffreagenz wiesen auf das Vorliegen von zwei verschiedenen Flavonolaglyka hin.

Quercetinglykoside:

Bei DC zeigten die Peaks 21, 22, 23, 24 und 26 unter UV-Licht zunächst die typisch braune Färbung der Flavonole. Nach Besprühen der Cellulose-Platten mit dem Naturstoffreagenz färbten sich diese Substanzen orange. Die Testsubstanzen Quercetin sowie die Quercetinglykoside reagierten ebenfalls mit einer Orangefärbung. Die saure Hydrolyse bestätigte Quercetin als Aglykon dieser Peaks. Durch Cochromatographie über HPLC mit den jeweiligen Quercetinglykosiden wurde Peak 21 als Hyperin (Quercetin-3-*O*-galaktosid), Peak 22 als Isoquercitrin (Quercetin-3-*O*-glukosid), Peak 23 als Rutin (Quercetin-3-*O*-rutosid), Peak 24 als Quercitrin (Quercetin-3-*O*-rhamnosid) und Peak 26 als Avicularin (Quercetin-3-*O*-arabinofuranosid) identifiziert (Tab. 9).

Isorhamnetinglykoside:

Die Peaks 28, 29, 30 und 31 zeigten bei Betrachtung der DC-Platten unter UV-Licht dieselbe Braunfärbung wie die Quercetinglykoside. Im Gegensatz zu diesen Glykosiden reagierten die Peaks 28-31 nach Besprühen mit Naturstoffreagenz allerdings mit einer grünlich-gelben Färbung. Zudem waren die R_f -Werte etwas höher als die der Quercetinglykoside. Bei den HPLC-Analysen fielen diese Peaks durch eine ebenfalls höhere Retentionszeit auf. Gleichzeitig unterschieden sich die Absorptionsmaxima nicht wesentlich von den UV-Spektren der anderen Flavonolglykoside. Das Vorhandensein der Isorhamnetinglykoside wurde letztendlich mit saurer Hydrolyse bestätigt. Alle Aglyka der vier Peaks wiesen nach der Hydrolyse die Farbe und den R_f -Wert von Isorhamnetin auf.

Ohne Hydrolyse hatten die Peaks 28 und 31 in etwa einen R_f -Wert von Isorhamnetin-glukosid. Durch Cochromatographie mit den Testsubstanzen wurde Peak 29 als Isorhamnetin-glukosid und Peak 30 als Isorhamnetin-rutosid identifiziert (Tab. 9).

Flavanole:

Die Besonderheit der Catechine und Proanthocyanidine ist ihre spezifische Reaktion mit dem Farbreagenz DMAZA (*p*-Dimethylaminozimtaldehyd). In Gegenwart von konzentrierter Schwefelsäure entsteht ein Komplex mit einem Absorptionsmaximum bei 640nm. Somit können diese Substanzen über HPLC-Analysen bei der Wellenlänge von 640nm selektiv

nachgewiesen werden. Auch auf DC-Platten können die nach dem Besprühen mit DMAZA entstehenden blauen Flecke eindeutig den Flavanolen zugeordnet werden.

Ein Teil der nach der Sephadex-Reinigung nachgewiesenen Flavanole war in den Fraktionen bei 20% Methanol enthalten und ein weiterer Teil wurde erst bei 30% Methanol eluiert (Abb. 11 und 12). Die Form der UV-Spektren sowie λ_{\max} bei 278nm waren bei allen Flavanolen einheitlich (Abb. 13). Die blaue Färbung der Peaks C (4) und E (8) nach Besprühen der DC-Platten mit DMAZA und dieselben R_f -Werte wie die Testsubstanzen, bestätigten das Vorliegen der monomeren Flavanole Catechin und Epicatechin. Die höchste Konzentration von Catechin wurde in der Fraktion S19 mit 45mg/g TS ermittelt und in derselben Fraktion konnten 55mg/g TS Epicatechin nachgewiesen werden (Tab. 8 und 10).

Von den weiteren Flavanolen standen keine reinen Testsubstanzen zur Verfügung. Fraktionen von vorangegangenen Isolierungsarbeiten am Fachgebiet Obstbau, welche verschiedene Proanthocyanidine enthielten, gaben jedoch Anhaltspunkte über die Retentionszeiten und R_f -Werte. Auf diese Weise wurde Peak B (3) als Procyanidin B1, Peak D (5) als Procyanidin B2, Peak F als Procyanidin C1, Peak I als Procyanidin B5 und Peak J als Procyanidin E-B5 ermittelt. Alle fünf Procyanidine wurden in Fraktionen bei 20% Methanol nachgewiesen (Abb. 11 und 12). Die beiden dimeren Flavanole B1 und B2 wurden dabei früher eluiert als die trimeren Flavanole C1, B5 und E-B5. Trotz der sehr geringen Substanzmengen konnten von den Peaks A, K und L UV-Spektren mit λ_{\max} bei 278nm aufgenommen werden. Bezüglich ihrer RT wurden jedoch keine Übereinstimmungen mit Testsubstanzen bzw. Testfraktionen gefunden (Tab. 8 und 10).

Die Peaks G, H, und M wurden nur in zuvor mit Prohexadion-Ca behandelten Birnenblättern, detektiert. Der Vergleich der RT und des R_f -Wertes von Peak G mit einer Fraktion, welche das 3-Deoxycatechin Luteoliflavan enthält, gab Hinweise auf das Vorliegen dieser Verbindung. Mit Cochromatographie über HPLC, wurde der Peaks G als Luteoliflavan bestätigt. Die Fraktion S25 enthielt mit 10mg/g TS die höchste Konzentration dieser Substanz (Tab. 8). Die Peaks H und M konnten wegen ihrer geringen Substanzmenge nicht weiter identifiziert werden. Aufgrund ihrer sehr hohen RT kann man vermuten, dass diese Substanzen in glykosidierter Form vorliegen (Tab. 10).

Tab. 9: Liste der phenolischen Inhaltsstoffe in Birnenblättern (Detektion bei 280nm)

<i>Klasse</i>	<i>Peak</i>	<i>Trivialname</i>	<i>Struktur</i>	<i>I_{max}</i> <i>[nm]</i>	<i>R_f</i>	<i>RT</i> <i>[min]</i>
<u>Hydrochinon</u>	1	Arbutin	4- <i>O</i> -β-glucopyranosyl-Hydrochinon	282		7
<u>Hydroxyzimtsäuren</u>	2	Neochlorogensäure	3'-Kaffeoylchinasäure	324		18
	6	Kaffeesäure		322	0,78	37
	10, 14, 18, 20, 33, 35	Kaffeesäure-Derivate				75, 91, 122, 125, 144, 158
	7	Chlorogensäure	5'-Kaffeoylchinasäure	324	0,46	39
	9	p-Cumarsäure		309	0,95	63
	13, 17, 25, 27, 32, 34	p-Cumarsäure-Derivate				86, 116, 137, 141, 142, 155
<u>Flavonone</u>	11	Eriodictyol 7-glucosid		284	0,30	83
??	12	??		290		88
??	15	??		280		108
??	16	??		286		113
??	19	??		286		123
<u>Flavonole</u>	21	Hyperin	Quercetin 3- <i>O</i> -β-galactosid	256, 352 (sh)	0,35	129
	22	Isoquercitrin	Quercetin 3- <i>O</i> -β-glucosid	258, 356 (sh)	0,37	133
	23	Rutin	Quercetin 3- <i>O</i> -β-rutinosid	257, 353 (sh)	0,22	136

<i>Klasse</i>	<i>Peak</i>	<i>Trivialname</i>	<i>Struktur</i>	<i>I_{max}</i> <i>[nm]</i>	<i>R_f</i>	<i>RT</i> <i>[min]</i>
	24	Quercitrin	Quercetin 3- <i>O</i> - β -rhamnosid	260, 349 (sh)	0,54	140
	26	Avicularin	Quercetin 3- <i>O</i> - β -arabinofuranosid	259, 354 (sh)	0,46	143
	29	Isorhamnetin-glukosid	Isorhamnetin 3- <i>O</i> - β -glucosid	255, 354 (sh)	0,53	153
	30	Isorhamnetin-rutinosid	Isorhamnetin 3- <i>O</i> - β -rutinosid	258, 354 (sh)	0,39	156
	28, 31	Isorhamnetinglykosid				150, 160

Tab. 10: Liste der Flavanele in Birnenblättern (Detektion bei 640nm nach Derivatisierung mit DMAZA)

<i>Klasse</i>	<i>Peak</i>	<i>Trivialname</i>	<i>Struktur</i>	<i>RT</i>
<u>Monomere Flavanele</u>	C (4)	Catechin	2,3 trans-Flavan-3-ol	27
	E (8)	Epicatechin	2,3 cis-Flavan-3-ol	48
<u>Dimere Flavanele</u>	B (3)	Procyanidin B1	Epicatechin-(4 β -8)-Catechin	23
	D (5)	Procyanidin B2	Epicatechin-(4 β -8)-Epicatechin	37
	I	Procyanidin B5	Epicatechin-(4 β -6)-Epicatechin-	106
<u>Trimere Flavanele</u>	F	Procyanidin C1	Epicatechin-(4 β -8)-Epicatechin-(4 β -8)-Epicatechin	54
	J	Procyanidin E-B5	Epicatechin-(4 β -6)-Epicatechin-(4 β -6)-Epicatechin	121

<i>Klasse</i>	<i>Peak</i>	<i>Trivialname</i>	<i>Struktur</i>	<i>RT</i>
<u>Deoxycatechine</u>	G	Luteoliflavan	3-Deoxycatechin	91
neu induzierte Flavanole	H, M			101, 158
unbekannte Flavanole	A, K, L			21, 139, 147

3.1.3 Diskussion

Nach Reinigung und Auftrennung durch die Sephadex-Säulenchromatographie sowie der anschließenden Überprüfung der Fraktionen mit HPLC und DC konnten die phenolischen Inhaltsstoffe von zuvor mit Prohexadion-Ca behandelten Birnenblätter näher charakterisiert und zum Teil identifiziert werden. Von großem Vorteil für die Identifizierung zeigte sich die Fraktionierung über die Sephadex-Säule, da hierbei die Hydroxyzimtsäure-Verbindungen und die Flavonolglykoside bei verschiedenen Elutionsvolumina in unterschiedliche Fraktionen getrennt wurden. Denn generell wird die Identifizierung der einzelnen Phenole bei HPLC-Analysen aufgrund der Überlagerungen von Verbindungen mit ähnlichen Retentionszeiten erschwert (TREUTTER 1991; OLESZEK et al. 1994; ESCARPA und GONZALES 1999; SCHIEBER et al. 2001). Zusätzlich konnte durch die Fraktionierung über die Sephadex-Säule auch die gegenseitige Vermischung von Verbindungen aus einer Phenolklasse wie beispielsweise der Kaffeesäure (Peak 6) von der Chlorogensäure (Peak 7) oder des Isoquercitrins (Peak 22) von Rutin (Peak 23) vermieden werden. Mit der schrittweisen Erhöhung des Methanolgradienten erfolgte zwar keine klare Trennung der verschiedenen Phenolklassen in die einzelnen %-Stufen, so wurde z.B. die Chlorogensäure und ebenso das Epicatechin sowohl bei 20% MeOH als auch bei 30% und 40% MeOH eluiert. Allerdings haben sich die Verbindungen in ihren höchsten Konzentrationen in den einzelnen Fraktionen unterschieden und somit konnten von den einzelnen Peaks getrennte Daten wie UV-Spektren, Retentionszeiten (RT) und R_f -Werte erfasst werden.

Für die Überprüfung der Fraktionen wurde eine rp-HPLC (rp = reversed phase = Umkehrphase) verwendet, bei welcher die hydrophilen, polaren Substanzen vor den lipophilen, unpolaren eluiert werden. Die Retentionszeiten, welche durch die bestimmte Elutionsfolge bedingt ist, eignet sich nur begrenzt für die Vorhersage der Molekülstruktur

einer phenolischen Verbindung, jedoch kann sie für eine erste Einteilung in die verschiedenen Phenolklassen hilfreich sein (TREUTTER 1985).

Das Hydrochinon Arbutin wurde in den analysierten Birnenblättern bei der sehr geringen RT von 7min nachgewiesen. Diese RT bestätigt die Angaben über die hohe Polarität von Arbutin aus der Literatur (ANDRADE et al. 1998; SCHIEBER et al. 2001).

An Hydroxyzimtsäure-Verbindungen wurde die Kaffeesäure, die *p*-Cumarsäure, die Neochlorogensäure und die Chlorogensäure identifiziert. Die Aussage, dass zwei Hydroxylgruppen am aromatischen Ring der Zimtsäuren (= Kaffeesäure) eine Verringerung der RT gegenüber der monosubstituierten 4-Hydroxyzimtsäure (= *p*-Cumarsäure) bewirken (TREUTTER 1985), wurde mit der um ca. 25 Minuten kürzeren RT der Kaffeesäure bestätigt. Die Chlorogensäure, ein Ester aus Kaffeesäure mit Chinasäure, kann wie in der Literatur als die dominierende Verbindung dieser Substanzklasse angegeben werden (ESCARPA und GONZALES 2000; SCHIEBER et al. 2001). Innerhalb der weiteren als Hydroxyzimtsäuren charakterisierten Verbindungen fielen vor allem die spät eluierenden Peaks (18, 20, 25, 27) mit relativ hohen Konzentrationen auf. Peak 20 wies mit 460mg/g TS eine vergleichbar hohe Konzentration wie die Chlorogensäure auf. SPANOS und WROLSTAD (1990) fanden in Birnenblättern ebenso Hydroxyzimtsäure-Derivate mit einer hohen RT, sie konnten diese Substanzen aber ihrem UV-Spektrum nach nur als sehr stabile Ester der Kaffeesäure charakterisieren.

Bei der Phenolklasse der Flavonole wurden Quercetin- und Isorhamnetin-Glykoside nachgewiesen. Aufgrund des sehr ähnlichen UV-Spektrums sind die Peaks 28-31 zunächst zu der Gruppe der Quercetinglykoside gezählt worden. Wegen der späten RT und dem hohen R_f -Wert wurde jedoch vermutet, dass diese Peaks eine lipophilere Struktur haben müssen. Der Farbumschlag bei DC nach dem Besprühen mit Naturstoffreagenz von braun nach grünlich-gelb anstatt dem für Quercetinglykoside typischen orange war ein zusätzlicher Hinweis auf das Vorliegen eines anderen Aglykons als Quercetin. Durch Vergleich der RT- und R_f -Werte und mit Cochromatographie der Peaks mit Standards wurde eine Übereinstimmung mit Isorhamnetinglykosiden festgestellt. Diese Gruppe der Flavonolglykoside zeichnet sich mit der gleichen chromophoren Eigenschaft wie Quercetin aus, durch die Methylgruppe an Position 3' sind diese Verbindungen jedoch weniger hydrophil. Bei den verschiedenen Glykosiden desselben Aglykons ist die Art, die Anzahl und die Position des Zuckerrestes entscheidend. So werden Quercetin-rutinosid und Isorhamnetin-rutinosid nach den jeweiligen Glykosiden Quercetin-glukosid und Isorhamnetin-glukosid eluiert. Von den insgesamt sieben identifizierten Flavonolglykoside wurden in der Literatur hauptsächlich Isorhamnetin-

glukosid und -rutosid sowie Quercetin-glukosid, -rutosid und -galaktosid beschrieben (WALD und GALENSA 1989; SPANOS und WROLSTAD 1990, SCHIEBER et al. 2001). Das Quercetin-rhamnosid sowie das -arabinofuranosid wurde dagegen bisher nicht speziell erwähnt.

Mit der Verwendung einer HPLC in Kombination mit einer Nachsäulenderivatisierung ist neben der qualitativen auch eine quantitative Erfassung von Verbindungen aus der Klasse der Flavanole möglich. Die höchste Konzentration der in den Birnenblättern nachgewiesenen Flavanole wurde von dem monomeren Flavanol Epicatechin ermittelt. Außer diesem Monomer konnte das 2,3-trans-konfigurierte Flavanol Catechin mit einer etwas kürzeren RT identifiziert werden. Diese geringere RT ist auf die Stereochemie und der damit verbundenen höheren Polarität von Catechin zurückzuführen. Das Procyanidin B₂, welches formal aus zwei verknüpften Epicatechin-Einheiten besteht, tritt im HPLC-Phenolmuster zwischen den beiden Monomeren Catechin und Epicatechin auf. Im Vergleich dazu eluiert das Procyanidin B₁, welches aus je einem Molekül der monomeren Flavanole besteht, bei einer noch geringeren RT als Catechin. Die räumliche Konfiguration von Catechin und Epicatechin wirkt sich nach TREUTTER (1991) auch auf das chromatographische Verhalten der Procyanidine aus. So bestätigt sich in den Chromatogrammen der Birnenblätter die Aussage, dass die 4-6-verknüpften Flavanole wie B₅ und E-B₅ später eluieren als die 4-8-verknüpften Flavanole B₁, B₂ und C₁. Bis auf das dimere Procyanidin B₅ und den beiden trimeren Procyanidinen C₁ und E-B₅ wurden die anderen vier detektierten Flavanole von SPANOS und WROLSTAD (1990 und 1992) bereits beschrieben. Zusätzlich geben diese Autoren den Nachweis weiterer trimerer und tetramere Procyanidine an, eine nähere Identifizierung fehlt jedoch. Abgesehen von den zuvor genannten Flavanolen wurden zusätzliche Verbindungen bei 640nm detektiert. Eine dieser Substanzen konnte als das 3-Deoxycatechin Luteoliflavan identifiziert werden. Im Vergleich zu den Flavanolen besitzt dieses 3-Deoxycatechin am C-Ring an Position 3 keine OH-Gruppe (Abb. 14) und daher ist das Molekül unpolarer und die RT sowie der R_f-Wert sind höher als bei Catechin und Epicatechin. Im Apfelgewebe wurde das Luteoliflavan erstmalig von RÖMMELT (2002) nachgewiesen und dies nur, wenn die Apfelpflanzen zuvor mit dem Bioregulator Prohexadion-Ca behandelt worden sind. Auch in Birnenblättern liegt dieses 3-Deoxycatechin konstitutiv nicht vor, sondern konnte ebenfalls nur nach einer Prohexadion-Ca-Behandlung nachgewiesen werden.

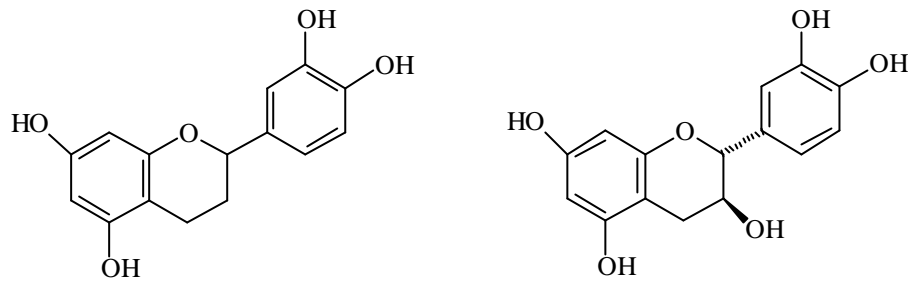


Abb. 14: Chemische Struktur von Luteoliflavan (3-Deoxycatechin) im Vergleich zu Catechin

RÖMMELT (2002) detektierte nach der Prohexadion-Ca-Behandlung sowohl bei 640nm wie auch bei 280nm weitere neu induzierte Substanzen. Auch in den Birnenblättern kamen zusätzliche Peaks in den Chromatogrammen beider Wellenlängen vor. Aufgrund der geringen Konzentrationen und der Überlagerungen von Hydroxyzimtsäuren und Flavonolen im 280nm-Chromatogramm, können die bei 640nm detektierten Peaks K, L und M nur als hochpolymere Verbindungen beschrieben werden. Die Gruppe der bei 280nm von 83 bis 123min detektierten Peaks sind wegen ihrer UV-Spektren der Phenolklasse der Flavanone zuzuordnen. Zwei dieser Flavanone wurden anhand von Cochromatographien mit Standards als Eriodictyol 7-glukosid (Peak 11) (Abb. 15) und Naringenin 7-glukosid (Peak15) identifiziert. Nach saurer Hydrolyse konnte das Aglykon der Peaks 16 und 19 als Eriodictyol (Abb. 15) bestimmt werden. Die Art, Anzahl und Position der Zuckerreste wurde nicht näher charakterisiert. Eine Glykosidierung am A-Ring an Position 3 und/oder 5 anstatt an Position 7 kann allerdings eine Verschiebung der RT hervorrufen und so könnten die Zuckeranteile der Peaks 16 und 19 an diesen Positionen gebunden sein.

Sowohl Eriodictyol 7-glukosid und Naringenin 7-glukosid als auch die weiteren Substanzen aus der Klasse der Flavanone sind bislang in Birnenblättern nicht beschrieben worden und auch nur nach einer Behandlung mit Prohexadion-Ca konnten diese Verbindungen in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden.

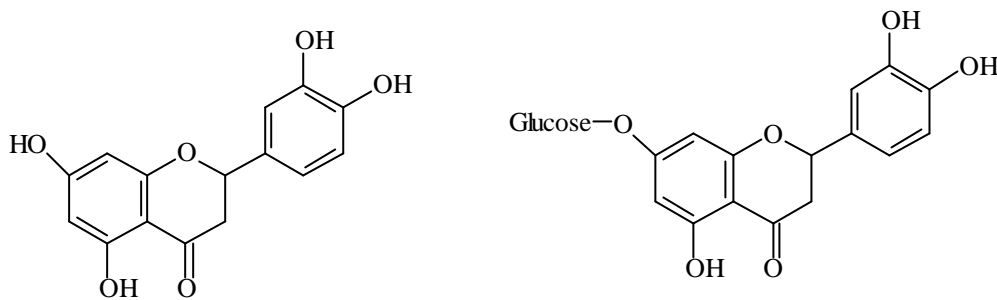


Abb. 15: Chemische Struktur von Eriodicytol (links) und Eriodicytol 7-glukosid (rechts)

3.2 Quantitative und qualitative Zusammensetzung der Phenolmuster von Birnenblättern und deren Beeinflussung durch verschiedene Faktoren

Das Eindringen eines Pathogens in pflanzliches Gewebe bildet oftmals den ersten Schritt in einer Reihe von Abwehrreaktionen (VENISSE et al. 2002). So stellen beispielsweise die Bildung von Abgrenzungsgewebe direkt um die Infektionsstelle (TREUTTER und FEUCHT 1990b) aber auch die Stimulierung von Enzymaktivitäten, welche wiederum die Synthese von Abwehrstoffen bewirken können, effektive Maßnahmen der Pflanzen dar, um ein weiteres Eindringen bzw. eine Verbreitung des Pathogens in der Pflanze zu unterbinden. Phenolische Verbindungen sind bei diesen Reaktionen von großer Bedeutung.

Nach dem Überblick über die konstitutiven wie auch über die nach einer Behandlung mit Prohexadion-Ca neu induzierten phenolischen Inhaltsstoffe in Birnenblättern (Kap 3.1), waren die Fragen der folgenden Versuche:

- Kann eine Inokulation mit dem Feuerbranderreger *Erwinia amylovora* Veränderungen im Phenolmetabolismus hervorrufen? Ist dieses Ergebnis vom Bakterienstamm oder von unterschiedlichen Genotypen beeinflussbar?
- Sind die Auswirkungen einer Prohexadion-Ca-Behandlung auf die Flavonoidbiosynthese in verschiedenen Blattaltersstadien, in verschiedenen Genotypen, in verschiedenen Kultursystemen gleich? Wie lange hält der Effekt einer Prohexadion-Ca-Behandlung an? Welche phenolischen Inhaltsstoffe reagieren schneller und welche verzögerter?
- Gibt es weitere Modifikationen in der Flavonoidbiosynthese, wenn die Pflanzen vor einer Inokulation mit dem Feuerbranderreger mit Prohexadion-Ca behandelt werden? Spielt dabei der Anwendungszeitpunkt eine Rolle?

3.2.1 Interaktion zwischen *Erwinia amylovora* und den Phenylpropanoiden verschiedener Birnengenotypen

Ob eine Pflanze auf einen Pathogenbefall mehr oder weniger befallen wird, ist nicht allein von der Kondition und/oder der genetischen Variabilität der Pflanzen abhängig, sondern ebenfalls entscheidend ist die Virulenz des Erregerstamms und die Inokulumdichte.

Die Fragen, inwiefern die Virulenz von *Erwinia amylovora*-Stämmen für die Befallsstärke bei unterschiedlichen Birnensorten ausschlaggebend ist und welche Veränderungen eine Inokulation mit dem Feuerbranderreger im Phenolstoffwechsel von Birnen auslöst, waren Gegenstand der zwei nachfolgenden Versuche.

3.2.1.1 Wirkung von Inokulationen mit unterschiedlichen Bakterienstämmen auf den Phenolstoffwechsel

Um für die nachfolgenden Experimente einen hoch virulenten Bakterienstamm auszuwählen, wurden Pflanzen der unterschiedlich hoch feuerbrandanfälligen Birnensorten 'Abate Fetel' und 'Harrow Sweet' mit fünf verschiedenen Bakterienstämmen inokuliert (jeweils fünf Pflanzen jeder Sorte pro Bakterienstamm). Nach Angaben von KLAUS RICHTER (Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen; pers. Mitteilung 2001) stammten alle fünf Isolate von verschiedenen Standorten, wurden aus Birnenpflanzengewebe isoliert und wiesen an 'Idared' und 'Prima' unterschiedliche Virulenzstärken auf.

Die Bonitur erfolgte 10, 13 und 17 Tage nach der Inokulation mit einem 10-stufigem Boniturschema. In den einzelnen Befallsklassen wurde die jeweilige Befallsstärke, angefangen von leichten Verbräunungen an der Inokulationsschnittstelle (= Klasse 1) über fortschreitende Verfärbungen der Blattspreite und Blattader bis zur Verfärbung des Triebes, bewertet (Tab. 11).

Tab. 11: 10-stufiges Boniturschema zur Erfassung des Feuerbrandbefalls

Klasse	1	2	3	4	5
Beschreibung	Leichte Verfärbung an der Schnittstelle (bis 0,5cm)	Mittlere Verfärbung an der Schnittstelle (bis 1,5cm)	Starke Verfärbung der Mittelrippe bis zur Blatthälfte	Verfärbung der gesamten Mittelrippe	Verfärbung des Blattstiels
Klasse	6	7	8	9	10
Beschreibung	Verfärbungsbeginn am Trieb	Leichte Verfärbung am Trieb (bis 1cm)	Mittlere Verfärbung am Trieb (1-2cm)	Starke Verfärbung am Trieb (2-4cm)	Sehr starke Verfärbung am Trieb (ab 5cm)

Die Berechnung des Krankheitsindex erfolgte nach der Formel:

$$\text{KI (in \%)} = \frac{\text{Summe (Anzahl der befallenen Blätter x Befallsklasse)}}{\text{Anzahl der Befallsklassen x Gesamtanzahl der inokulierten Blätter}} \times 100$$

Erst zehn Tage nach der Inokulation zeigten sich die ersten deutlichen Symptome. Bei der Sorte 'Abate Fetel' wurden Verbräunungen an den Schnittstellen auch in den Kontrollpflanzen bonitiert. Allerdings entwickelten sich keine stärkeren Symptome, so dass diese Verfärbungen auf eine Wundreaktion zurückzuführen ist. Die Krankheitsindizes stiegen bei 'Abate Fetel' bei allen Bakterienstämmen über den Boniturzeitraum stetig an (Abb. 16). Dagegen veränderten sich die Symptome bei 'Harrow Sweet', abgesehen von dem Isolat 545, innerhalb der 17 Tage nicht. Insgesamt lagen die Krankheitsindizes bei 'Abate Fetel' im Bereich von 10-40%, und waren damit deutlich höher als die Indizes bei 'Harrow Sweet' mit maximal 10%. Bei der Sorte 'Abate Fetel' verursachte das Isolat 527 mit einem Krankheitsindex von 40% den höchsten Befall. Im Gegensatz dazu, zeigten sich bei der Sorte

‘Harrow Sweet’ die stärksten Symptome an den mit dem Bakterienstamm 545 inokulierten Pflanzen.

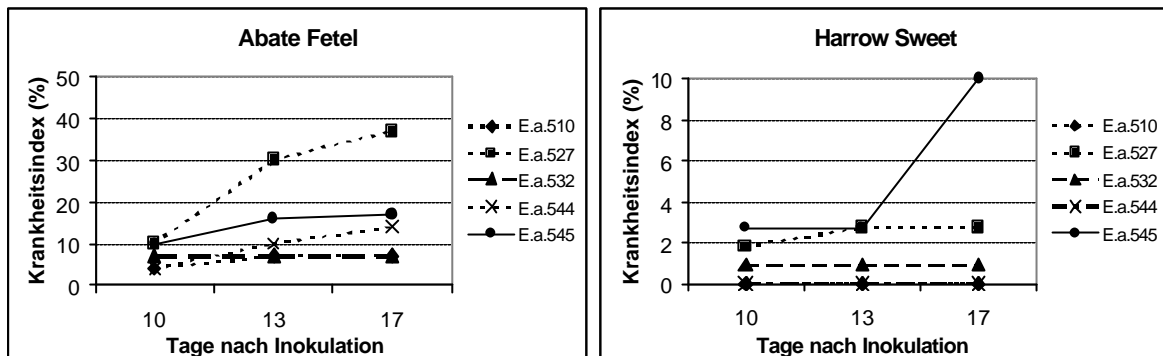


Abb. 16: Krankheitsindex der Birnensorten ‘Abate Fétel’ und ‘Harrow Sweet’ nach Inokulation mit verschiedenen Bakterienstämmen [Ea = *Erwinia amylovora*]

Die Blätter für die HPLC-Analysen der phenolischen Inhaltsstoffe wurden einen Tag nach der Inokulation entnommen.

Bei der Summe aller Phenylpropanoide und bei den Hydrochinonglukosiden (Arbutin und dessen Derivat) waren die Konzentrationen der inokulierten Blätter der Sorte ‘Abate Fétel’ generell höher als die der nicht-inokulierten Blätter (Abb. 17). Bei der Sorte ‘Harrow Sweet’ lagen diese Gehalte dagegen bei den mit den Bakterienstämmen 545, 544 und 532 inokulierten Blättern unter dem der nicht-inokulierten Blättern.

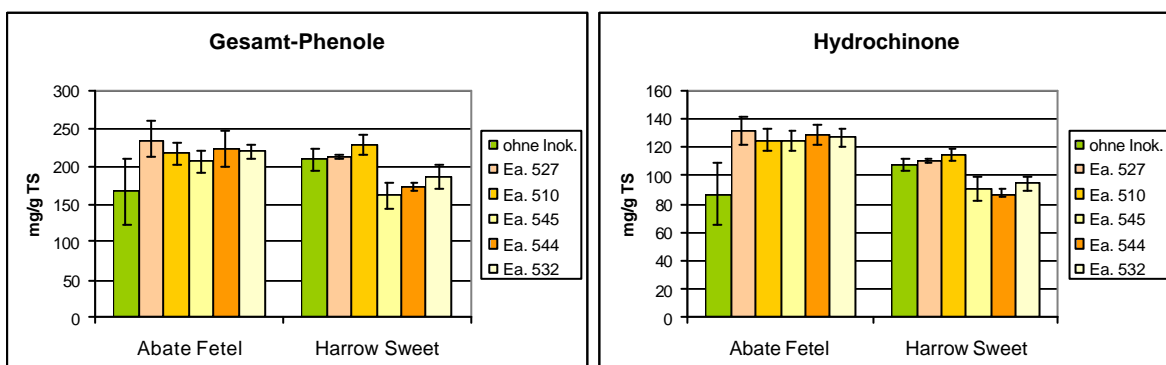


Abb. 17: Konzentration der gesamten Phenylpropanoide und der Hydrochinone der Birnensorten ‘Abate Fétel’ und ‘Harrow Sweet’ nach Inokulation mit verschiedenen Bakterienstämmen (Mittelwerte der 5 Wiederholungen mit Standardabweichung)

Bei `Abate Fetel` sind in den Gehalten der Hydroxyzimtsäuren und der Flavonolglykoside keinerlei Unterschiede zwischen den inokulierten und nicht-inokulierten Blättern zu erkennen (Abb. 18). Demgegenüber waren die Konzentrationen dieser beiden Phenolklassen in den mit den Isolaten 545 und 544 inokulierten Blättern von `Harrow Sweet` auffallend niedriger als in den Kontrollblättern dieser Sorte (Abb. 18).

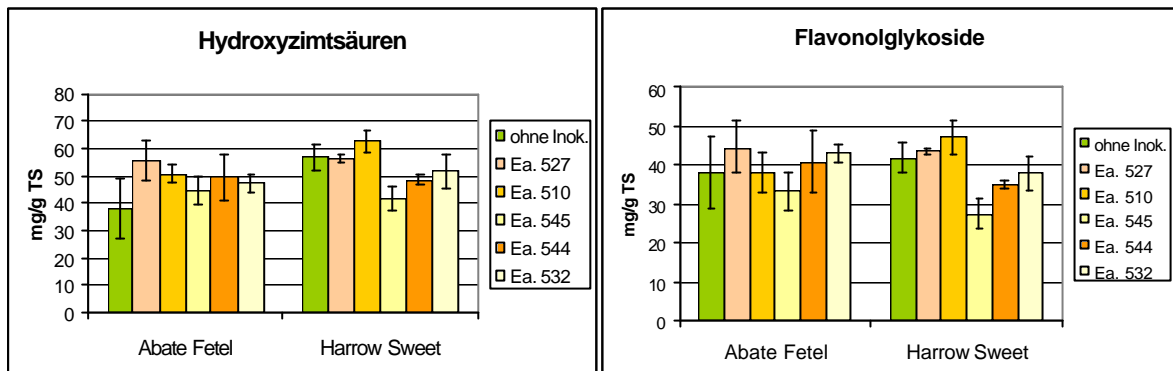


Abb. 18: Konzentration der Hydroxyzimtsäuren und der Flavonolglykoside der Birnensorten `Abate Fetel` und `Harrow Sweet` nach Inokulation mit verschiedenen Bakterienstämmen (Mittelwerte der 5 Wiederholungen mit Standardabweichung)

In der Konzentration der Flavanole (Abb. 19) zeigten sich wiederum nur bei der Sorte `Harrow Sweet` Differenzen zwischen den nicht-inokulierten und den inokulierten Blättern. Abgesehen von den Konzentrationsunterschieden der mit den Isolaten 527 und 544 inokulierten Blättern und den Kontrollblättern, war vor allem die Differenz zu den mit dem Bakterienstamm 545 inokulierten Blättern sehr hoch.

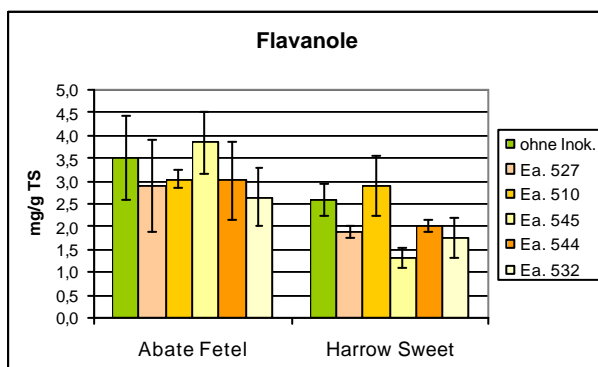


Abb. 19: Konzentration der Flavanole der Birnensorten `Abate Fetel` und `Harrow Sweet` nach Inokulation mit verschiedenen Bakterienstämmen (Mittelwerte der 5 Wiederholungen mit Standardabweichung)

3.2.1.2 Sortenbedingte Reaktionen im Phenolstoffwechsel auf den Feuerbranderreger

Die Frage, ob verschiedene Genotypen sich in ihrer Reaktion im Phenolstoffwechsel aufgrund einer Feuerbrandinokulation unterscheiden, sollte mit den folgenden Experimenten beantwortet werden. Für die Analysen der phenolischen Verbindungen wurde eine Mischprobe aus dem inokulierten Blatt von je drei Pflanzen jedes Genotyps (‘Abate Fetel’, ‘Pyrodwarf’ und ‘Harrow Sweet’) einen Tag nach der Inokulation mit einem Gemisch aus *Erwinia amylovora*-Stämmen entnommen.

Der Gesamtgehalt aller phenolischer Verbindungen (Abb. 20, 21 und 22) lag bei allen drei Genotypen ohne und mit Inokulation in einem Bereich von 107 bis 126mg/g TS. Bei den Genotypen ‘Abate Fetel’ und ‘Pyrodwarf’ blieb der Gehalt der Gesamtphenole in den nicht-inokulierten Blättern unter dem Gehalt der inokulierten Blätter. Dagegen war der Gehalt der Gesamtphenole bei ‘Harrow Sweet’ in den inokulierten Blättern (126mg/g TS) gegenüber den Kontrollblättern (107mg/g TS) erheblich niedriger. Dieselbe Reduzierung bei ‘Harrow Sweet’ bzw. Erhöhung bei ‘Abate Fetel’ und ‘Pyrodwarf’ durch die Inokulation konnte ebenfalls im Gehalt der Hydrochinone beobachtet werden. Die höchste Konzentration wurde bei diesen Substanzen in der Unterlage ‘Pyrodwarf’ mit 74mg/g TS (Kontrolle) und 87mg/g TS (Inokulation) gemessen. Trotz der geringeren Konzentrationen der Phenolklassen Flavonolglykoside und der Flavanole, kann man in beiden Klassen die Tendenz der Abnahme nach der Inokulation bei ‘Pyrodwarf’ und ‘Harrow Sweet’ und eine Erhöhung bei ‘Abate Fetel’ feststellen. Bei den Flavonolglykosiden waren die Gehalte aller drei Genotypen in etwa gleich hoch, bei den Flavanolen waren die höchsten Konzentrationen (12 und 16mg/g TS) dagegen in der Sorte ‘Abate Fetel’ zu finden. Lediglich bei den Hydroxyzimtsäuren zeigten alle drei Genotypen einheitlich eine Reduzierung des Gehaltes nach der Inokulation. Die höchsten Gehalte traten in dieser Substanzklasse in der Sorte ‘Harrow Sweet’ (54 und 46mg/g TS) auf.

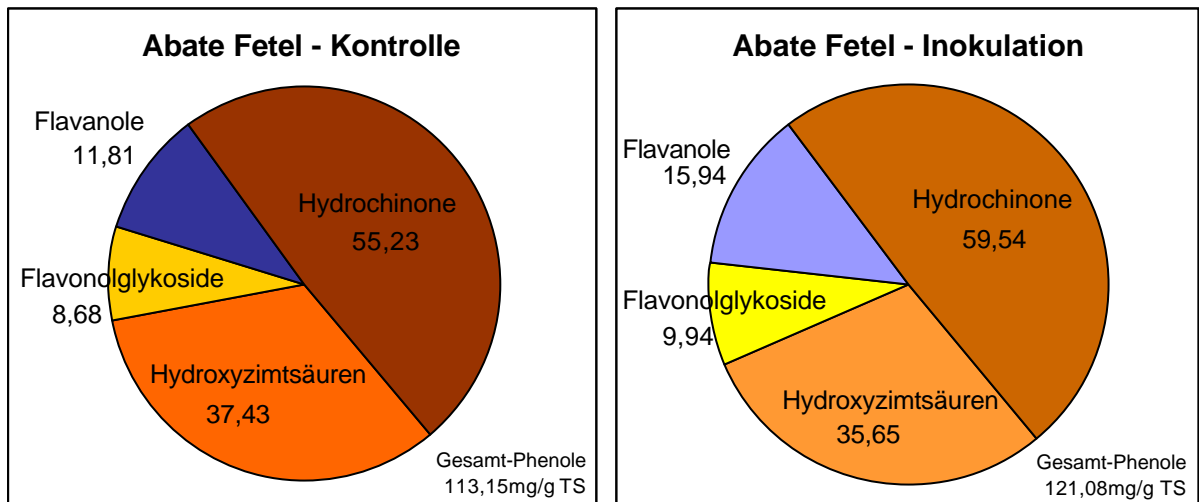


Abb. 20: Konzentration [mg/g TS] der einzelnen Phenolklassen in den Blättern der Birnensorte 'Abate Fetel', ohne und mit Inokulation mit dem Feuerbranderreger

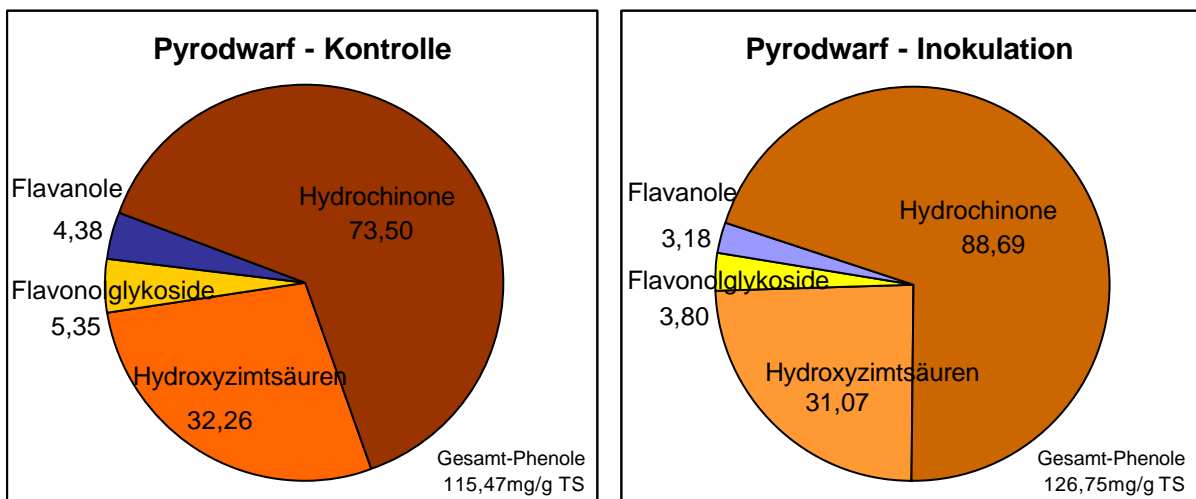


Abb. 21: Konzentration [mg/g TS] der einzelnen Phenolklassen in den Blättern des Birnengenotyps 'Pyrodwarf', ohne und mit Inokulation mit dem Feuerbranderreger

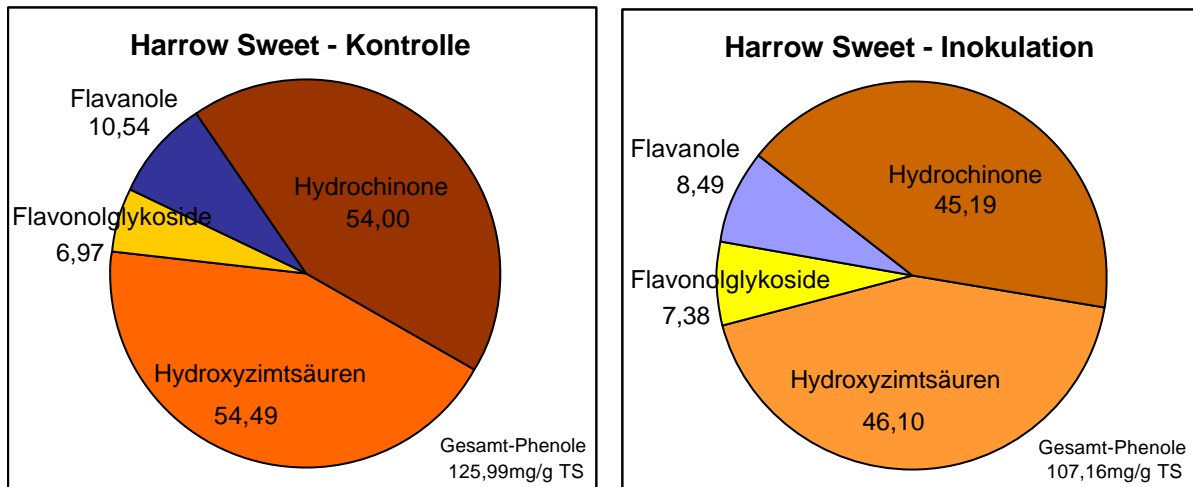


Abb. 22: Konzentration [mg/g TS] der einzelnen Phenolklassen in den Blättern der Birnensorte 'Harrow Sweet', ohne und mit Inokulation mit dem Feuerbranderreger

3.2.1.3 Diskussion

Generell weisen *Erwinia amylovora*-Stämme keine Spezifität für bestimmte Wirtspflanzenarten auf, was bedeutet, dass von Apfel isolierte Bakterienstämme auch für Birnen pathogen sein können (VAN DER ZWET und KEIL 1979). Allerdings beschreiben BEER et al. (1996), dass sich die von *Erwinia amylovora*-Stämmen verursachten Symptome je nach Herkunftsgebiet und -land des Isolats unterscheiden können. PAULIN et al. (1993) belegen bei verschiedenen Bakterienstämmen unterschiedliche Virulenzstärken und aufgrund dieser variierender Virulenzen kann die Anfälligkeit je nach Sorte und je nach Bakterienstamm unterschiedlich ausgeprägt sein (NORELLI et al. 1984, 1986). Der Virulenztest der Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen (BAZ) wurde nach Angaben von KLAUS RICHTER (pers. Mitt. 2001) an Apfelsorten durchgeführt. Die Reihenfolge der sich daraus ergebenden Virulenz war: Nr. 532 > Nr. 527 > Nr. 545 > Nr. 544 > Nr. 510. Interessanterweise verursachte der Stamm mit der höchste Virulenz an Apfelsorte in dem vorliegenden Versuch an beiden Birnensorten nicht den stärksten Befall und auch die Anfälligkeit der Birnensorten variierten je nach Bakterienstamm. Um einen möglichst hohe Virulenz an unterschiedlichen Sorten in den nachfolgenden Versuchen zu gewährleisten, wurde für die weiteren Inokulationen ein Gemisch aus mehreren *Erwinia amylovora*-Stämmen verwendet.

Neben den Faktoren Bakterienstamm und dessen Virulenz, Inokulumlevel, sowie Standort und Kondition der Pflanzen haben vor allem die genotypischen Unterschiede eine entscheidende Bedeutung bei der Anfälligkeit gegen den Feuerbranderreger. Von einer generell höheren Anfälligkeit von Birnen gegenüber *Erwinia amylovora* als von Apfel berichten unter anderem LESPINASSE und ALWINCKLE (2000) und DECKERS und SCHOOF (2002). Doch auch innerhalb der Birnen gibt es große Variationen zwischen den einzelnen Sorten und Unterlagen (VAN DER ZWET et al. 1984) und diese Unterschiede waren beim Vergleich der Birnensorten 'Abate Fetel' und 'Harrow Sweet' zu beobachten. Zudem lösten die verschiedenen Bakterienstämme je nach Sorte unterschiedliche Befallsstärken aus und trotzdem die Infektion an 'Harrow Sweet' im Gegensatz zu der an 'Abate Fetel' geringer ausfiel, war der Befall bei dieser Birnensorte, aufgrund ihrer Einstufung als feuerbrandresistent (HUNTER et al. 1992; LE LEZEC et al. 1997), nicht zu erwarten gewesen. Weitere unterschiedliche Reaktionen der Genotypen auf die Feuerbrandinokulationen waren außerdem in den Konzentrationsveränderungen der phenolischen Inhaltsstoffe zu erkennen. Von einem Effekt auf den Phenylpropanoidmetabolismus von Apfelpflanzen, hervorgerufen durch eine Inokulation mit dem Feuerbranderreger berichten VENISSE et al. (2002). Insbesondere in dem feuerbrandanfälligen Apfelgenotyp MM106 stellten die Autoren eine reduzierte Expression der an der Biosynthese der phenolischen Inhaltsstoffe beteiligten Enzyme CHS, DFR und FLS fest. Keine Repression dieser Enzyme fanden sie dagegen in dem resistenten Genotyp 'Evereste'. Eine klare Trennung der resistenten und anfälligen Birnengenotypen war in den vorliegenden Experimenten aufgrund der teilweise gleichen Reaktionen der Genotypen auf die *Erwinia amylovora*-Inokulation nicht möglich. Eine einheitliche Ab- oder Zunahme der phenolischen Verbindungen pro Genotyp war ebenfalls nicht zu beobachten.

Die Erhöhung des Gesamtphenolgehaltes wie sie an Cotoneaster (ZELLER und BRULEZ 1987) und Apfel (RÖMMELT et al. 2002) nach einer Inokulation mit *Erwinia amylovora* beobachtet wurde, war im zweiten Versuch bei der Birnensorte 'Abate Fetel' und bei der Birnenunterlage 'Pyrodwarf' zu sehen. Im Vergleich zu den Angaben von RYUGO et al. (1990), welche bei der Birnensorte 'Harrow Delight' einen gesteigerten Gesamtphenolgehalt nachwiesen, lag bei der Sorte 'Harrow Sweet' in beiden Versuchen sogar eine reduzierte Summe aller Phenole vor. Diese Reduktion zeigte sich allerdings im ersten Versuch nur bei den Bakterienstämmen Nr. 544 und Nr. 545, wobei Nr. 545 den höchsten Befall bei dieser Sorte verursachte. Infektionsbedingt ergab sich bei HILDEBRAND (1970) in Birnen eine Verringerung der Arbutingehalte und gleichzeitig eine Zunahme des Aglykons Hydrochinon. Diese

Gehaltsabnahme bei Arbutin bestätigte sich nur bei der feuerbrandresistenten Sorte 'Harrow Sweet'. Dagegen trifft die zweite Aussage von HILDEBRAND (1970), dass in resistenten Sorten eine größere Menge an Arbutin vorhanden ist als in anfälligen Sorten, nicht zu. Denn sowohl ohne als auch mit Inokulation sind die Arbutingehalte in 'Abate Fetel' und 'Pyrodwarf' über denen von 'Harrow Sweet'. Die Hydroxyzimtsäuregehalte nahmen im ersten Versuch nur bei 'Harrow Sweet' zu und dabei auch nur bei dem befallsstärksten Bakterienstamm Nr. 545. Im zweiten Versuch waren die Hydroxyzimtsäure-Verbindungen die einzige Phenolklasse, deren Gehalt einheitlich in allen drei Genotypen nach der Inokulation zurückgingen. Bei den Flavonolglykosiden sieht das Ergebnis im ersten Versuch ähnlich wie bei den Hydroxyzimtsäuren aus, nur bei 'Harrow Sweet' ist ein Rückgang der Gehalte zu erkennen und bei der Sorte 'Abate Fetel' lässt sich keine klare Tendenz beobachten. Demgegenüber reagierten diese beiden Birnensorten im zweiten Versuch mit einer Gehaltserhöhung und nur die Unterlage 'Pyrodwarf' mit einer Abnahme der Flavonolgehalte. Der Gehalt der Phenolklasse der Flavanole, welche in der Literatur als eine sehr wichtige Substanzklasse in der Abwehr von Pathogenen beschrieben wird (TREUTTER und FEUCHT 1990a,b; SCALBERT 1991; SIEROTZKI und GESSLER 1993), reagierte je nach Versuch und Genotyp sehr unterschiedlich. So war im ersten Versuch bei 'Abate Fetel' keine deutliche Wirkung der Inokulation zu erkennen, dagegen erhöhte sich im zweiten Versuch die Flavanolkonzentration bei dieser Sorte. Im Vergleich dazu fand in den beiden anderen Genotypen eine Reduzierung der Flavanolgehalte statt.

Insgesamt konnte in diesen beiden Experimenten in jeder der drei Genotypen, ob feuerbrandresistent ('Harrow Sweet'), weniger anfällig ('Pyrodwarf') oder anfällig ('Abate Fetel'), entweder ein konstitutiv hoher Gehalt einer Phenolklasse oder eine durch die Feuerbrandinokulation ausgelöste Gehaltsänderung in einer der Klassen nachgewiesen werden. Somit bestätigt sich die Beeinflussung des Phenolstoffwechsels durch den Feuerbranderreger sowie die Variabilität in der Interaktion zwischen *Erwinia amylovora* und verschiedenen Genotypen.

3.2.2 Beeinflussung der Flavonoidbiosynthese durch eine Prohexadion-Ca-Behandlung

Wie die Ergebnisse aus den Experimenten des vorhergehenden Kapitels (3.2.1) gezeigt haben, kann eine Inokulation mit dem Feuerbranderreger *Erwinia amylovora* Veränderungen in den Gehalten phenolischer Inhaltsstoffe hervorrufen. Eine Reduzierung des Befalls mit dieser Feuerbrandkrankheit konnte durch die Behandlung mit dem Bioregulator Prohexadion-Ca an Apfel- und Birnenpflanzen bereits nachgewiesen werden (YODER et al. 1999; COSTA et al. 2001, 2002; ALDWINCKLE et al. 2002; BUBÁN et al. 2002). Zusätzlich zu dieser Wirkung wurden Modifikationen in der Flavonoidbiosynthese von Apfelpflanzen nach der Anwendung von Prohexadion-Ca festgestellt (RÖMMELT et al. 1999b). Auch bei der Isolierung und Identifizierung phenolischer Inhaltsstoffe aus zuvor mit Prohexadion-Ca behandelten Birnenblättern (Kap. 3.1) konnten außer den konstitutiven Substanzen auch neu gebildete, bisher noch nicht in Birnen beschriebene Verbindungen nachgewiesen werden. Um die Beeinflussung einer Prohexadion-Ca-Anwendung auf die Flavonoidbiosynthese von Birnenblättern zu untersuchen, sind neben den analytischen Ergebnissen der Flavonoidgehalte auch die biochemischen Ergebnisse der Enzymaktivitäten von zwei Experimenten mit Birnenpflanzen erfasst worden. Beide Experimente wurden in enger Kooperation mit dem EU-Projektpartner der TU Wien, Prof. Stich und seinen Mitarbeiter, durchgeführt. Die Durchführung (Behandlung, Inokulation und Probenahme) sowie die Analysen der Flavonoidgehalte fanden in Freising-Weihenstephan statt und die Enzymaktivitäten wurden in Wien von Dr. K. Schlangen analysiert.

3.2.2.1 Behandlung mit Prohexadion-Ca vor einer Feuerbrandinokulation

Blätter der Sorte 'Abate Fetel' wurden in diesem Versuch auf den Einfluss einer Prohexadion-Ca-Vorbehandlung auf die Befallsstärke des Feuerbranderreger sowie auf Veränderungen in der Flavonoidbiosynthese untersucht. Die Blätter von jeweils fünf Pflanzen pro Variante und Probenahmetermin wurde mit einem Gemisch aus zwei Bakterienstämmen inokuliert. Zwei bzw. sieben Tage vor der Inokulation wurden die Pflanzen mit Prohexadion-Ca in den Konzentrationen 125ppm oder 250ppm behandelt. Um die Entwicklung der Feuerbrandinfektion und ebenso die Flavonoidentwicklung zu erfassen, wurde der Versuch auf eine Dauer von knapp einem Monat angesetzt. Dabei erfolgte die Bonitur mit einem

10-stufigen Boniturschema (siehe Kap. 3.2.1) 5, 7, 10, 12, 14, 18 Tage nach der Inokulation und die Entnahme der Blätter für die analytischen und biochemischen Untersuchungen erfolgte 1, 5, 10, 15 Tage nach der Inokulation.

Der Krankheitsverlauf der Versuchspflanzen ist in Abb. 23 dargestellt. In allen inokulierten Blättern zeigten sich ab dem siebten Tag nach der Inokulation erste Feuerbrandsymptome. Bis auf die sieben Tage vorher mit Prohexadion-Ca (125ppm) behandelten Blätter, stieg der Krankheitsindex in den Blättern der anderen Varianten bis 18 Tage nach Inokulation linear an. Allerdings entwickelte sich sowohl in den ohne Vorbehandlung inokulierten Blättern als auch in den behandelten Blättern nur ein geringer Befall. Zudem weist die hohe Standardabweichung in den einzelnen Varianten auf sehr große Unterschiede im Feuerbrandbefall der inokulierten Pflanzen hin. Demnach sind die Veränderungen in den Gehalten der phenolischen Inhaltsstoffe und in den Enzymaktivitäten nicht allein durch die Inokulation bedingt.

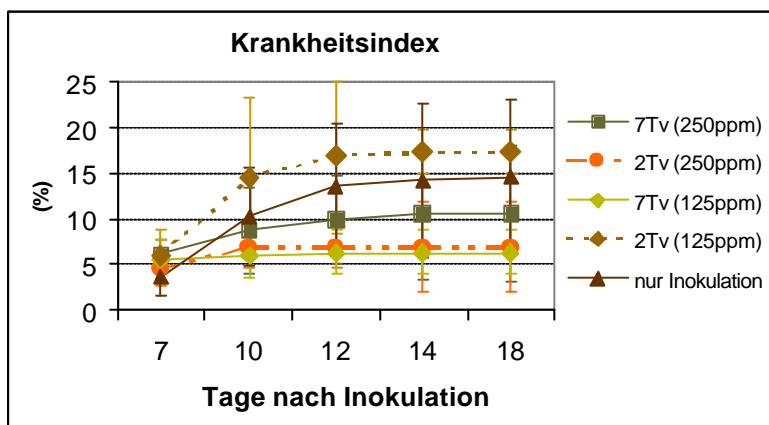


Abb. 23: Entwicklung des Krankheitsverlaufes nach Prohexadion-Ca-Vorbehandlung in Abhängigkeit des Einsatzzeitpunktes und der Konzentration (Mittelwerte der 15 Pflanzen mit Standardabweichung) [Tv = Tage vor Behandlung]

Abbildung 24 stellt einen Überblick des Versuchsaufbaus aller Varianten mit den beiden Behandlungsterminen, dem Inokulationstermin und den vier Probenahmeterminen dar.

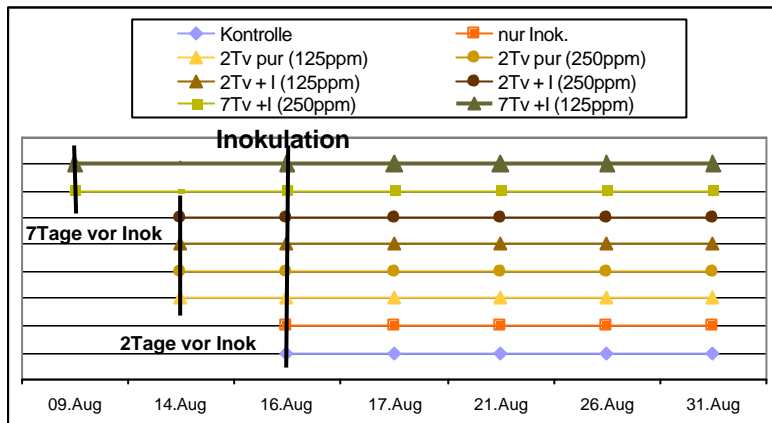


Abb. 24: Versuchsschema mit allen Varianten und Probenahmeterminen [Tv = Tage vor Behandlung; I = Inokulation]

Trotz der geringen Ausprägung der Krankheitssymptome konnten sowohl in den Flavonoidgehalten als auch in den Enzymaktivitäten Abweichungen zwischen den inokulierten und nicht-inokulierten Blättern und zwischen den Prohexadion-Ca-Konzentrationen festgestellt werden.

Allerdings variierten die Ergebnisse nach den unterschiedlichen Behandlungen (Inokulation, Prohexadion-Ca-Behandlung) relativ stark, so dass ein deutlicher Trend nicht klar erkennbar ist.

Wie in Abb. 25 sichtbar, konnten bei der Bestimmung der spezifischen Aktivitäten die höchsten Aktivitäten im Falle der DFR und die geringsten Aktivitäten bei CHS gemessen werden.

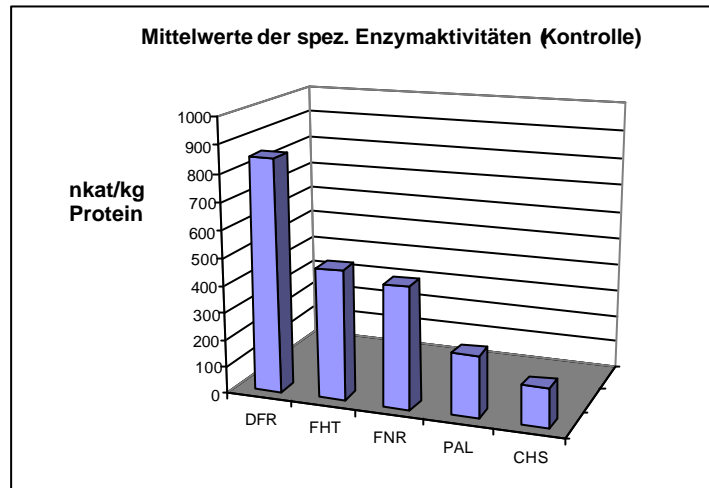


Abb. 25: Mittelwerte der spezifischen Enzymaktivitäten [nkat/kg Protein] in den Kontrollpflanzen

In Abb. 26 sind alle absoluten spezifischen Aktivitäten innerhalb des Experimentes zusammengefasst. Anhand dieser Abbildung ist sichtbar, dass insgesamt die niedrigsten Enzymaktivitäten bei den Pflanzen zu beobachten waren, welche nicht vorbehandelt, sondern nur inokuliert wurden. Pflanzen, welche mit 125ppm Prohexadion-Ca behandelt und sieben Tage nach der Behandlung inokuliert wurden, zeigten ebenfalls insgesamt geringere Enzymaktivitäten als die Kontrollpflanzen. Die höchsten spezifischen Enzymaktivitäten konnten bei den Pflanzen gemessen werden, die zwei Tage nach der Behandlung mit 125ppm Prohexadion-Ca inokuliert wurden. Die nicht inokulierten, vorbehandelten Pflanzen zeigten eher niedrigere Enzymaktivitäten als die unbehandelten Pflanzen.

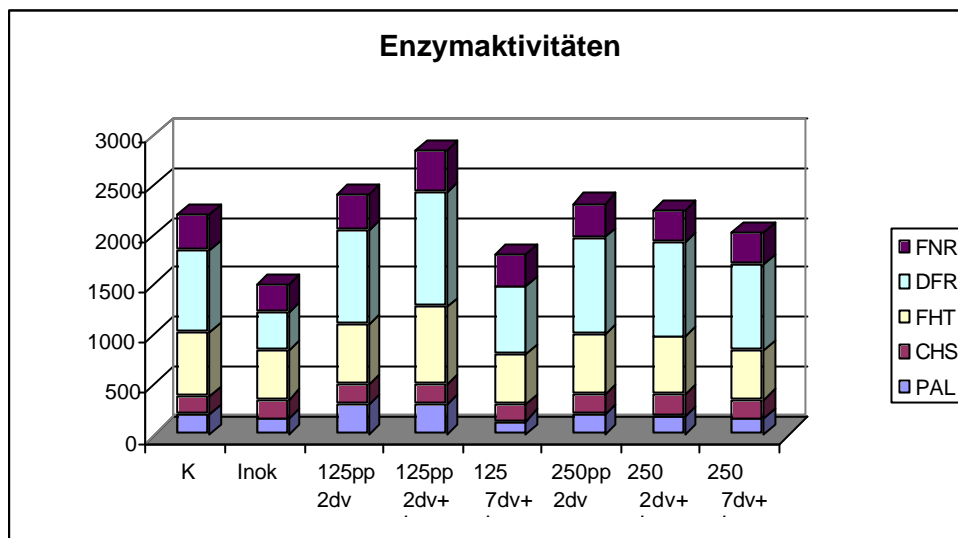


Abb. 26: Übersicht über die spezifischen Enzymaktivitäten der unbehandelten und mit Prohexadion-Ca vorbehandelten, nicht-inokulierten und inokulierten Blätter der Birnensorte 'Abate Fetel'

Die Gehalte der einzelnen Phenolklassen und -substanzen in den mit Prohexadion-Ca (125ppm und 250ppm) vorbehandelten, inokulierten Pflanzen wurden abhängig von den Tagen nach der Behandlung zusammengefasst. In den Abb. 27 bis 34 sind somit die Analysedaten der beiden Prohexadion-Ca-Konzentrationen mit und ohne Inokulation dargestellt.

Über den gesamten Versuchszeitraum betrachtet, erfolgte in allen Varianten eine Reduzierung der phenolischen Inhaltsstoffe (Abb. 27 bis 29). Die einzige Ausnahme bildet die Klasse der Flavanole und deren Einzelsubstanzen (Catechin, Epicatechin) (Abb. 30, 31 und 32). Auch in den nur nach Prohexadion-Ca-Behandlung nachgewiesenen neu induzierten Verbindungen fand eine Gehaltsabnahme statt (Abb. 31 und 34).

In der Summe aller Phenole (Abb. 27) ergaben sich drei Tage nach der Behandlung bis auf die Gehalte in den inokulierten Blättern ohne Vorbehandlung kaum Unterschiede. Lediglich der Gehalt der nicht inokulierten, mit 125ppm Prohexadion-Ca behandelten Blätter lag über dem Gehalt der Kontrollpflanzen. Die Differenz zwischen diesen Varianten zeigte sich in den anschließenden Probenahmen jedoch nicht mehr. 17 Tage nach der Behandlung hob sich die

Kontrollvariante im Vergleich zu den anderen Varianten durch einen geringeren Gesamtphenolgehalt ab.

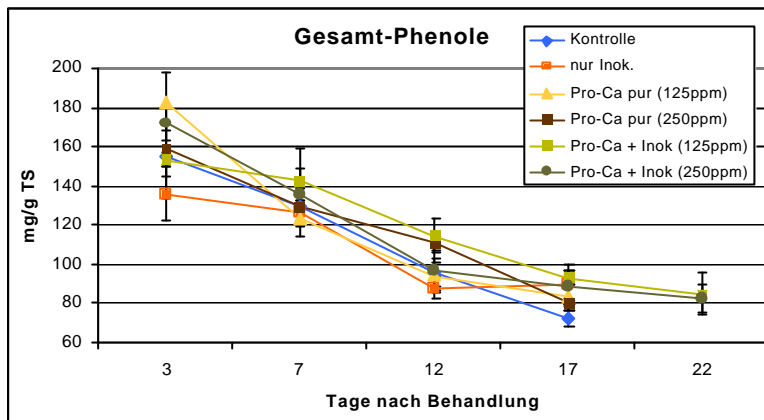


Abb. 27: Entwicklung des Gesamtphenolgehalte nach Prohexadion-Ca-Behandlung vor einer Inokulation [Inok = Inokulation; Pro-Ca = Prohexadion-Ca]

Eine Stimulierung der Hydroxyzimtsäuresynthese wurde nur in den nicht-inokulierten, behandelten (250ppm) Pflanzen ermittelt (Abb. 28). In den ohne Vorbehandlung inokulierten Pflanzen fand dagegen sogar eine verminderte Synthese statt. Der Konzentrationsunterschied von Prohexadion-Ca zeigte sich nur zwölf Tage nach der Behandlung mit leicht höheren Gehalten in den 125ppm behandelten Blättern. Die Kontrollblätter wiesen am vierten Termin geringere Gehalte an Hydroxyzimtsäuren als die anderen Varianten auf.

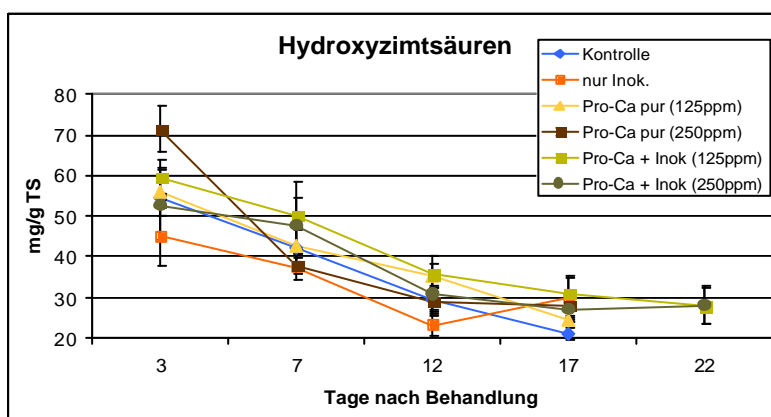


Abb. 28: Entwicklung der Hydroxyzimtsäuregehalte nach Prohexadion-Ca-Behandlung vor einer Inokulation [Inok = Inokulation; Pro-Ca = Prohexadion-Ca]

An den ersten Probenahmeterminen traten außer den niedrigen Gehalten in den mit 125ppm vorbehandelten, inokulierten Blättern, keine wesentlichen Unterschiede bei den Flavonolglykosiden innerhalb der Varianten auf (Abb. 29). Der Effekt der Prohexadion-Ca-Behandlung und der Inokulation zeigte sich am dritten Termin in den verminderten Gehalten gegenüber dem in den unbehandelten, nicht-inokulierten Kontrollpflanzen. Am vierten Termin sind wieder kaum Unterschiede zwischen den Kontroll- zu den anderen Pflanzen erkennbar. Zwischen den Gehalten der mit unterschiedlichen Konzentrationen vorbehandelten, inokulierten Pflanzen war am letzten Termin ein deutlicher Unterschied zu erkennen.

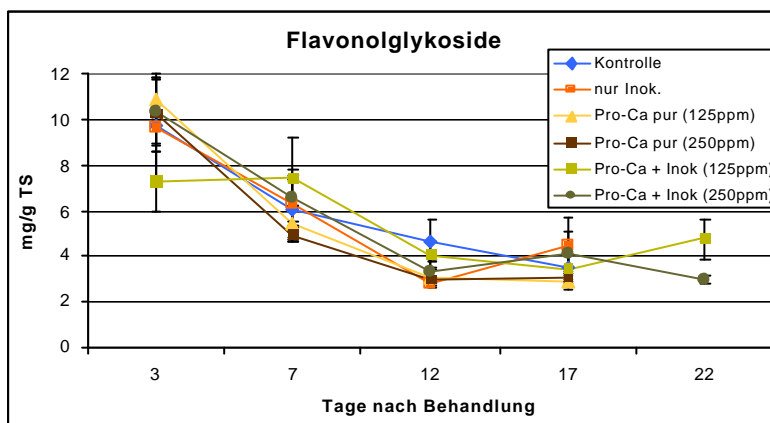


Abb. 29: Entwicklung der Flavonolglykosidgehalte nach Prohexadion-Ca-Behandlung vor einer Inokulation [Inok = Inokulation; Pro-Ca = Prohexadion-Ca]

Bereits am ersten Termin war eine leichte Wirkung der Prohexadion-Ca-Behandlung durch die erhöhte Synthese der Flavanole sichtbar (Abb. 30). Am zweiten Termin hoben sich diese Unterschiede allerdings bis auf die gesteigerten Gehalte in den Pflanzen der Varianten 250ppm ohne Inokulation auf. Am vierten Probenahmetermin hatten die Kontrollpflanzen erneut niedrigere Gehalte als die mit Prohexadion-Ca behandelten Pflanzen. Insgesamt nahm der Flavanolgehalt nicht wie der Gehalt der anderen phenolischen Verbindungen über den Versuchszeitraum ab, sondern blieb mehr oder weniger konstant.

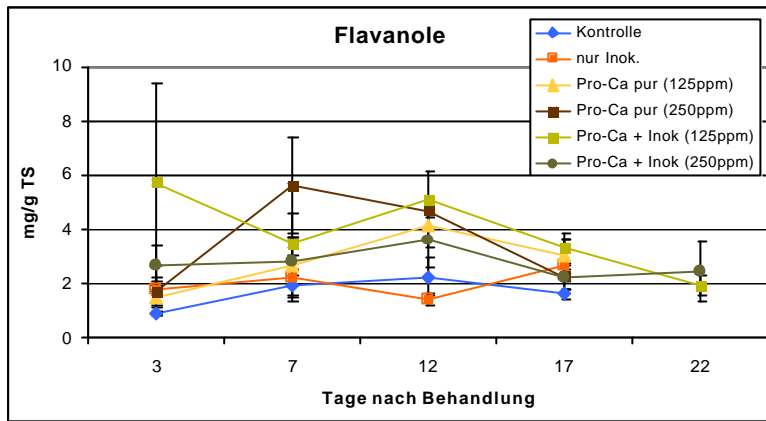


Abb. 30: Entwicklung der Flavanolgehalte nach Prohexadion-Ca-Behandlung vor einer Inokulation [Inok = Inokulation; Pro-Ca = Prohexadion-Ca]

In den behandelten Blättern wurden Eriodictyol 7-glukosid und Luteoliflavan neu gebildet und bereits drei Tage nach der Prohexadion-Ca-Behandlung nachgewiesen. Bis auf den erhöhten Eriodictyol 7-glukosid (Abb. 31) 17 Tage nach der Behandlung in den mit 125ppm vorbehandelten, nicht-inokulierten Pflanzen ergaben sich an den anderen Terminen keine deutlichen Unterschiede zwischen den beiden Konzentrationen und den nicht-inokulierten und inokulierten Varianten.

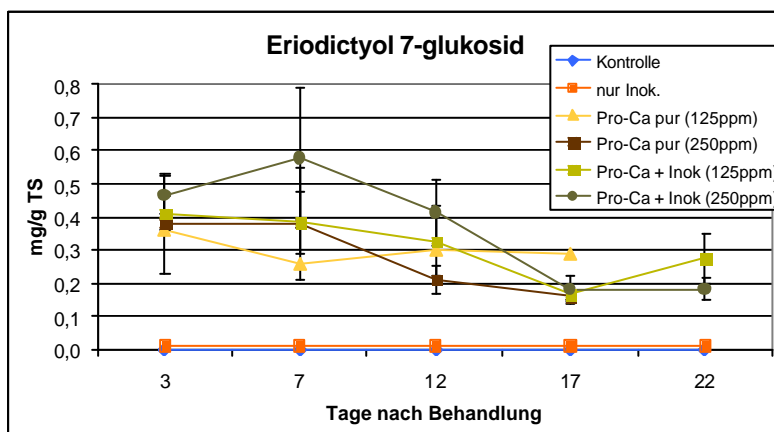


Abb. 31: Entwicklung der Eriodictyol 7-glukosid-Gehalte nach Prohexadion-Ca-Behandlung vor einer Inokulation [Inok = Inokulation; Pro-Ca = Prohexadion-Ca]

Differenzen zwischen den Varianten zeigten sich im Luteoliflavangehalt (Abb. 32) nur am ersten Probenahmetermin in den hohen Konzentrationen in den mit 125ppm behandelten, inokulierten Pflanzen. Im gesamten Versuch lag der Luteoliflavangehalt nur geringfügig über dem Gehalt von Eriodictyol 7-glukosid.

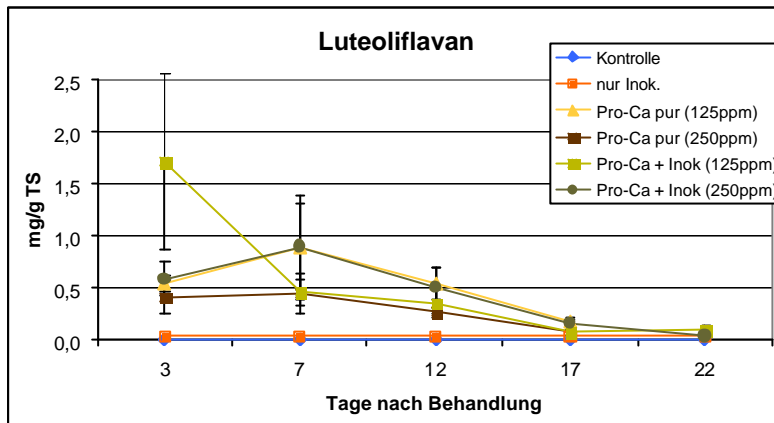


Abb. 32: Entwicklung der Luteoliflavangehalte nach Prohexadion-Ca-Behandlung vor einer Inokulation [Inok = Inokulation; Pro-Ca = Prohexadion-Ca]

3.2.2.2 Entwicklungen in der Flavonoidbiosynthese nach einer Prohexadion-Ca-Behandlung

Die Probenahme in diesem Versuch wurde auf 28 Tage ausgedehnt. Dadurch sollte zum einen die Entwicklung der Flavonoidgehalte über einen längeren Zeitraum beobachtet werden und zum anderen sollte vor allem die Frage nach der Wirkungsdauer einer Prohexadion-Ca-Behandlung auf die induzierten wie auch auf die konstitutiven Flavonoide beantwortet werden. Desweiteren sollte der Konzentrationsunterschied von Prohexadion-Ca (125ppm und 250ppm) erneut untersucht werden.

Jeweils das erste Blatt von je fünf Pflanzen pro Probenahme und Variante (Kontrolle, Prohexadion-Ca (250ppm und 125ppm)) wurden auf ihre Konzentrationen an phenolischen Inhaltsstoffen analysiert. Für die biochemischen Analysen wurden Blätter von zusätzlichen behandelten und unbehandelten Pflanzen entnommen.

Über den gesamten Versuchszeitraum zeigte sich eine kontinuierliche Konzentrationsabnahme in der Summe aller Phenole wie auch in den beiden Phenolklassen Hydroxyzimtsäuren und Flavonolglykoside (Abb. 33). Bis auf wenige Unterschiede verhielten sich die Konzentrationen in den einzelnen Varianten (Kontrolle, Pro-Ca 250ppm, Pro-Ca 125ppm) sehr ähnlich. Nur bei den Flavonolglykosiden bewirkte die Prohexadion-Ca-Behandlung eine leichte Reduzierung. Dagegen wurden in den Blättern der Variante Pro-Ca 250ppm ab dem 15. Tag in den Gesamtphenolen und Hydroxyzimtsäuren erhöhte Gehalte festgestellt.

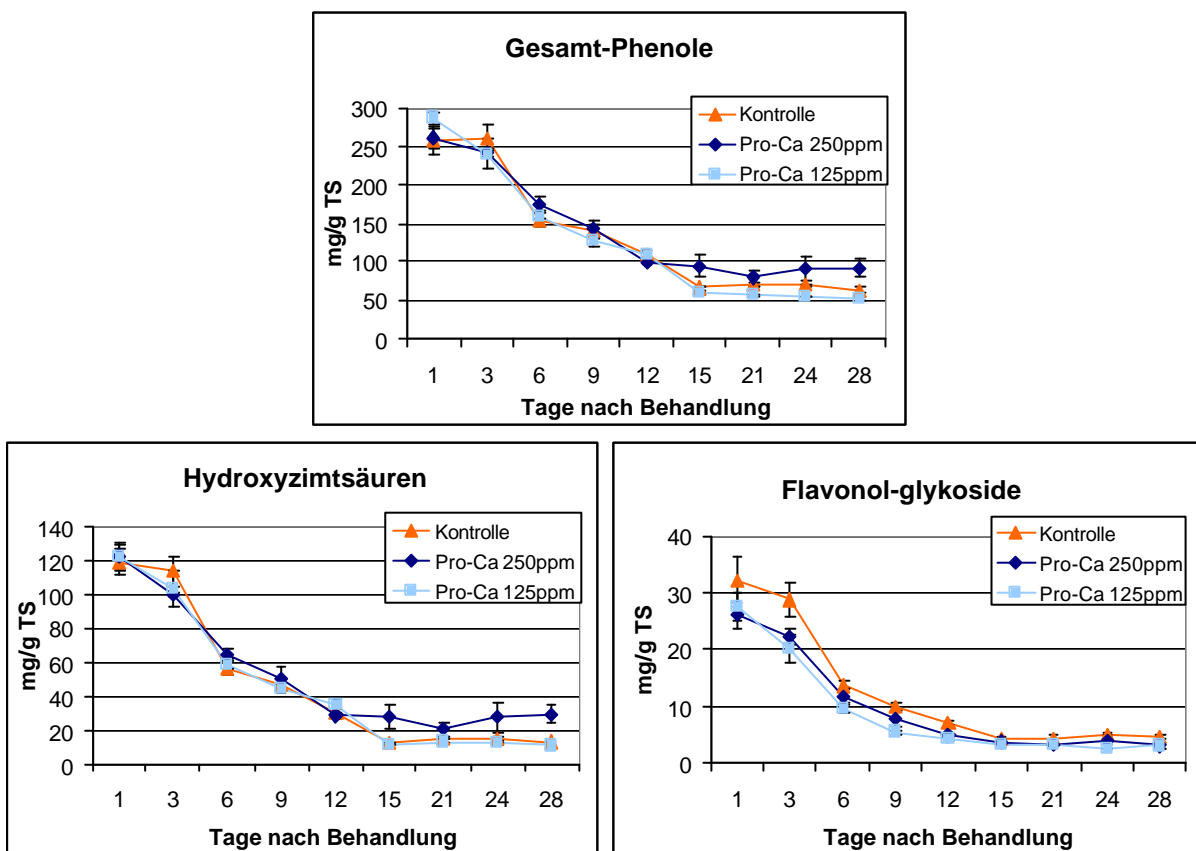


Abb. 33: Entwicklung der Konzentrationen der Gesamtphenole, der Hydroxyzimtsäuren und der Flavonolglykoside nach Prohexadion-Ca-Behandlung über den Versuchszeitraum von 28 Tagen (Mittelwerte der 5 Wiederholungen mit Standardabweichung) [Pro-Ca = Prohexadion-Ca]

Ein völlig anderer Konzentrationsverlauf zeigte sich bei den Flavanolen (Abb. 34). Die Summe aller Flavanole war am ersten Probenahmetermin in den Varianten gleich hoch, dann stieg der Gehalt in den Prohexadion-Ca-Varianten (mit Maximum am dritten Tag in Pro-Ca

250ppm) an und der Gehalt in der Kontrolle blieb ungefähr auf dem Ausgangsniveau. Mit Ausnahme des 15. und 28.Tages waren die Konzentrationen ab dem zwölften Tag in allen Blättern einheitlich. Die erhöhte Konzentration in der Variante Pro-Ca 250ppm am 15.Tag lag auch bei Epicatechin und dem Procyanidin B2 vor. Der auffällig hohe Wert derselben Variante am letzten Versuchstag war dagegen in allen Flavanolen zu finden (Abb. 34). Die Gehalte des monomeren Flavonols Catechin waren zu Versuchsbeginn in allen Varianten auf demselben Niveau. Nach einem leichten Anstieg der Gehalte an den ersten Tagen in den beiden Prohexadion-Ca-Varianten, verringerten sich die Gehalte im weiteren Versuchsverlauf. Im Vergleich dazu fand in den Kontrollblättern eine konstante Abnahme statt. Die Konzentrationen des Procyanidins B1 reduzierten sich innerhalb des Versuches ebenfalls. Zwischen den Varianten wurden jedoch keine Unterschiede beobachtet. Epicatechin sowie das formal aus zwei Epicatechin-Einheiten bestehende Procyanidin B2 zeigten eine sehr ähnliche Konzentrationsentwicklung. In beiden Verbindungen stieg die Konzentration in der Variante Pro-Ca 250ppm bis zu dem höchsten Wert am neunten Tag an, reduzierte sich anschließend auf das Niveau der Ausgangskonzentration und erhöhte sich nochmals bis zum Versuchsende. Abweichungen waren im Vergleich dazu in den Varianten Pro-Ca 125ppm und Kontrolle nur am 15. und 28.Tag festzustellen.

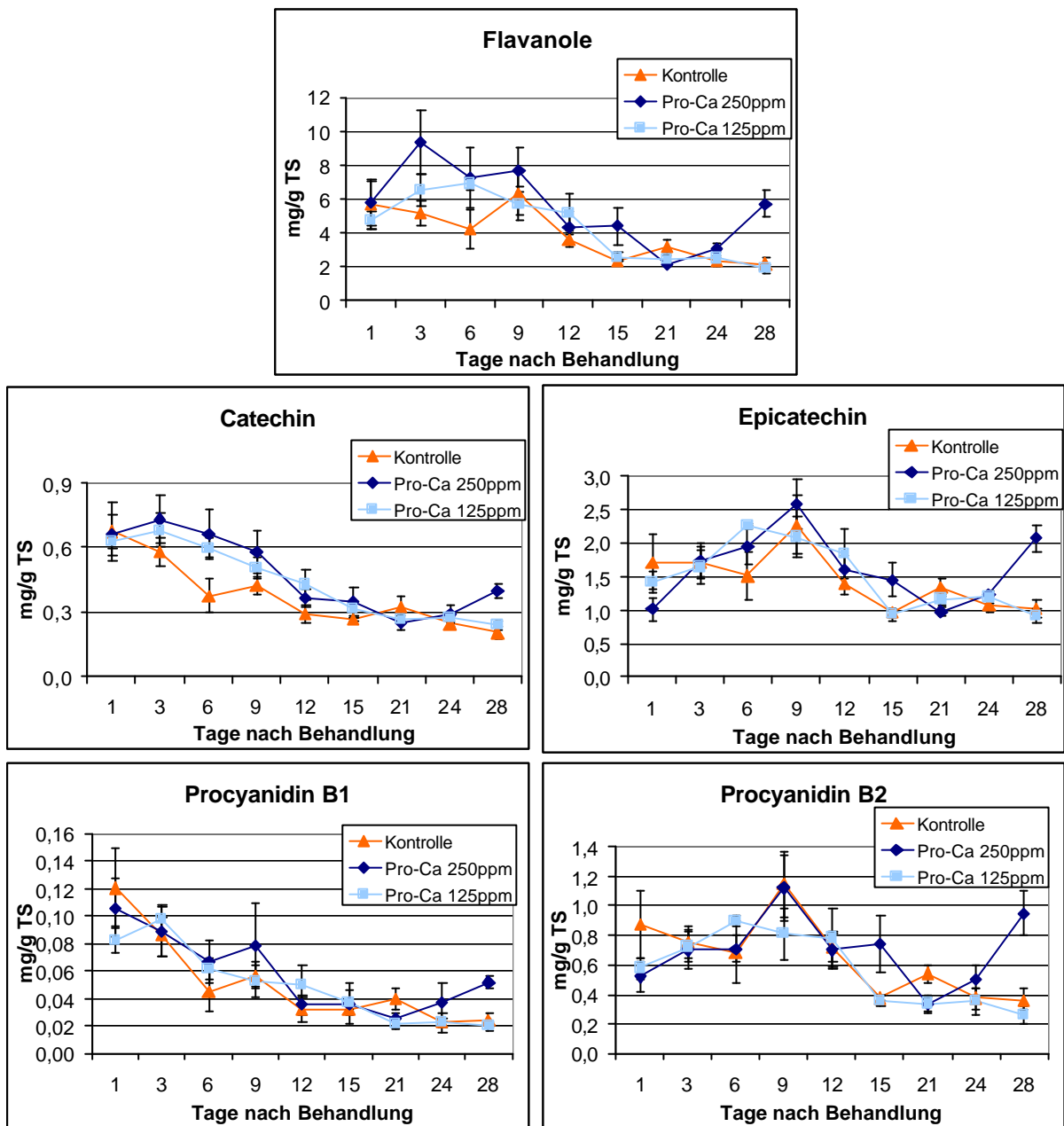


Abb. 34: Entwicklung der Konzentrationen der Gesamtflavanole, der monomeren Flavanole Catechin und Epicatechin und der Procyanidine B1 und B2 nach Prohexadion-Ca-Behandlung über den Versuchszeitraum von 28 Tagen (Mittelwerte der 5 Wiederholungen mit Standardabweichung) [Pro-Ca = Prohexadion-Ca]

Bereits am ersten Probenahmetermin konnten die Verbindungen Eriodictyol 7-glukosid, Luteoliflavan und weitere neu induzierte Flavanole in den mit Prohexadion-Ca behandelten Blättern nachgewiesen werden (Abb. 35). Zwischen den beiden Prohexadion-Ca-Konzentrationen waren bis auf den 28.Tag keine weiteren Unterschiede im Verlauf und in der

Höhe von Eriodictyol 7-glukosid festzustellen. Die höchsten Gehalte wurden in beiden Konzentrationen drei und sechs Tage nach der Prohexadion-Ca-Behandlung ermittelt. Eine rasche Umstellung der Biosynthese zeigte sich in den behandelten Blättern in der Induktion von Luteoliflavan und von anderen induzierten Flavanolen. Der höchste Gehalt dieser Substanzen wurde bereits drei Tage nach der Behandlung gemessen, anschließend folgte eine deutliche Reduzierung. Vor allem in der Variante Pro-Ca 125ppm lag der Gehalt an den letzten Versuchstagen nur noch knapp über der Nachweisgrenze.

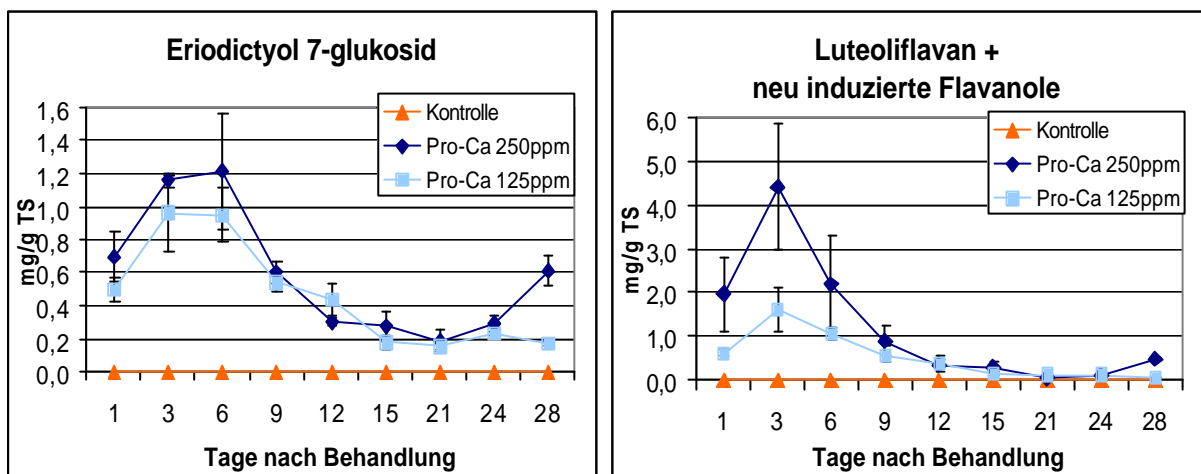


Abb. 35: Entwicklung der Konzentrationen von Eriodictyol 7-glukosid, Luteoliflavan und anderer neu induzierter Flavaneole nach Prohexadion-Ca-Behandlung über den Versuchszeitraum von 28 Tagen (Mittelwerte der 5 Wiederholungen mit Standardabweichung)

Eine Abnahme der untersuchten spezifischen Enzymaktivitäten konnte in allen drei Varianten im Verlauf des Versuches beobachtet werden (Abb. 36, 39 und 40). Abgesehen von der PAL-Aktivität in den Kontrollblättern, welche an den ersten beiden Probenahmeterminen zuerst zunahm und sich dann reduzierte, nahmen die Aktivitäten der anderen Enzyme in den unbehandelten Blättern vom ersten gemessenen Wert bis zum letzten um 60-80% stetig ab. Eine Zunahme der PAL-Aktivität über das Ausgangsniveau zeigte sich am zweiten Termin ebenfalls in den mit 250ppm behandelten Blättern. Bis auf wenige Ausnahmen waren die spezifischen Aktivitäten der Enzyme CHS, FHT, DFR und FNR in den behandelten Blättern höher als in den unbehandelten. Unterschiede zwischen den beiden Prohexadion-Ca-

Konzentrationen wurden nur in den Aktivitäten der DFR und der FNR festgestellt. Hierbei lagen in den mit 250ppm behandelten Blättern die DFR-Aktivitäten über und in den FNR-Aktivitäten unter den mit 125ppm behandelten. Neun Tage nach der Prohexadion-Ca-Behandlung wurden in den 250ppm-Blättern Anstiege in den spezifischen Aktivitäten der CHS, der DFR und der FNR gemessen. Eine Zunahme der FHT-Aktivitäten erfolgte in diesen Blättern erst zwölf Tage nach der Behandlung. An demselben Termin konnten ebenfalls erhöhte Aktivitäten in den Enzymen FHT, DFR und FNR in den mit 125ppm behandelten Blättern nachgewiesen werden.

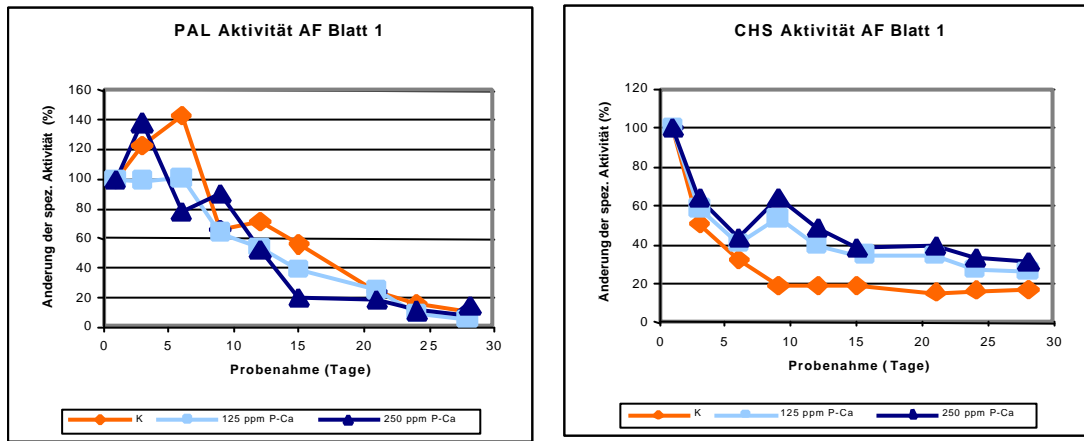


Abb. 36: Spezische Aktivitäten der Enzyme PAL und CHS in Birnenblättern der Sorte `Abate Fetel`

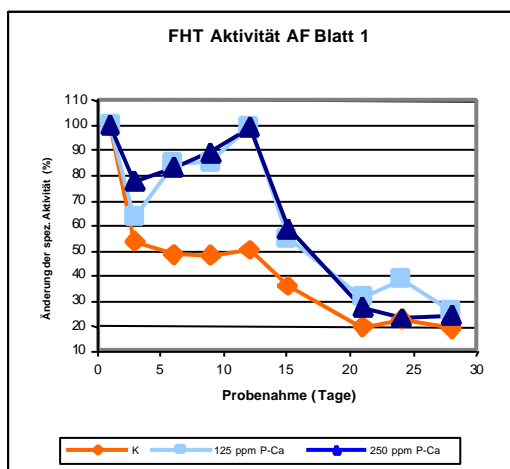


Abb. 37: Spezische Aktivitäten des Enzyms FHT in Birnenblättern der Sorte `Abate Fetel`

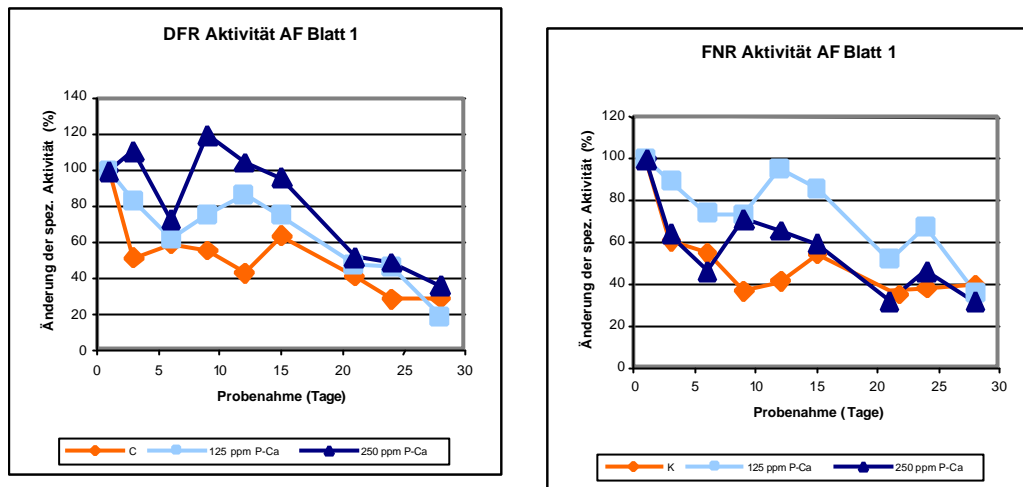


Abb. 38: Spezische Aktivitäten der Enzym FNR und DFR in Birnenblättern der Sorte 'Abate Felat'

3.2.2.3 Diskussion

Die Ergebnisse der beiden vorangegangenen Experimente zeigen, dass Prohexadion-Ca in den behandelten Birnenpflanzen deutliche Änderungen in den spezifischen Aktivitäten der an der Flavonoidbiosynthese beteiligten Enzyme sowie in den Gehalten der Phenolklassen und -substanzen hervorrufen kann.

Nachdem in den mit Feuerbrand inokulierten Blättern insgesamt ein sehr niedriger Krankheitsindex von 5-20% bonitiert wurde und die Standardabweichungen in diesen Varianten zudem sehr hoch waren, können die Modifikationen in der Flavonoidbiosynthese nicht einwandfrei auf die Inokulation zurückgeführt werden. Die Repression von Enzymaktivitäten wie sie auch von VENISSE et al. (2002) beschrieben wurde, konnten nur in den nicht mit Prohexadion-Ca behandelten, inokulierten Blättern im Vergleich zu den nicht-inokulierten Kontrollblättern beobachtet werden. Da sich die Folgen dieser reduzierten Enzymaktivitäten allerdings nicht in den Konzentrationen der Flavonoide widerspiegeln und zudem kein deutlicher Effekt in der Flavonoidbiosynthese in den inokulierten, mit Prohexadion-Ca behandelten Blättern beobachtet werden konnte, wurde über die Inokulation keine nähere Diskussion angestellt.

Als eine Ursache für den Einfluss der Behandlungen mit Prohexadion-Ca auf die Flavonoidbiosynthese kann die hohe Strukturähnlichkeit des Prohexadion-Ca mit der 2-Oxoglutarinsäure gesehen werden. Denn aufgrund dieser Eigenschaft können durch die Anwendung von Prohexadion-Ca 2-oxoglutarinsäureabhängige Dioxygenasen, welche in der Flavonoidbiosynthese ebenso vorhanden sind wie in der Gibberellin- und der Ethylenbiosynthese, gehemmt werden (RADEMACHER 2000). An Dioxygenasen in der Flavonoidbiosynthese werden die FHT, die FNS I, die FLS und die ANS beschrieben (FORKMANN und HELLER 1999). So wiesen im ersten Versuch die nur mit Prohexadion-Ca behandelten Blätter eine geringfügig niedrigere FHT-Aktivität auf und im zweiten Versuch erhöhte sich diese Enzymaktivität nach der Behandlung. Im Vergleich zu den unbehandelten Blättern zeigten sich keine niedrigeren Konzentrationen in den 3-Hydroxyflavonoiden. Die Folge der gesteigerten FHT-Aktivitäten war in beiden Experimenten in den hohen Konzentrationen der Phenolklasse der Flavanole zu erkennen. Höhere Gehalte an Flavanolen nach einer Behandlung mit Prohexadion-Ca wurden ebenfalls in Apfelblättern (RÖMMELT 2003b) und *in-vitro* Apfelpflanzen (RÜHMANN und TREUTTER 2003) nachgewiesen.

Die leicht erhöhte PAL-Aktivitäten in den mit 125ppm behandelten Pflanzen im ersten Versuch und die induzierte Aktivität dieses Enzyms in den mit 250ppm behandelten sowie in den Kontrollblättern an den ersten Versuchstagen im zweiten Versuch bewirkten in den Summen aller Phenole und in den Summen der Hydroxyzimtsäuren keine Konzentrationsänderungen. Der Gehaltsanstieg in diesen Summen 15 Tage nach der Prohexadion-Ca-Behandlung in den mit 250ppm behandelten Blättern ist daher nicht auf die unveränderte PAL-Aktivität, sondern vielmehr auf eine erhöhte CHS-Aktivität in diesen Blättern zurückzuführen. Weshalb allerdings der Gehalt in den mit 125ppm behandelten Blättern trotz der hohen Aktivität dieses Enzyms nicht ebenso zunimmt, ist nicht ersichtlich.

In beiden Experimenten sind beim Vergleich zwischen den unbehandelten und den behandelten Blättern in den Kontrollblättern höhere Flavonolglykosid-Konzentrationen festzustellen. Erklärbar ist dieser Unterschied in den Konzentrationen durch die Annahme, dass das 2-oxoglutarinsäureabhängige Enzym FLS nach der Prohexadion-Ca-Behandlung zeitweilig gehemmt wird und dadurch die Umwandlung der Dihydroflavonole zu den Flavonolen nicht mehr stattfinden kann.

Aufgrund der höheren Aktivität der CHS, der FHT und der DFR im zweiten Versuch in den behandelten Blättern, waren in diesen Blättern die Catechingehalte an den meisten Probenahmeterminen höher als die der Kontrollblätter. Niedrigere Gehalte als in den unbehandelten Blättern waren dagegen einen Tag nach der Prohexadion-Ca-Behandlung bei

Epicatechin und 20 Tage später bei dem Procyanidin B2 in den behandelten Blättern zu erkennen. An den anderen Terminen waren die Gehalte dieser Substanzen in den unbehandelten und behandelten Blättern ungefähr gleich hoch. Sowohl für das Catechin als auch für das Epicatechin stellen die Leucoanthocyanidine Vorstufen in der Biosynthese dieser monomeren Flavan 3-ole dar. Die Reduktion zu Catechin erfolgt dabei über einen Enzymschritt (FORKMANN und HELLER 1999), wohingegen vor der Reduktion zu Epicatechin durch die ANR zuerst noch die Umsetzung zu den Anthocyanindinen stattfinden muß (XIE et al. 2004). Eventuell steht aufgrund dieses „zusätzlichen“ Biosyntheseschrittes weniger Ausgangssubstrat für die Umsetzung zu Epicatechin als für das Catechin zur Verfügung.

Neben den Veränderungen in den Konzentrationen der konstitutiven Flavonoide konnten in beiden Versuchen schon einen bzw. drei Tage nach der Behandlung mit Prohexadion-Ca neu gebildete Verbindungen nachgewiesen werden. Zwei dieser bereits in Kap. 3.1 als das 3-Deoxycatechin Luteoliflavan und das Flavanoglykosid Eriodictyol 7-glukosid identifizierten Verbindungen wurden erstmalig und ebenfalls nur in mit Prohexadion-Ca behandelten Apfelpflanzen von RÖMMELT et al. (1999b) beschrieben. Nach STICH und FORKMANN (1988a,b) sind zwei Voraussetzungen für die Biosynthese zu den 3-Deoxy-flavonoiden notwendig. Zum einen die Akkumulation von Flavanonen aufgrund einer Hemmung der FHT und zum anderen die Fähigkeit der Pflanze mit dem Enzym FNR diese Flavanone zu den entsprechenden Flavan 4-olen umzuwandeln. In Untersuchungen mit Prohexadion-Ca behandelten Birnenpflanzen belegten FISCHER et al. (2003), dass außer der FNR auch die DFR Flavanone zu Flavan 4-olen reduzieren kann. Über den gesamten Versuchszeitraum des zweiten Experimentes wurden höhere DFR-Aktivitäten in den allen behandelten Blättern und höhere FNR-Aktivitäten in den 125ppm-Blättern festgestellt. Die maximale Akkumulation des Luteoliflavans und der neu induzierten Flavanole drei Tage nach der Prohexadion-Ca-Behandlung ist jedoch nicht mit den Enzymaktivitäten der DFR und/oder der FNR erklärbar.

Die kontinuierliche Abnahme der Konzentrationen der Hydroxyzimtsäuren, der Flavonolglykoside, des Catechins, des Procyanidins B1 und aller neu gebildeten Verbindungen im Versuchsverlauf ist sowohl in den behandelten wie auch in den unbehandelten Blättern zu beobachten und kann daher nicht mit der nachlassenden Wirkung von Prohexadion-Ca, welche nach Angaben von EVANS et al. (1999) in höheren Pflanzen einige Wochen anhält, begründet werden. Vielmehr scheint diese Reduzierung der Flavonoidbiosynthese durch die Entwicklung der Blätter reguliert zu werden. Diese Einflussnahme des Blattalters auf die Biosynthese bestätigte sich ebenfalls bei Epicatechin und dem formal aus zwei Epicatechin-Einheiten bestehenden Procyanidin B2. Zwar

unterscheidet sich ihr Konzentrationsverlauf von dem der anderen Phenylpropanoide, die Blätter aller drei Varianten bei diesen Substanzen verhalten sich jedoch sehr ähnlich.

Inwieweit der Effekt einer Behandlung mit Prohexadion-Ca auf die Phenylpropanoide durch unterschiedliche Faktoren beeinflussbar ist, war Gegenstand der im anschließenden Kapitel beschriebenen Versuche.

3.2.3 Einfluß exogener und endogener Faktoren auf die Phenolbiosynthese nach einer Prohexadion-Ca-Behandlung

Die Ergebnisse aus den vorangegangenen Kapiteln zeigen einerseits, dass Pflanzen auf Stresssituationen wie einer Pathogeninfektion (Feuerbrand) oder einer Pflanzenschutzbehandlung (Prohexadion-Ca), mit Veränderungen in der Biosynthese der Phenylpropanoide reagieren und andererseits, dass diese Reaktionen von Faktoren wie den Bakterienstämmen, den Genotypen und der Blattentwicklung abhängig sind. Der Zusammenhang zwischen der Flavonoidbiosynthese und der Beeinflussung der Phenylpropanoide durch das Blattalter, den Pflanzengentypen, der Nährstoff-, Wasser- und Lichtversorgung sowie einem Pathogenbefall wurde in zahlreichen Untersuchungen bereits beschrieben (HILDEBRAND und SCHROTH 1964; DRUMM-HERREL 1987; TREUTTER und FEUCHT 1990a,b; MICHALEK 1997, RÜHMANN et al. 2002). Die Fragen der nachfolgend beschriebenen Experimente waren daher, welchen Einfluss exogene und endogene Faktoren auf die Zusammensetzung der Phenole haben und ob sich diese Unterschiede auch auf den Effekt von Prohexadion-Ca auswirken.

3.2.3.1 Einfluss des Blattalters auf die Akkumulation phenolischer Verbindungen

Für die Untersuchungen über die altersbedingten Veränderungen in der Akkumulation phenolischer Verbindungen wurden je sechs Pflanzen des Genotyps 'Pyrodwarf' mit Wasser (= Kontrolle) und mit Prohexadion-Ca (in den Konzentrationen 250ppm und 125ppm) behandelt. Drei und 14 Tage nach der Behandlung wurden jeweils die drei jüngsten, vor der Behandlung markierten, Blätter jeder Pflanze eingesammelt und ihr Gehalt analysiert.

Bei den meisten phenolischen Verbindungen zeigten sich in allen Varianten die höchsten Konzentrationen in den ersten Blättern und eine kontinuierliche Konzentrationsabnahme vom ersten zum dritten Blatt (Abb. 39 bis Abb. 46). Desweiteren reduzierte sich der Gehalt aller

Phenole (Abb. 39) innerhalb des Versuchszeitraumes erheblich. So war die Konzentration im ersten Blatt der Kontrollpflanzen am dritten Tag mit 234mg/g TS im Vergleich zur Konzentration am 14. Tag mit 164mg/g TS deutlich höher.

Ein ähnlicher Verlauf ließ sich auch in den beiden Phenolklassen Hydroxyzimtsäuren und Flavonolglykoside erkennen (Abb. 40 und 41). Bei beiden Klassen verringerte sich der Gehalt vom jüngsten zum ältesten Blatt sowie vom ersten zum letzten Probetermin. Die größte Differenz der Gehalte zwischen dem dritten und dem 14. Tag war bei diesen Klassen in allen drei Altersstufen der Kontrollblätter zu verzeichnen.

Im Gegensatz zur Entwicklung dieser phenolischen Verbindungen zeichnete sich bei den Flavanolen, trotz der relativ großen Streuungen, ein Anstieg in den Konzentrationen über den Versuchszeitraum ab (Abb. 42). Die höchste Zunahme erfolgte dabei in den mit 250ppm behandelten Blättern. Im Gegensatz zu Epicatechin blieben die Konzentrationen bei Catechin in den mit 125ppm behandelten und in den unbehandelten Kontrollblättern relativ konstant und nur die Konzentrationen der mit 250ppm behandelten nahmen im Versuchsverlauf zu. Im Vergleich dazu, erhöhten sich die Gehalte von Epicatechin vom dritten auf den 14.Tag in allen drei Varianten und allen Blattaltersstufen.

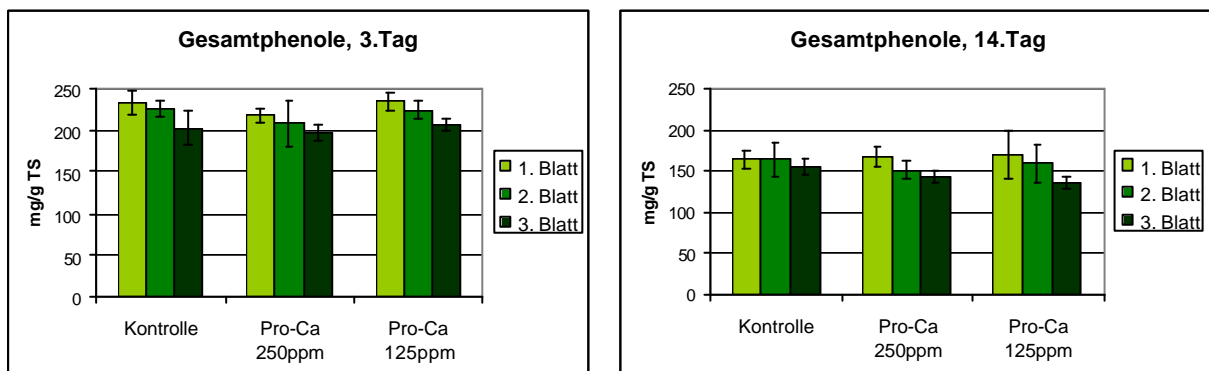


Abb. 39: Gehalte der Gesamtphenole 3 Tage und 14 Tage nach Behandlung mit Wasser (Kontrolle) und Prohexadion-Ca (250ppm und 125ppm) in Abhängigkeit vom Blattalter (Mittelwerte der 6 Wiederholungen mit Standardabweichung) [Pro-Ca = Prohexadion-Ca]

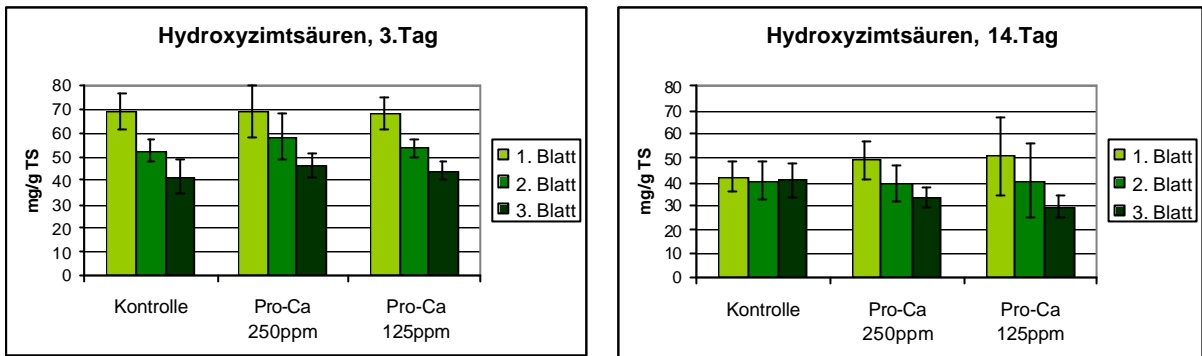


Abb. 40: Gehalte der Hydroxyzimtsäuren 3 Tage und 14 Tage nach Behandlung mit Wasser (Kontrolle) und Prohexadion-Ca (250ppm und 125ppm) in Abhängigkeit vom Blattalter (Mittelwerte der 6 Wiederholungen mit Standardabweichung) [Pro-Ca = Prohexadion-Ca]

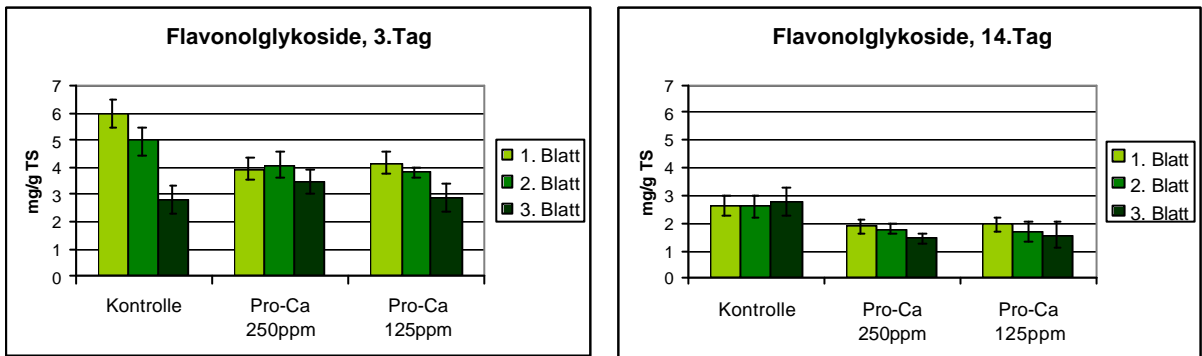


Abb. 41: Gehalte der Flavonolglykoside 3 Tage und 14 Tage nach Behandlung mit Wasser (Kontrolle) und Prohexadion-Ca (250ppm und 125ppm) in Abhängigkeit vom Blattalter (Mittelwerte der 6 Wiederholungen mit Standardabweichung) [Pro-Ca = Prohexadion-Ca]

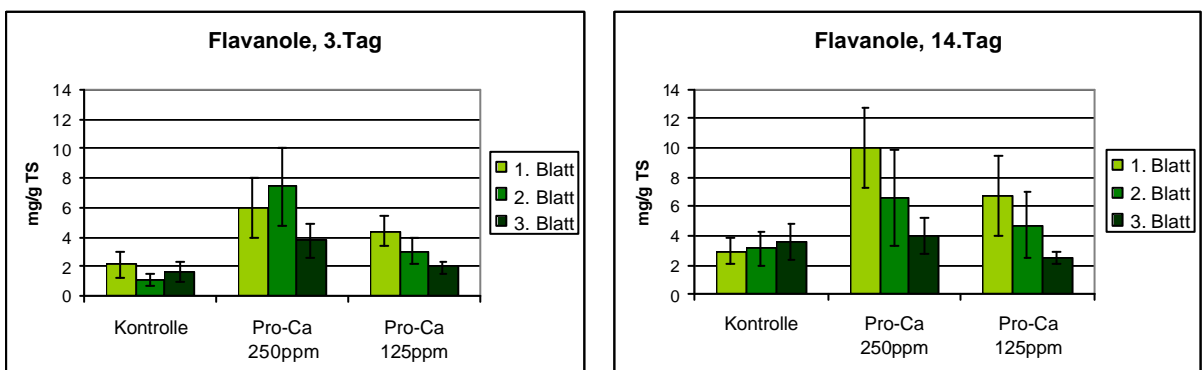


Abb. 42: Gehalte der Flavanole 3 Tage und 14 Tage nach Behandlung mit Wasser (Kontrolle) und Prohexadion-Ca (250ppm und 125ppm) in Abhängigkeit vom Blattalter (Mittelwerte der 6 Wiederholungen mit Standardabweichung) [Pro-Ca = Prohexadion-Ca]

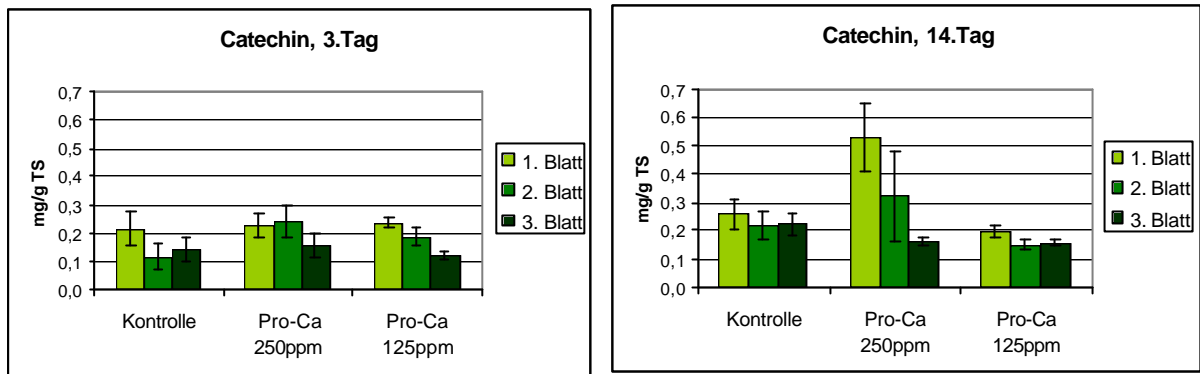


Abb. 43: Gehalte von Catechin 3 Tage und 14 Tage nach Behandlung mit Wasser (Kontrolle) und Prohexadion-Ca (250ppm und 125ppm) in Abhängigkeit vom Blattalter (Mittelwerte der 6 Wiederholungen mit Standardabweichung) [Pro-Ca = Prohexadion-Ca]

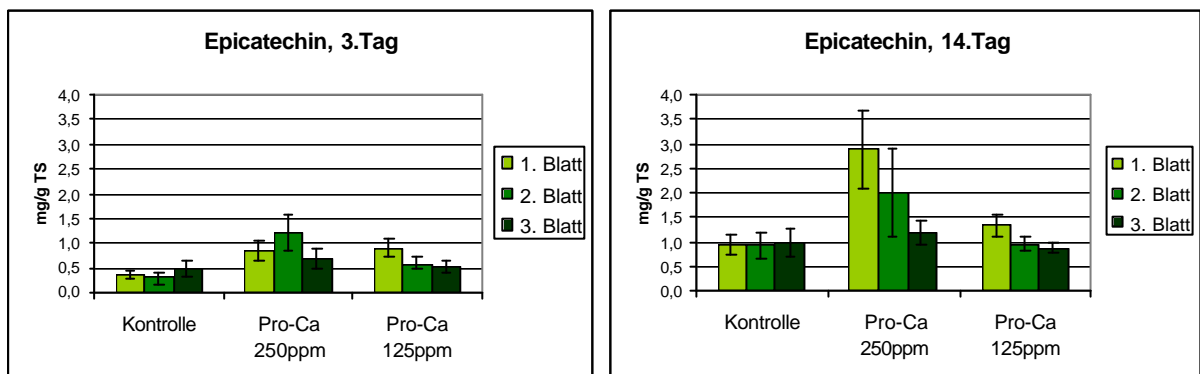


Abb. 44: Gehalte von Epicatechin 3 Tage und 14 Tage nach Behandlung mit Wasser (Kontrolle) und Prohexadion-Ca (250ppm und 125ppm) in Abhängigkeit vom Blattalter (Mittelwerte der 6 Wiederholungen mit Standardabweichung) [Pro-Ca = Prohexadion-Ca]

In den Abbildungen 45 und 46 sind die beiden neu induzierten Substanzen Luteoliflavan und Eriodictyol 7-glukosid dargestellt.

Bei dem Flavanon Eriodictyol 7-glukosid war ein tendenzieller Anstieg der Gehalte über den Versuchszeitraum zu beobachten, während das 3-Deoxycatechin Luteoliflavan am 14. Tag eine niedrigere Konzentration als am dritten Tag aufwies.

Am deutlichsten ausgeprägt war die Erhöhung des Eriodictyol 7-glukosid-Gehaltes in den mit 250ppm Prohexadion-Ca behandelten Pflanzen im ersten Blatt von 0,18mg/g TS (dritten Tag) auf 0,48mg/g TS (14. Tag) und im dritten Blatt von 0,13mg/g TS (dritten Tag) auf

0,24mg/g TS. In der Variante Pro-Ca 125ppm stieg der Gehalt in allen drei Blättern (bis zu 0,2mg/g TS) nennenswert an.

Insgesamt lag der Gehalt an Luteoliflavan mit maximal 2,9mg/g TS deutlich über den Eriodictyol 7-glukosid-Gehalten. Die größte Differenz der Luteoliflavan-Konzentrationen zwischen dem dritten und dem 14. Tag zeigte sich bei der Variante Pro-Ca 250ppm mit 2,5mg/g TS im zweiten Blatt und bei der Variante Pro-Ca 125ppm mit 0,7mg/g TS im ersten Blatt.

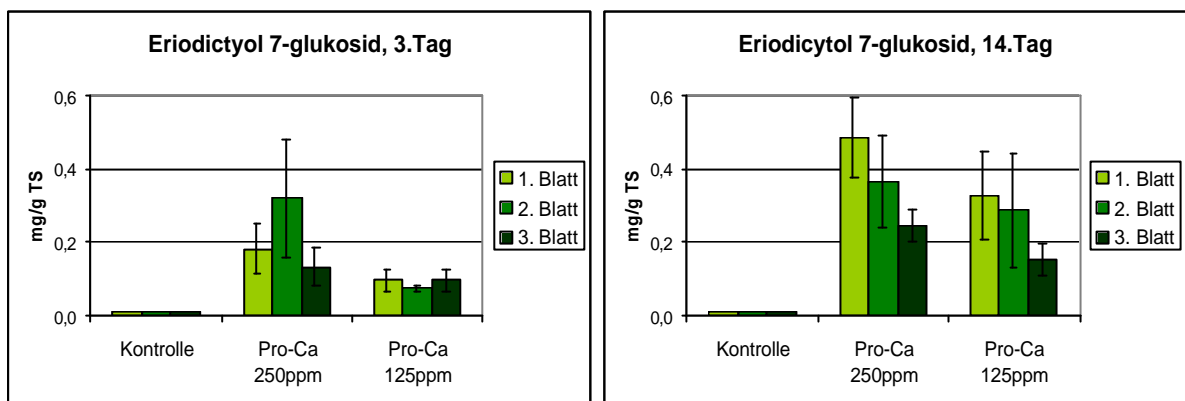


Abb. 45: Gehalte von Eriodictyol 7-glukosid 3 Tage und 14 Tage nach Behandlung mit Wasser (Kontrolle) und Prohexadion-Ca (250ppm und 125ppm) in Abhängigkeit vom Blattalter (Mittelwerte der 6 Wiederholungen mit Standardabweichung) [Pro-Ca = Prohexadion-Ca]

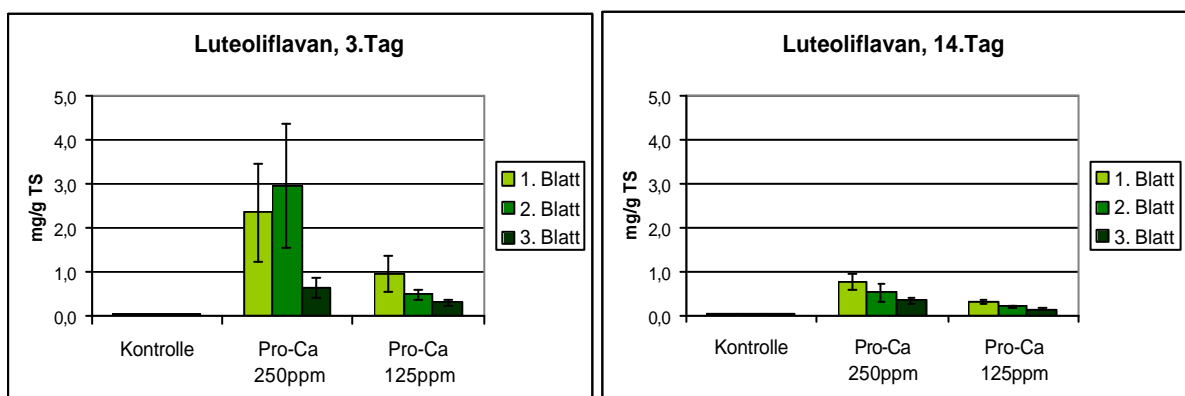


Abb. 46: Gehalte von Luteoliflavan 3 Tage und 14 Tage nach Behandlung mit Wasser (Kontrolle) und Prohexadion-Ca (250ppm und 125ppm) in Abhängigkeit vom Blattalter (Mittelwerte der 6 Wiederholungen mit Standardabweichung) [Pro-Ca = Prohexadion-Ca]

3.2.3.2 Sortenbedingte Unterschiede in der Akkumulation von Phenylpropanoiden auf eine Prohexadion-Ca-Behandlung

Bereits in Kap. 3.2.1.2 wurden die unterschiedlichen Reaktionen in der Flavonoidbiosynthese der drei Genotypen 'Abate Fetel', 'Pyrodwarf' und 'Harrow Sweet' nach einer Inokulation mit dem Feuerbranderreger *Erwinia amylovora* beschrieben. Auch in diesem Kapitel wurde die Akkumulation phenolischer Inhaltsstoffe unter Beachtung der genotypischen Unterschiede untersucht, diesmal jedoch im Hinblick auf die Reaktionen auf eine Behandlung mit dem Bioregulator Prohexadion-Ca. Zwei Versuche, welche in verschiedenen Anbausystemen stattfanden, wurden zu dieser Fragestellung durchgeführt.

Für den in den Abbildungen 47 bis 49 dargestellten Versuch wurden jeweils vier Pflanzen der Genotypen 'Abate Fetel', 'Pyrodwarf' und 'Harrow Sweet' mit Prohexadion-Ca (250ppm) besprüht. Die jüngsten Blätter wurden vor der Behandlung markiert und drei Tage später für die HPLC-Analysen entnommen. Die absoluten Gehalte der Flavonoide sind die Mittelwerte der vier Pflanzen pro Genotyp.

In den Phenolmustern der drei Genotypen zeigten sich ausschließlich quantitative Unterschiede. Diese zum Teil erheblichen Differenzen sind beim Vergleich der absoluten Gehalte der einzelnen Phenolklassen deutlich zu erkennen. Der höchste Gehalt der Hydrochinon-Glukoside wurde in der Birnenunterlage 'Pyrodwarf' mit 103mg/g TS erfasst, wohingegen die Summe aller Hydroxyzimtsäuren in der Sorte 'Harrow Sweet' mit 104,9mg/g TS am höchsten war. Verglichen mit den beiden anderen Genotypen wies die Sorte 'Abate Fetel' sowohl in den Flavonolglykosiden mit 32,9mg/g TS als auch in den Flavanolen mit 28,6mg/g TS die höchsten absoluten Gehalte auf. Auch bei der Aufteilung der Flavanole in ihre monomeren (Catechin und Epicatechin), oligomeren (B1, B2, C1, B5, E-B5) und neu induzierten (Luteoliflavan und bisher nicht identifizierter Flavanole) Verbindungen, hebt sich 'Abate Fetel' mit ihren hohen Gehalten stark von den beiden anderen Genotypen ab.

Bei Betrachtung der relativen Gehalte der einzelnen Klassen, sind ebenfalls große genotypische Unterschiede erkennbar. So ist der relative Anteil der Hydrochinon-Glukoside mit 61% am Gesamtphenolgehalt in 'Pyrodwarf' gegenüber den Genotypen 'Abate Fetel' (42%) und 'Harrow Sweet' (37%) wiederum am höchsten. Der Anteil der oligomeren Procyanidine ist interessanterweise, trotz der großen Differenz des absoluten Gehaltes dieser Substanzen, in den Genotypen 'Abate Fetel' und 'Pyrodwarf' mit 24% gleich. Eine weitere

Diskrepanz ist zwischen den absoluten und den relativen Gehalten bei den Sorten `Harrow Sweet` und `Abate Fetel` auffallend. Zwar ist der absolute Gehalt der neu induzierten Flavanole in `Abate Fetel` um fast das Doppelte höher als in `Harrow Sweet` (15,9mg/g TS; 8,9mg/g TS), der prozentuale Anteil dieser Substanzen am Gesamtflavanolgehalt ist dagegen mit 71% in `Harrow Sweet` deutlich höher.

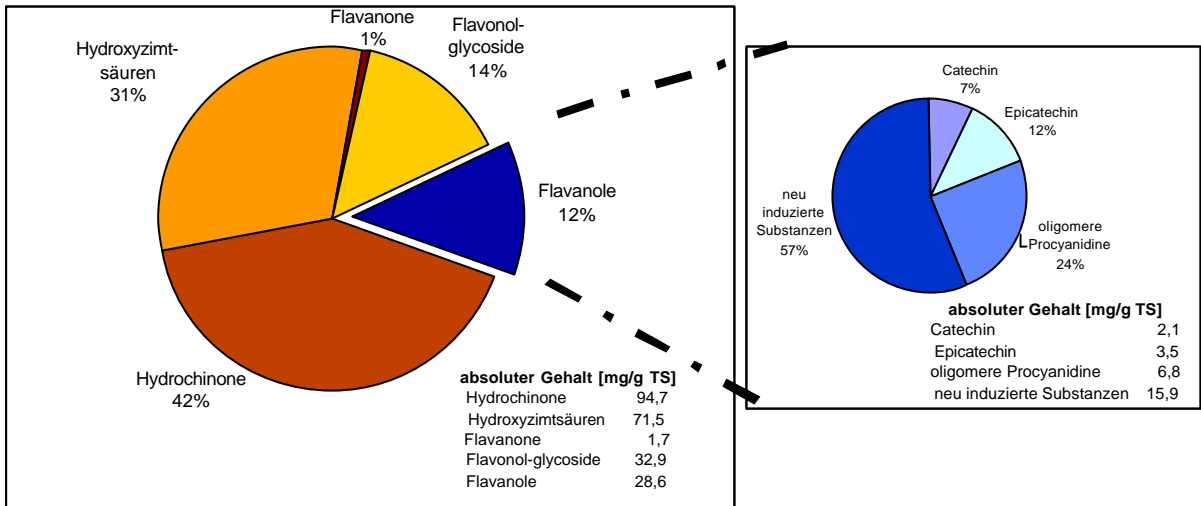


Abb. 47: Relative und absolute Gehalte der Phenolklassen und der einzelnen Flavanolgruppen von `Abate Fetel`

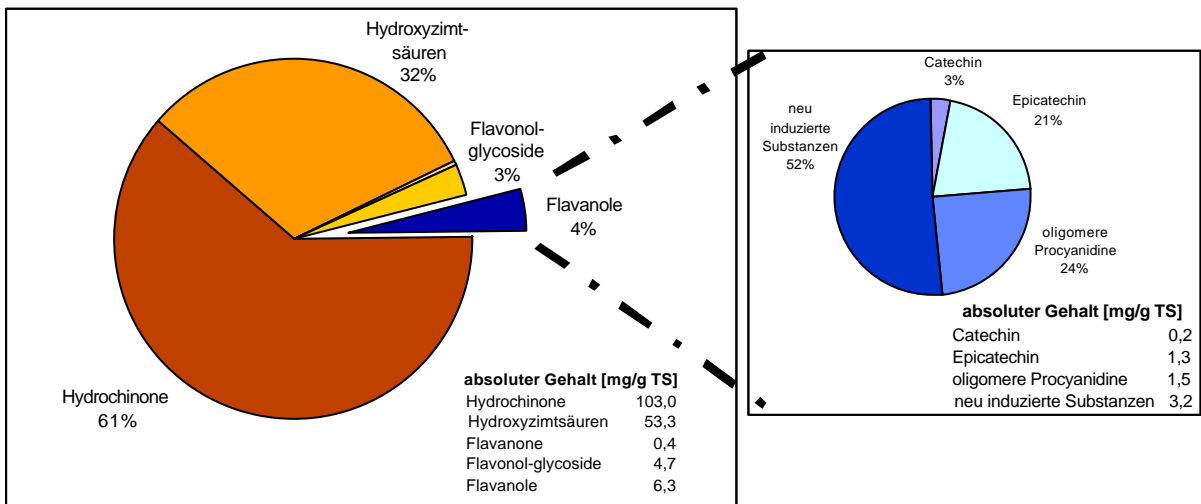


Abb. 48: Relative und absolute Gehalte der Phenolklassen und der einzelnen Flavanolgruppen von `Pyrodwarf`

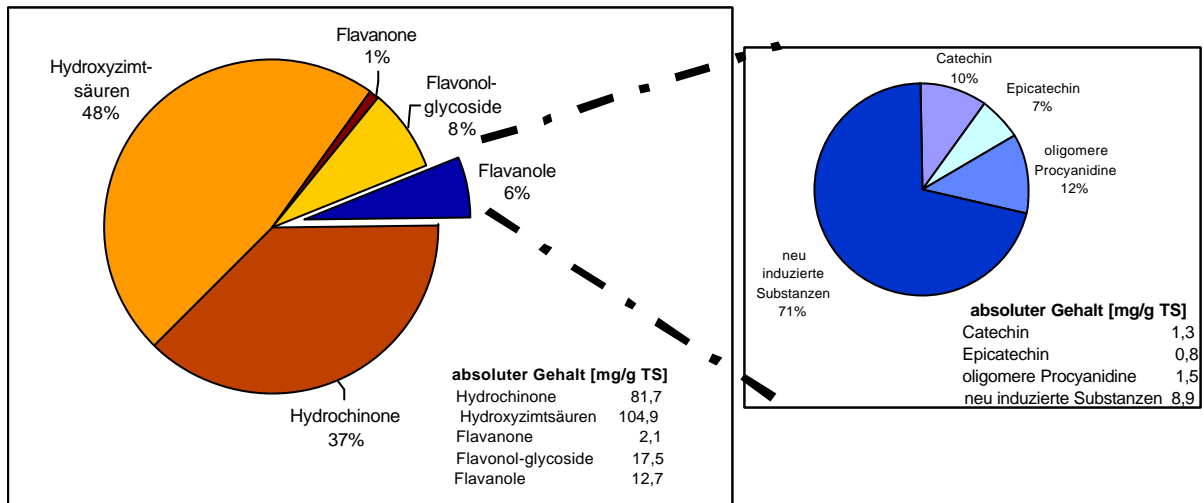


Abb. 49: Relative und absolute Gehalte der Phenolklassen und der einzelnen Flavanolgruppen von 'Harrow Sweet'

Der zweite Versuch über den Einfluss von Sorten wurde ebenfalls mit Pflanzen der Genotypen 'Abate Fetel', 'Pyrodwarf' und 'Harrow Sweet' durchgeführt, allerdings fand dieser Versuch nicht im Gewächshaus, sondern im Gewebelabor mit unbewurzelten Sprossspitzenkulturen statt. Pro Genotyp standen jeweils drei Gläser mit fünf Pflanzen zur Verfügung. Das vierte Blatt jeder Pflanze wurde markiert und anschließend wurden die Pflanzen mit sterilfiltriertem Prohexadion-Ca (100ppm) besprüht. Vier, sieben und zwölf Tage nach der Behandlung wurden die Pflanzen aus den Gläsern entnommen und das Frischgewicht, die Blattanzahl, die Seitensprossanzahl und die Sprosslänge bestimmt. Für die HPLC-Analysen wurden die fünf Pflanzen (bzw. jeweils die drei über dem markierten Blatt gewachsenen Blätter) jedes Glases zu einer Mischprobe zusammengefaßt.

Um die Auswirkungen einer Prohexadion-Ca-Behandlung zu untersuchen, konnte in diesem Versuchssystem neben den Analysewerten der phenolischen Inhaltsstoffe, das Pflanzenwachstum erfasst werden.

In den vier Messgrößen wurden im Vergleich der einzelnen Probenahmeterminen zueinander keine wesentlichen Differenzen zwischen Kontroll- und Prohexadion-Ca-Pflanzen der jeweiligen Genotypen gemessen. Über den gesamten Versuchszeitraum ergab sich jedoch ein leichter Anstieg dieser Messwerte. Während im Frischgewicht keine sortenbedingten

Unterschiede zu erkennen waren, reagierte `Pyrodwarf` im Gegensatz zu den beiden anderen Genotypen mit einer Zunahme der Sproßlänge (Abb. 50). Insgesamt zeigten sich in diesem Versuch jedoch kaum Auswirkungen auf das Pflanzenwachstum durch die Behandlung mit Prohexadion-Ca.

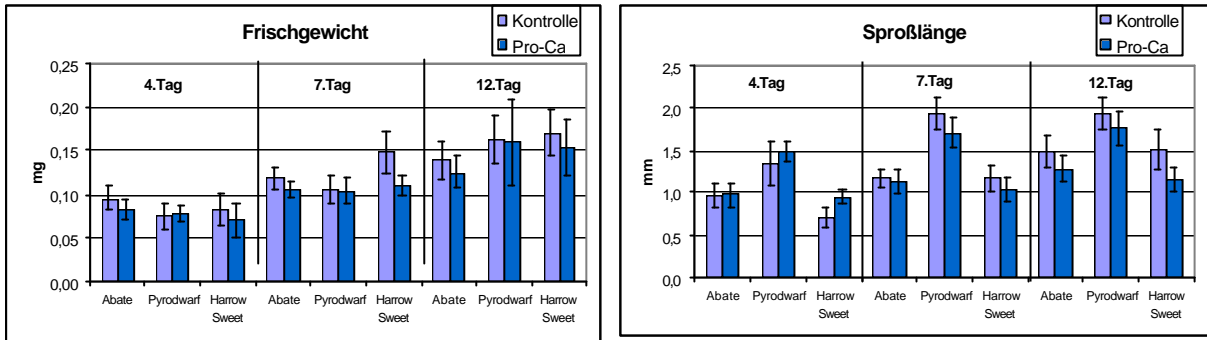


Abb. 50: Frischgewicht und Sproßlänge verschiedener Genotypen mit und ohne Prohexadion-Ca-Behandlung (Mittelwerte der 5 Wiederholungen mit Standardabweichung) [Pro-Ca = Prohexadion-Ca]

Beim Vergleich des Gesamtphenolgehaltes an den einzelnen Probenahmeterminen zeigte sich zwischen den Kontroll- zu den Prohexadion-Ca-Blättern bei allen drei Genotypen kein Unterschied (Abb. 51). Die höchsten Gehalte wurden in beiden Varianten und an jedem Termin in der Birnensorte `Harrow Sweet` gefunden. Der niedrigste Wert aller Phenole wurde am vierten Tag in den Prohexadion-Ca-Blättern und am zwölften Tag in den Kontrollblättern der Sorte `Abate Fetel` gemessen. Ein völlig anderes Verhalten zeichnete sich dagegen bei der *p*-Cumarsäure und dem Flavonolglykosid Rutin ab. So lag der Gehalt an *p*-Cumarsäure in beiden Varianten an allen drei Terminen in der Sorte `Pyrodwarf` am höchsten vor. Interessanterweise nimmt der Gehalt dieser Substanz in `Pyrodwarf` über den Versuchszeitraum ab, wohingegen die Gehalte in `Abate Fetel` gleich bleiben und in `Harrow Sweet` sogar leicht ansteigen. Eine Wirkung der Prohexadion-Ca-Behandlung ließ sich nur in der Sorte `Abate Fetel` mit einem erhöhten *p*-Cumarsäure-Gehalt am vierten und siebten Tag feststellen.

Auffällig war die große Reduzierung des Rutingehaltes um knapp die Hälfte nach der Behandlung mit Prohexadion-Ca am zwölften Tag in der Sorte `Pyrodwarf`.

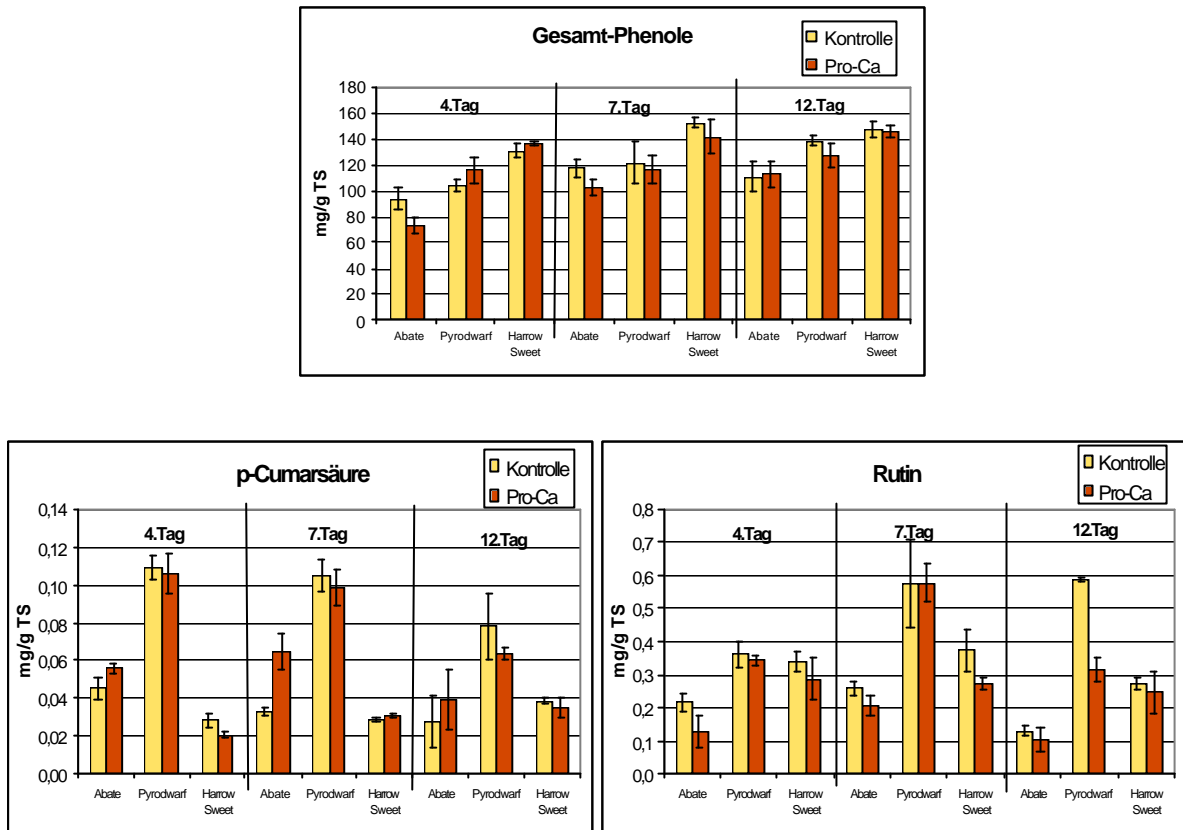


Abb. 51: Gesamtphenol-, p-Cumarsäure- und Flavonolglykosidgehalte verschiedener Genotypen mit und ohne Prohexadion-Ca-Behandlung (Mittelwerte der 5 Wiederholungen mit Standardabweichung) [Pro-Ca = Prohexadion-Ca]

Verhältnismäßig deutlich war die Reaktion aller drei Genotypen auf die Prohexadion-Ca-Behandlung in den Gehalten der Flavane (Abb. 52). Zum Teil erhöhten sich die Gehalte um fast das Doppelte. Die höchsten Gehalte wurden dabei in den Genotypen 'Pyrodwarf' und 'Harrow Sweet' festgestellt. Ein ähnlich sortentypisches Verhalten zeigte sich in dem monomeren Flavanol Epicatechin sowie in dem formal aus zwei Epicatechin-Einheiten aufgebauten Procyanidin B2. Demgegenüber wurden, wie bei *p*-Cumarsäure, die höchsten Catechingehalte in 'Pyrodwarf' nachgewiesen. Desgleichen zeigten sich in dieser Sorte die größten quantitativen Zunahmen der Catechine in den behandelten Blättern gegenüber den unbehandelten. Eine ebenso deutliche Erhöhung der Gehalte nach der Prohexadion-Ca-Behandlung fand bei dem dimeren Flavanol B1 in dieser Sorte statt.

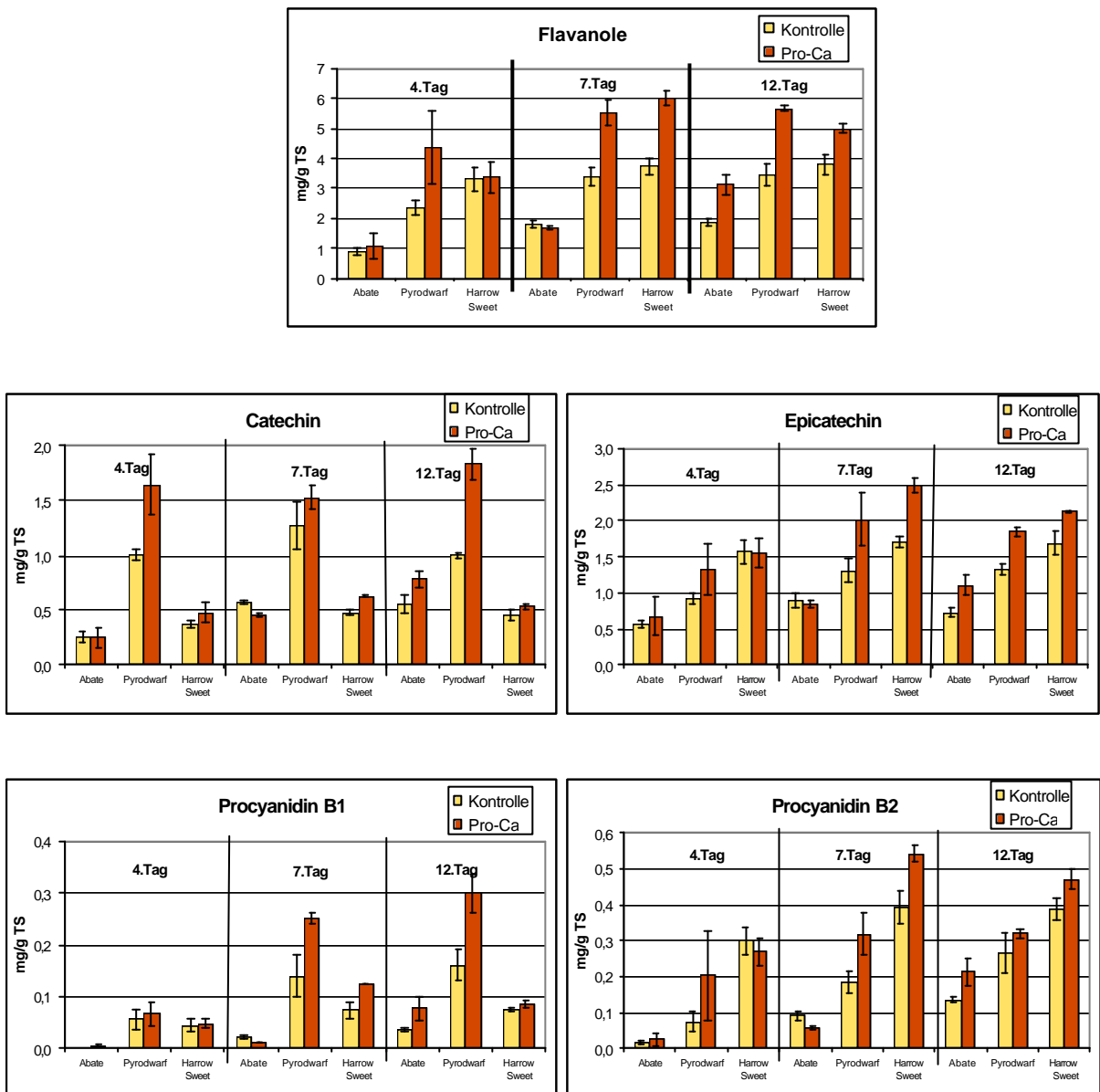


Abb. 52: Gesamtflavanol-, Catechin-, Epicatechin-, Procyanidin B1 und B2-Gehalte verschiedener Genotypen mit und ohne Prohexadion-Ca-Behandlung (Mittelwerte der 5 Wiederholungen mit Standardabweichung) [Pro-Ca = Prohexadion-Ca]

Die nur nach einer Behandlung mit Prohexadion-Ca nachgewiesenen phenolischen Verbindungen Eriodictyol 7-glukosid und Luteoliflavan, konnten in diesem Versuchssystem ebenfalls detektiert werden (Abb. 53). Die Gehalte beider Substanzen lagen allerdings mit Werten um die 0,3mg/g TS weit unter den Gehalten von behandelten Gewächshauspflanzen. Die höchsten Gehalte des Flavanons Eriodictyol 7-glukosid traten in den Genotypen

‘Pyrodwarf’ und ‘Harrow Sweet’ auf. Dabei lagen diese Gehalte zum Teil um das fünffache über den in der ‘Abate Fetel’ gemessenen Werten. In allen drei Genotypen zeigten sich keine wesentlichen Veränderungen im Eriodictyol 7-glukosid-Gehalt vom vierten zum zwölften Probetermin. Ganz anders dagegen verlief die Reaktion von dem 3-Deoxycatechin Luteoliflavan. Hier wurde der höchste Luteoliflavan-Gehalt in ‘Pyrodwarf’ bereits am vierten Tag festgestellt. In ‘Abate Fetel’ und ‘Harrow Sweet’ stieg der Gehalt dieser Verbindung im Verhältnis dazu vom vierten bis zum zwölften Tag an. Diese Steigerung des Luteoliflavan-Gehaltes war dabei am deutlichsten in der Sorte ‘Abate Fetel’ ausgeprägt.

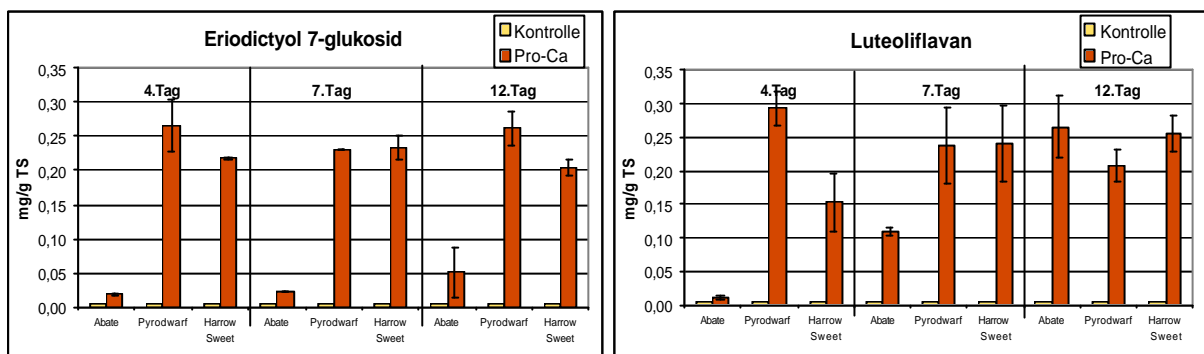


Abb. 53: Gehalt der neu induzierten Substanzen Eriodictyol 7-glukosid und Luteoliflavan verschiedener Genotypen nach einer Prohexadion-Ca-Behandlung (Mittelwerte der 5 Wiederholungen mit Standardabweichung) [Pro-Ca = Prohexadion-Ca]

3.2.3.3 Auswirkungen einer Feuerbrandinokulation auf die Phenylpropanoide nach einer Prohexadion-Ca-Behandlung

Zwei bzw. sieben Tage vor der Inokulation des ersten und zweiten Blattes mit dem Feuerbranderreger wurden Pflanzen der Birnenunterlage ‘Pyrodwarf’ mit Prohexadion-Ca (Konzentration 250ppm) behandelt (= 2Tv Pro-Ca mit Inok bzw. 7Tv Pro-Ca mit Inok). Zusätzlich zu diesen Varianten wurden Blätter von Pflanzen analysiert, welche mit Wasser besprüht und zwei Tage später mit dem Erreger inokuliert wurden (= nur Inok) und Blätter, welche zwei Tage vor dem Anschneiden der Blattspitzen (siehe Kap. 2.3) mit Wasser (= Kontrolle) oder Prohexadion-Ca (250ppm) (= 2Tv Pro-Ca ohne Inok) behandelt worden waren. Einen Tag nach der Inokulation bzw. nach dem Anschneiden der Blätter fand die

Probenahme statt. Zu diesem frühen Zeitpunkt waren keine Feuerbrandsymptome zu erkennen.

Die Einflussnahme des Blattalters auf die Gehalte der Flavonoide wurde auch in diesem Versuch mit einer Abnahme der Gehalte von den ersten auf die zweiten Blätter festgestellt (Abb. 54 bis 56).

In der Summe der Phenole und in den Hydroxyzimtsäuren lagen die Gehalte der inokulierten Prohexadion-Ca-behandelten Blätter über den ohne Vorbehandlung inokulierten Blättern (Abb. 54). Durch die Prohexadion-Ca-Behandlung kam es in diesem Experiment zu einer Stimulierung der Phenolbiosynthese wie der Vergleich zwischen den Gesamt-Phenolen und den Hydroxyzimtsäuren der Kontroll- mit den Prohexadion-Ca-behandelten Blättern zeigt. Nur in den zweiten Blättern wurde ein Unterschied zwischen dem Zeitpunkt der Vorbehandlung und der Inokulation in dem höheren Gehalt an Hydroxyzimtsäuren der Variante „7Tv Pro-Ca mit Inok“ beobachtet. Überraschenderweise wurden deutlich höhere Gehalte an Flavonolglykosiden in den zweiten Blättern der mit Prohexadion-Ca-behandelten Pflanzen als in den Kontrollpflanzen ermittelt. Aufgrund der Ergebnisse aus vorangegangenen Versuchen war diese Steigerung der Flavonolglykoside durch eine Prohexadion-Ca-Behandlung nicht zu erwarten gewesen. Abweichend zu der Erhöhung der Gehalte im zweiten Blatt, zeigten sich zwischen den Varianten Kontrolle, nur Inokulation und den 2Tv Pro-Ca im ersten Blatt keine Unterschiede in den Flavonolglykosidgehalten. Im Gegensatz dazu fand im ersten Blatt der sieben Tage vorher mit Prohexadion-Ca-behandelten Pflanzen eine Reduzierung des Gehaltes gegenüber den anderen Varianten statt.

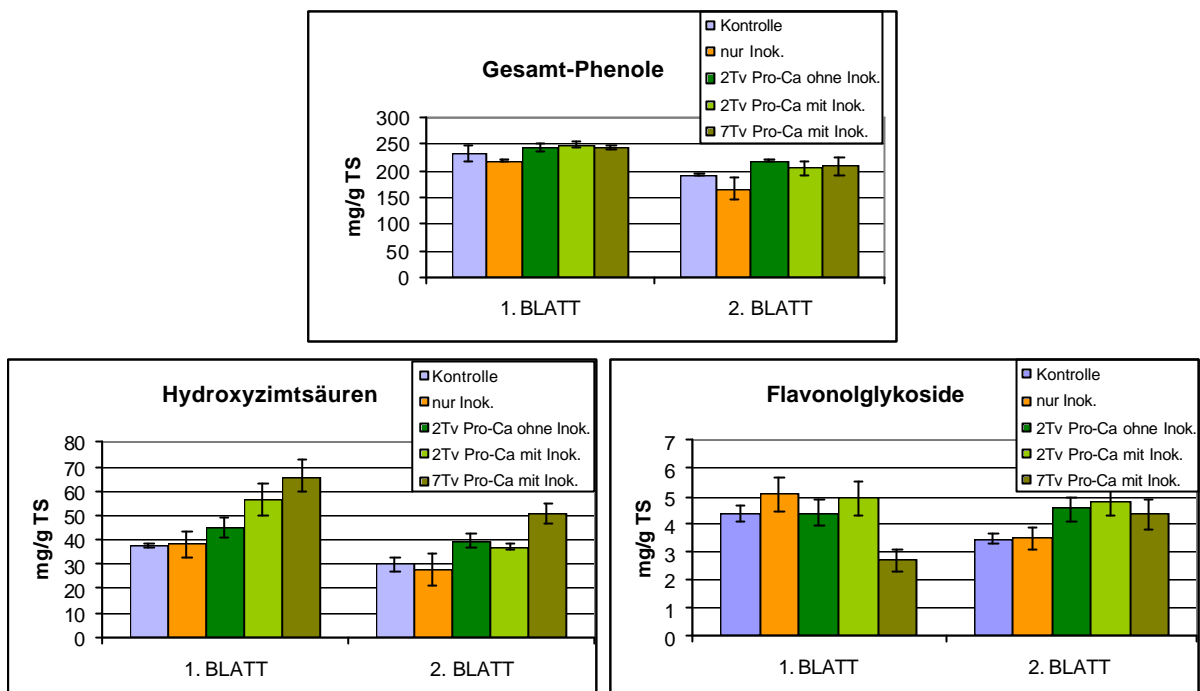


Abb. 54: Gehalte der Gesamt-Phenole, der Hydroxyzimtsäuren und der Flavonolglykoside in inokulierten und nicht-inokulierten, mit und ohne Prohexadion-Ca vorbehandelten Blättern in Abhängigkeit des Blattalters (Mittelwerte der 3 Wiederholungen mit Standardabweichung) [Tv = Tage vorher behandelt; Inok = Inokulation; Pro-Ca = Prohexadion-Ca]

Unabhängig ob mit oder ohne Inokulation und wieviele Tage vor der Inokulation mit Prohexadion-Ca behandelt wurde, in beiden Blattetagen steigerte eine Prohexadion-Ca-Behandlung die Flavanolgehalte (Abb. 55). Verglichen mit den Flavanolgehalten in den zwei Tage vorher mit Prohexadion-Ca behandelten nicht-inokulierten Blättern waren die Gehalte in den inokulierten Blättern deutlich geringer. Auffallend groß war die Differenz der Gehalte zwischen den zwei zu den sieben Tagen zuvor behandelten Blättern (im ersten Blatt ca. vierfach höhere Gehalte in 7Tv Pro-Ca). Im ersten Blatt zeigte sich zwischen den zwei Tage vorher mit Prohexadion-Ca-behandelten Pflanzen kein unterschiedlicher Catechingehalt. Der Gehalt an Epicatechin lag insgesamt in allen Varianten höher als der von Catechin. Die Unterschiede zwischen den beiden Blattetagen sowie zwischen den Varianten in den Flavanolgehalten wurden in gleicher Weise bei den Epicatechingehalten gefunden.

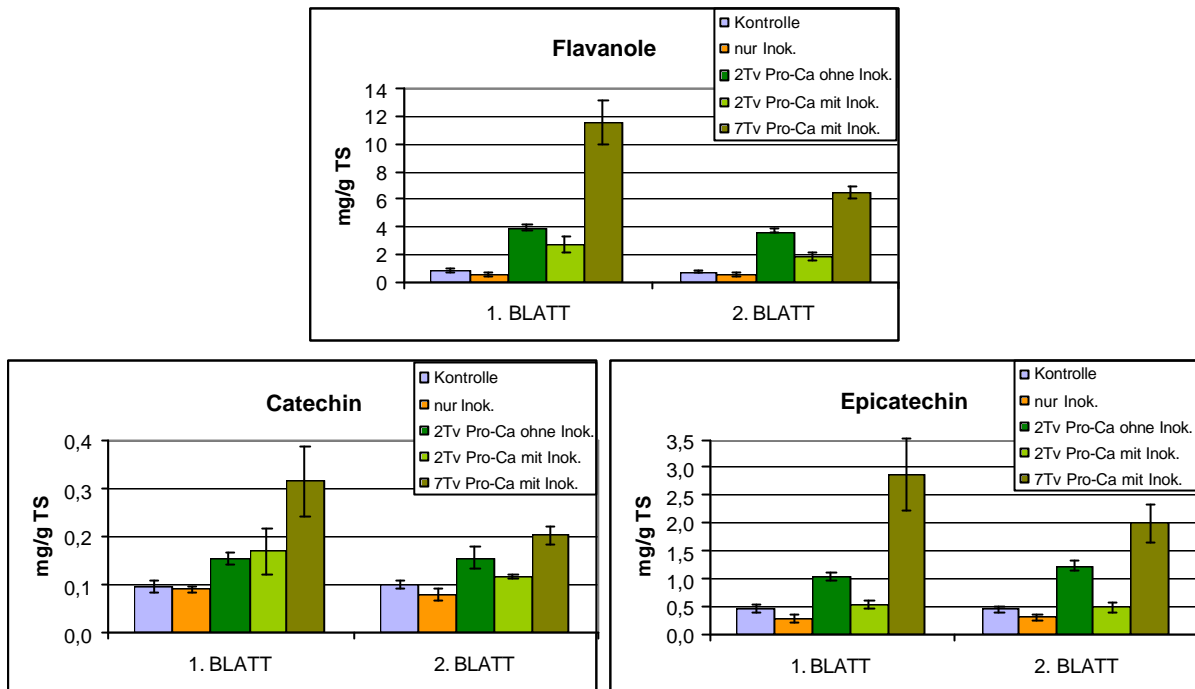


Abb. 55: Gehalte von Flavanolon, Catechin und Epicatechin in inokulierten und nicht-inokulierten, mit und ohne Prohexadion-Ca vorbehandelten Blättern in Abhängigkeit des Blattalters (Mittelwerte der 3 Wiederholungen mit Standardabweichung) [Tv = Tage vorher behandelt; Inok = Inokulation; Pro-Ca = Prohexadion-Ca]

Mit oder ohne Inokulation, in allen mit Prohexadion-Ca behandelten Blättern wurden die neu gebildeten Flavonoide detektiert (Abb. 56). Erstaunlicherweise wurden in den neu induzierten Flavanolon und dem Eriodicytol 7-glukosid ähnliche Reaktionen und demgegenüber abweichende Reaktionen bei Luteoliflavan vorgefunden. So waren die Luteoliflavangehalte im ersten Blatt in den zwei Tage vorher behandelten, inokulierten Pflanzen zwar niedriger als in den nicht-inokulierten Pflanzen, im zweiten Blatt waren jedoch keine Unterschiede zwischen den Varianten zu erkennen. Sowohl der Gehalt der neu induzierten Flavanolon wie auch der Gehalt von Eriodicytol 7-glukosid lag in den sieben Tage vorher behandelten inokulierten Blättern deutlich über den Gehalten der nur zwei Tage vor der Inokulation behandelten Blättern. In den ersten Blättern wiesen die früher behandelte Variante sogar den fünffach höheren Gehalt auf. In beiden Blättern dieser Variante lag der Gehalt der neu induzierten Flavanolon außerdem über dem Gehalt des ebenfalls induzierten Luteoliflavans. Im Vergleich der Varianten '2Tv Pro-Ca' zeigte sich aufgrund der Inokulation in allen neu gebildeten Flavonoiden ein reduzierter Gehalt.

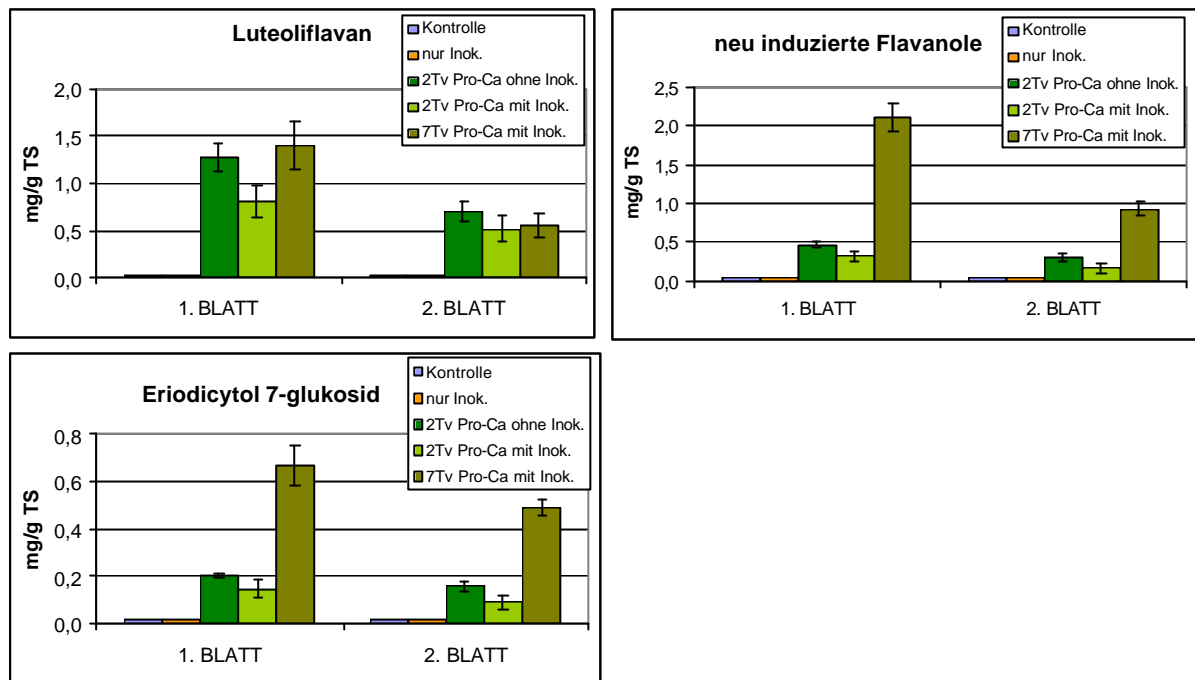


Abb. 56: Gehalte der neu induzierten Flavonoide in inokulierten und nicht-inokulierten, mit und ohne Prohexadion-Ca vorbehandelten Blättern in Abhängigkeit des Blattalters (Mittelwerte der 3 Wiederholungen mit Standardabweichung) [Tv = Tage vorher behandelt; Inok = Inokulation; Pro-Ca = Prohexadion-Ca]

3.2.3.4 Diskussion

Modifikationen in den Gehalten der Phenylpropanoide, wie sie schon in den vorangegangenen Kapiteln zu beobachten waren, ergaben sich in den mit Prohexadion-Ca behandelten Pflanzen in allen in diesem Kapitel angeführten Versuchen. Gleichzeitig sind dabei die Effekte von unterschiedlichen Einflussfaktoren sowohl in den behandelten als auch in den unbehandelten Pflanzen erkennbar. Einige der Parameter wie Pflanzenart, Sorte, Baumalter, Fruchtansatz, Wasser- und Nährstoffversorgung, welche bei der Dosierung und dem Anwendungspunkt von Regalis[®] für eine wirksame Wachstumshemmung berücksichtigt werden sollen (RADEMACHER und KOBER 2003), haben demnach ebenso einen Einfluss auf die Induktionswirkung im Phenolstoffwechsel.

Die Beobachtung, dass generell in den jüngsten Blättern die höchsten Konzentrationen an phenolischen Inhaltsstoffen vorliegen, bestätigt die Ergebnisse aus Untersuchungen an Äpfeln (MICHALEK 1997; RÖMMELT 2002; LATTANZIO et al. 2002). Die Abnahme der Hydroxyzimtsäure- und Flavonolglykosid-Gehalte in allen drei Blattetagen vom ersten zum

zweiten Probenahmetermin im ersten Versuch, beruht vermutlich auf physiologischen Entwicklungsprozessen, bei denen z.B. durch Polymerisierung der löslichen Phenole unlösliche, hochmolekulare Phenole entstehen (BARZ und KÖSTER 1981). Eine weitere Erklärung der Gehaltsabnahme der Hydroxyzimtsäuren ist, dass diese Phenolklassen in der Biosynthese relativ „früh“ gebildet werden und zu Verbindungen wie beispielsweise den Flavanolen metabolisiert werden können (HASLAM 1989; MAYR 1995). Die Bestätigung dieser Erklärung zeigt sich in dem Ergebnis der späten Gehaltszunahme der Flavanole am letzten Probenahmetermin.

Im Vergleich zur Kontrolle lässt sich bei den mit Prohexadion-Ca behandelten Blättern außer der Induktion der Verbindungen Eriodictyol 7-glukosid und Luteoliflavan, eine Abnahme der Flavonolglykoside und eine Zunahme der Flavanole in allen drei Blattstadien erkennen. Die beiden neu induzierten Substanzen Eriodictyol 7-glukosid und Luteoliflavan wurden in allen drei Stadien der behandelten Blätter nachgewiesen, wobei die höchsten Konzentrationen in den jüngeren Blättern vorlagen. Vom ersten zum zweiten Probenahmetermin hin, reduzierte sich der Luteoliflavangehalt sehr stark, wohingegen sich der Gehalt an Eriodictyol 7-glukosid vor allem in den jüngeren Blättern zum zweiten Termin hin erhöhte. In allen drei Blattetagen sowie an beiden Terminen lag die Luteoliflavankonzentration deutlich über der Konzentration von Eriodictyol 7-glukosid.

Dass sich die Genotypen `Abate Fetel`, `Pyrodwarf` und `Harrow Sweet` bezüglich ihrer Gehalte in den einzelnen Phenolklassen unterscheiden, wurde bereits in Kap. 3.2.1 nachgewiesen. Alle drei mit Prohexadion-Ca behandelten Genotypen reagierten sowohl mit Veränderungen in den Konzentrationen der konstitutiven phenolischen Inhaltsstoffe als auch mit der Bildung von Flavanonen und neu induzierten Flavanolen. Viele Ergebnisse aus dem „Gewächshaus“-Versuch wie beispielsweise: die höchsten Gehalte der Hydrochinonglukoside in `Pyrodwarf`, die höchsten Gehalte der Hydroxyzimtsäuren in `Harrow Sweet` und die höchsten Gehalte der Flavonolglykoside und Flavanole in `Abate Fetel` gleichen den Ergebnissen aus den Untersuchungen von Kap. 3.2.1.

Im Hinblick auf die Wirkung von Prohexadion-Ca sind daher vor allem die Reaktionsunterschiede innerhalb der Genotypen bei der Phenolklasse der Flavanone und der neu induzierten Flavanole interessant. Bei den Flavanonen war der relative Gehalt bei `Abate Fetel` und `Harrow Sweet` mit 1% gleich hoch, der absolute Gehalt lag dagegen in `Harrow Sweet` etwas über dem von `Abate Fetel`. Der höchste relative wie absolute Gehalt der Flavanole wurde in der Sorte `Abate Fetel` nachgewiesen. Betrachtet man jedoch die

prozentualen Anteile der einzelnen Gruppen der Flavanole, so enthält 'Pyrodwarf' die höchsten relativen Gehalte an Epicatechin und oligomeren Procyanidinen und 'Harrow Sweet' die höchsten relativen Gehalte an Catechin und den neu induzierten (bei 640nm detektierten) Substanzen. Insgesamt gesehen reagiert die Birnensorte 'Harrow Sweet' auf die Prohexadion-Ca-Behandlung zwar mit einer Zunahme der relativen Gehalte der neu induzierten Verbindungen, die höchsten Konzentrationen dieser Substanzen wurden dagegen in diesem Versuch in der Sorte 'Abate Fetel' nachgewiesen.

Ein Grund für die Durchführung eines *in-vitro*-Versuches war, die Wirkung einer Prohexadion-Ca-Behandlung auf verschiedene Birnengenotypen ohne Einfluß von unterschiedlichem Pflanzenalter und unterschiedlicher Nährstoff- und Lichtversorgung zu untersuchen. Beim Vergleich der ohne und mit Prohexadion-Ca behandelten Birnenpflanzen konnte zwar kein Effekt auf das Pflanzenwachstum festgestellt werden, ein Nachweis der Substanzen Luteoliflavan und Eriodicytol 7-glukosid war jedoch möglich. BUBÁN et al. (2002 und 2003) berichten aus ihren Versuchen mit Birnenpflanzen, dass eine Behandlung mit Prohexadion-Ca nicht immer eine Wachstumshemmung zur Folge hatte, diese fehlende Wirkung auf das Pflanzenwachstum jedoch nicht mit einer Reduzierung eines Feuerbrandbefalls korrelierte.

Geringe Auswirkungen der Prohexadion-Ca-Behandlung zeigten sich in allen drei Genotypen bei den Konzentrationen in der Summe der Gesamtphenole, bei der *p*-Cumarsäure (= Verbindung aus der Klasse der Hydroxyzimtsäuren) und bei Rutin (= Verbindung aus der Klasse der Flavonole). Im Gegensatz dazu fielen die Reaktionen in den Gehalten der Flavanole viel deutlicher aus. Bereits vier Tage nach der Behandlung erhöhte sich die Summe aller Flavanole in 'Pyrodwarf'. Am siebten Tag wurden dann auch in 'Harrow Sweet' Unterschiede zwischen den behandelten und unbehandelten Blättern festgestellt und zwölf Tage nach der Behandlung zeigten sich letztendlich auch Differenzen in Blättern der Sorte 'Abate Fetel'. Ähnlich schnell reagierte der Genotyp 'Pyrodwarf' auf Prohexadion-Ca mit der Synthese der Substanzen Eriodicytol 7-glukosid und Luteoliflavan. Bereits vier Tage nach der Behandlung wurden in diesem Genotyp die höchsten Gehalte dieser beiden Verbindungen nachgewiesen, allerdings nahmen die Gehalte am zweiten und dritten Probenahmetermin schon wieder ab. Auch in der Sorte 'Harrow Sweet' war der Gehalt an Eriodicytol 7-glukosid und Luteoliflavan am vierten Tag bereits relativ hoch und erhöhte sich zudem im weiteren Versuchszeitraum. Die langsamste Induktion von Eriodicytol 7-glukosid und Luteoliflavan wurde in den Blättern der Sorte 'Abate Fetel' festgestellt. Eine rasche Abwehrreaktion auf

einen Pathogenbefall wird häufig im Zusammenhang mit der Anfälligkeit einer Pflanze beurteilt (HARBORNE 1982). Die geringe Reaktionsgeschwindigkeit der Birnensorte 'Abate Fetel' auf einen Einflussfaktor wie z.B. Prohexadion-Ca, könnte somit ein Grund für die hohe Feuerbrandanfälligkeit dieser Sorte sein.

Insgesamt betrachtet, waren die Gehalte der Phenylpropanoide in den *in-vitro*-Pflanzen zwar niedriger als in Gewächshauspflanzen, die Entwicklung der Gehalte über den Versuchszeitraum sowie die Unterschiede zwischen den Genotypen waren dennoch gut zu erkennen. Dieses Versuchssystem erwies sich zudem bereits für Untersuchungen über den Einfluss von Stickstoff auf den Phenolmetabolismus in mit Prohexadion-Ca behandelten Apfelpflänzchen ebenfalls als geeignet (RÜHMANN und TREUTTER 2003).

Wie schon in Kap. 3.2.1 und 3.2.2.1 gezeigt wurde, kann eine Inokulation mit dem Feuerbranderreger *Erwinia amylovora* zu Veränderungen in den Phenolgehalte führen. Die Erhöhung der Hydroxyzimtsäuren, welche in Untersuchungen mit Prohexadion-Ca behandelten Apfelpflanzen nach einer Feuerbrandinokulation festgestellt werden konnte (RÖMMELT 2002), wurde in dem hier beschriebenen Versuch in den mit Prohexadion-Ca vorbehandelten Birnenblättern ebenfalls beobachtet. In den zweiten Blättern scheint dieser Effekt jedoch eher wegen der Prohexadion-Ca-Behandlung als wegen der Inokulation stattzufinden.

Die Zunahme der Flavonolglykoside in den zweiten, mit Prohexadion-Ca behandelten Blättern war bisher in keinem der mit Birnen durchgeführten Experimenten zu finden und wird daher als Ausreißer dieses Versuches gewertet.

Demgegenüber erhöhten sich die Flavanolgehalte in den behandelten Blättern im Vergleich zu den unbehandelten Blättern wie in allen anderen Versuchen. Zusätzlich konnten in dieser Phenolklasse Unterschiede in der Reaktion der Pflanzen auf die Prohexadion-Ca-Behandlung und die Inokulation in den monomeren Flavanol Catechin und Epicatechin festgestellt werden. So wurden in den behandelten Blättern ohne und mit Inokulation höhere Catechingehalte als in den Kontrollblättern und den nur inokulierten Blättern nachgewiesen. Es fanden sich jedoch keine deutlichen Gehaltsunterschiede zwischen den Varianten '2Tv Pro-Ca'. Anders verhielten sich dagegen die Epicatechingehalte. Hier waren die Gehalte in den behandelten, inokulierten Blättern ähnlich hoch wie die der Kontroll- und nur inokulierten Blätter. Im Vergleich zu den zwei Tage vorher mit Prohexadion-Ca behandelten, nicht-inokulierten Blättern wiesen die inokulierten Blätter allerdings deutlich geringere Epicatechingehalte auf. Diese Differenz zwischen diesen beiden Varianten zeigten sich

ebenfalls bei den nur nach einer Prohexadion-Ca-Behandlung nachzuweisenden Verbindungen. Die Abnahme der neu induzierten Flavonoide aufgrund der Inokulation wurde ebenso in einem Versuch mit Apfelpflanzen nachgewiesen (RÖMMELT 2002).

Als mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Flavonoidgehalte aufgrund der Feuerbrandinokulationen können die durch Inokulation mit *Erwinia amylovora* hervorgerufenen Modifikationen in den Genexpressionen von Apfelpflanzen (VENISSE et al. 2002) betrachtet werden. Diese von VENISSE et al. (2002) beschriebene Repression der Flavonoidgene hätte dann eine Reduzierung der Flavonoidgehalte, wie sie im vorliegenden Versuch bei den Flavanolen und den neu induzierten Substanzen zu beobachten war zur Folge.

Der Grund für die Unterschiede in den Varianten `2Tv Pro-Ca´ und `7Tv Pro-Ca´ wird höchstwahrscheinlich nicht durch den Einsatzzeitpunkt, sondern vielmehr durch die längere Reaktionszeit der Pflanzen auf das Prohexadion-Ca hervorgerufen.

4 Gesamtdiskussion

Die Anzahl der natürlich vorkommenden Pflanzenphenole wird mit ungefähr 8000 und die Zahl der Flavonoide wird mit über 5000 bekannten Strukturen angegeben (HARBORNE 1994). Aufgrund der enormen strukturellen Vielfalt und mit Hilfe von modernen Analysemethoden wird die Anzahl der bekannten Verbindungen sicherlich weiter ansteigen. Abgesehen von der Aufklärung der chemischen Struktur einer phenolischen Verbindung, ist vor allem die Betrachtung der Zusammenhänge zwischen der Genexpression, den Enzymaktivitäten und dem Phenylpropanoidgehalt im Hinblick auf Wirkung und Funktion innerhalb der Pflanzen von Bedeutung.

Da die Phenole an zahlreichen pflanzenphysiologischen Prozessen beteiligt sind, sind sie durch viele unterschiedliche exogene als auch endogene Faktoren beeinflussbar (HARBORNE 1988; FEUCHT und TREUTTER 1989). Einen der exogenen Einflussfaktoren auf den Phenolstoffwechsel stellt der Einsatz von Pflanzenschutz- und Pflanzenstärkungsmitteln dar. Pflanzenschutzmittel weisen zwar oft keine direkte Wirkung gegen das Pathogen auf, jedoch regulieren sie die Pflanzenphysiologie so, dass die behandelten Pflanzen Abwehrstoffe gegen die Pathogene bilden (MICHALEK 1997; RÖMMELT et al. 1999a,b; BRISSET 2000). Interessanterweise können auch die Pathogene selbst zu den exogenen Faktoren, welche den Phenolstoffwechsel von Pflanzen verändern, gezählt werden (TREUTTER und FEUCHT 1990a,b; SIEROTZKI und GESSLER 1993; MAYR et al. 1997; SCUTEREANU et al. 1999, LATTANZIO et al. 2002; VENISSE et al. 2002).

Welche phenolischen Inhaltsstoffe in Birnenblättern vorliegen und mit welchen Regulationen Birnen in ihrer Phenylpropanoidbiosynthese auf Einflußfaktoren wie einer Behandlung mit dem Bioregulator Prohexadion-Ca und/oder einer Inokulation mit *Erwinia amylovora* reagieren, waren Schwerpunkte der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen.

Der Anlass für diese Untersuchungen über die Wechselwirkungen von Birnen, Prohexadion-Ca und Feuerbrand war die Reduzierung des Feuerbrandbefalls an Birnen- und Apfelpflanzen nach einer Behandlung mit Prohexadion-Ca (YODER et al. 1999; COSTA et al. 2001, 2002; ALDWINCKLE et al. 2002; BUBÁN et al. 2002; BAZZI et al. 2003). Die Bekämpfung dieser weltweit gefährlichsten Bakteriose an Rosaceen stellt insbesondere für den wirtschaftlich

stark betroffenen Kernobstanbau eine enorme Problematik dar. Von großem Interesse war daher die Erforschung weshalb und vor allem wie der ursprünglich für den Einsatz als Wachstumsregulator von Obstgehölzen entwickelte Wirkstoff Prohexadion-Ca, welcher keine eigene bakterizide Eigenschaften aufweist (RADEMACHER 2000), eine befallsreduzierende Wirkung gegen *Erwinia amylovora* hervorrufen kann. Die Vermutung, dass bei dieser erhöhten Resistenz Phenylpropanoide eine bedeutende Rolle spielen, bestätigte sich in analytischen Untersuchungen von RÖMMELT et al. (1999b), in welchen neben den Änderungen der konstitutiven Phenolgehalte auch eine Induktion von neuartigen phenolischen Verbindungen in Apfelblättern nachgewiesen werden konnte.

Um die Wirkungen der Einflussfaktoren Prohexadion-Ca und *Erwinia amylovora* auf den Phenolstoffwechsel von Birnenpflanzen beurteilen zu können, war zunächst die Charakterisierung und Identifizierung der vorhandenen phenolischen Inhaltsstoffe Voraussetzung. Mit HPLC-Analysen wurden in den Blättern von Birnen etwa 40 verschiedene phenolische Verbindungen detektiert. 21 dieser Substanzen konnten dabei identifiziert werden und die anderen Peaks waren aufgrund ihrer UV-Spektren bestimmten Phenolklassen zuzuordnen. Die Überlagerung einiger Substanzen bzw. Substanzklassen mit anderen Verbindungen stellen bei der Trennung mit HPLC häufig ein Problem dar (TREUTTER 1991; OLESZEK et al. 1994; ESCARPA und GONZALES 1999). Durch die Verwendung eines HPLC-Systems, das mit einer Nachsäulenderivatisierung mit DMAZA kombiniert wurde, konnten die Flavanole bei der Wellenlänge von 640nm selektiv erfasst werden (TREUTTER 1989). Nach der Reinigung über die Sephadex-Säulenchromatographie war die Identifizierung mehrerer Flavonolglykoside, welche zuvor von sehr spät eluierenden Hydroxyzimtsäuren überlagert waren, ebenso möglich.

Insgesamt konnten an Verbindungen Vertreter der Phenolklassen der Hydrochinone, der Hydroxyzimtsäuren, der Flavanone, der Flavonole, der Flavanole, der Procyanidine und der 3-Deoxyflavonoide in den Birnenblättern nachgewiesen werden.

An Hydroxyzimtsäuren wurde außer der Kaffeesäure, der *p*-Cumarsäure, der Neochlorogensäure und der Chlorogensäure, mehrere *p*-Cumarsäure- sowie Kaffeesäure derivate identifiziert. Eine vergleichbar hohe Konzentration, wie die der Chlorogensäure wies dabei nur ein Kaffeesäurederivat auf. Aus der Klasse der Flavanole konnte in den Birnenblättern das Vorhandensein der monomeren Flavan 3-ole Epicatechin und Catechin und das der Procyanidine B1, B2, C1, B5 und E-B5 bestätigt werden. Die in den Blättern nachgewiesenen Isorhamnetinglykoside Isorhamnetin-glukosid und Isorhamnetin-rutinosid

stellen eine Besonderheit von Birnen dar. Denn im Unterschied zu den ebenso vorhandenen Quercetinglykosiden kommen diese Flavonole nicht in Apfelpflanzen vor (ANDRADE et al. 1988; SCHIEBER et al. 2001). Eine Substanz, welche ebenfalls nicht im Apfel, sondern nur in Birnen vorkommt (DUGGAN 1969; WALD et al. 1989; SPANOS und WROLSTAD 1992; ESCARPA und GONZALES 1999), konnte als das Hydrochinonglukosid Arbutin identifiziert werden.

Erstmalig und nur nach einer Behandlung mit Prohexadion-Ca wurden in den Birnenblättern das 3-Deoxycatechin Luteoliflavan, die Flavanone Eriodictyol 7-glukosid, Naringenin 7-glukosid und zwei Eriodictyolglykoside sowie zusätzliche neu gebildete, bei 640nm detektierte Flavonoide nachgewiesen.

Die Unterschiede zwischen dem analysierten Blattmaterial der in den Untersuchungen verwendeten Genotypen waren in allen Experimenten rein quantitativer Art. Auch beim Vergleich der Phenylpropanoide der Genotypen `Abate Fetel`, `Pyrodwarf` und `Harrow Sweet` vor und nach einer Inokulation mit dem Feuerbranderreger waren ausschließlich Konzentrationsänderungen zu beobachten (Kap. 3.2.1). Neben diesen Konzentrationsunterschieden variierten die Befallsstärken jedoch je nach eingesetztem Bakterienstamm bei den Sorten `Abate Fetel` und `Harrow Sweet`. Nach Angaben von PAULIN et al. (1993) und LESPINASSE et al. (1993) können die Virulenzstärken von Bakterienstämmen voneinander abweichen und abhängig von dieser Virulenzstärke kann der Feuerbrandbefall somit je nach Bakterienstamm und Sorte unterschiedlich ausgeprägt sein (NORELLI et al. 1984, 1986). So zeigte sich abgesehen davon, dass der Krankheitsindex je nach getestetem *Erwinia amylovora*-Stamm verschieden hoch war, außerdem noch ein insgesamt geringerer Krankheitsindex bei allen fünf Stämmen bei der Sorte `Harrow Sweet` im Vergleich zu der Sorte `Abate Fetel`.

Zusätzlich zu diesen sortenbedingten Unterschieden in der Befallsstärke, waren die Reaktionen auf die Feuerbrandinokulation in der Flavonoidbiosynthese bei den untersuchten Genotypen ebenfalls verschieden. Von Differenzen zwischen einem feuerbrandanfälligen und einem resistenten Apfelgenotyp in der Expression der Flavonoidgene berichten VENISSE et al. (2002). So beobachteten sie bei dem feuerbrandanfälligen Genotyp MM106 eine reduzierte Genexpression für die Enzyme CHS, DFR und FLS, wohingegen bei dem resistenten Genotyp `Evereste` keine Reduktionen der Genexpressionen festzustellen waren.

Die Differenzierung in resistente und anfällige Sorten beruht nicht nur auf dem Vorhandensein von bestimmten phenolischen Verbindungen, sondern vielmehr auf den

Reaktionen in der Phenylpropanoidbiosynthese sowie den daraus resultierenden Konzentrationsunterschieden.

Generell werden im Hinblick auf Resistenzwirkungen (u.a. gegen den Feuerbranderreger *Erwinia amylovora*) verschiedene Phenylpropanoide mit sehr unterschiedlichen Molekülstrukturen beschrieben. Das Hydrochinonglukosid Arbutin wurde beispielsweise in mit Feuerbrand inokulierten Birnen in resistenten Sorten in höheren Konzentrationen vorgefunden als in den anfälligen Sorten (HILDEBRAND et al. 1969). Zudem konnten in *in-vitro*-Experimenten bei einer Arbutin-Konzentration von über 800ppm Wachstumshemmungen bei *Erwinia amylovora* erzielt werden (SCHROTH und HILDEBRAND 1965). Als ebenfalls toxisch gegen *Erwinia amylovora* wird das Aglykon Hydrochinon angegeben (BERG und GIBBINS 1983). Bedingt durch eine Infektion mit dem Feuerbranderreger gibt es nach SCHROTH und HILDEBRAND (1965) die Möglichkeit der Hydrochinonbildung über die Aktivierung der natürlich vorhandenen β -Glucosidasen durch Metabolite, deren Entstehung erst durch das Eindringen des Pathogens ausgelöst wurde, oder das Pathogen an sich produziert selbst β -Glucosidasen. In beiden Fällen ist die Folge eine gesteigerte Glykosidierung von Arbutin. Entgegen dieser Annahme, dass Hydrochinon nur in infizierten Blättern vorliegt, geben SMALE und KEIL (1966) hohe Konzentrationen von ungebundenem Hydrochinon in unverletzten, nicht infizierten Birnenblättern an.

Die Beobachtungen der infektionsbedingten Gehaltsabnahme von Arbutin bei SCHROTH und HILDEBRAND (1965) bestätigte sich zwar in der als feuerbrandresistent eingestuften Birnensorte 'Harrow Sweet' (Kap. 3.2.1), allerdings waren die Konzentrationen von Arbutin in dieser Sorte im Vergleich zu den anfälligeren Genotypen 'Abate Fetel' und 'Pyrodwarf' sowohl vor als auch nach der Feuerbrandinokulation niedriger.

Die Klasse der Hydroxycimtsäuren, zu denen die Chlorogensäure als ein Hauptbestandteil der phenolischen Inhaltsstoffe von Birnen zählt (ESCARPA und GONZALES 2000; SCHIEBER et al. 2001), wird ebenfalls als eine weitere mögliche Gruppe der Abwehrstoffe gesehen. EVRENOSGLU et al. (1999) weisen beispielsweise auf einen höheren Chlorogensäuregehalt in feuerbrandresistenten Birnensorten hin und HILDEBRAND und SCHROTH (1964b) beschrieben die Chlorogensäure als antibiotisch wirksam gegen *Erwinia amylovora*. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei *in-vitro*-Tests keine Wachstumshemmung von *Erwinia amylovora* durch eine Chlorogensäure-Zugabe (RÖMMELT et al. 2002). Keine bakterizide Wirkung konnte in denselben Tests ebenfalls mit der Kaffeesäure nachgewiesen werden. Dagegen bewirkte eine *p*-Cumarsäure-Zugabe von 1000ppm ein Abtöten der Erregerzellen (RÖMMELT et al. 2002).

Die höchsten Hydroxyzimtsäuregehalte lagen mit deutlichem Niveauunterschied zu den beiden anderen Genotypen in der Sorte 'Harrow Sweet' vor. Auf die Inokulation mit dem Feuerbranderreger reagierten jedoch alle drei Genotypen einheitlich mit einer Gehaltsreduktion dieser Substanzen. Eine Abnahme der Konzentrationen nach der Inokulation wurde ebenfalls in der Phenolklasse der Flavonolglykoside bei den Sorten 'Harrow Sweet' und 'Abate Fetel' festgestellt und die höchsten Gehalte dieser Verbindungen wurden in der Sorte 'Abate Fetel' nachgewiesen.

Von einer Beziehung zwischen dem Vorhandensein von Flavonoiden in glykosidischer Bindung, wie den Quercetinglykosiden, bei unterschiedlichen Birnenpflanzen und ihrer Resistenz gegen Feuerbrand, berichten MABRY und ULUBELEN (1980). Andere Autoren (HARBORNE 1994; COOPER-DRIVER und BHATTACHARYA 1998) schreiben dagegen den Aglyka wie z.B. dem Quercetin hohe antioxidative Eigenschaften zu.

Eine weitere besonders in der Resistenzwirkung bedeutende Phenolklasse stellen die Flavanole dar. Aufgrund ihrer Fähigkeit zu polymerisieren und irreversible Verbindungen mit Proteinen eingehen zu können, wird diese Substanzklasse wegen ihrer hohen antimikrobiellen Eigenschaften als sehr wertvoll eingeschätzt (SCALBERT 1991). Als ein Unterscheidungsmerkmal von resistenten und anfälligen Pflanzensorten werden häufig die Konzentrationen von Verbindungen der Flavan 3-olen sowie der Flavan 3,4-diole angegeben. Höhere Gehalte an Flavan 3-olen konnten von TREUTTER und FEUCHT (1990b) sowohl in nicht infiziertem wie auch in infiziertem Blattmaterial von resistenten Apfel- und Birnensorten nachgewiesen werden. Die von SIEROTZKI und GESSLER (1993) angegebenen hohen konstitutiven Gehalte der Flavan 3-ole (Catechin und Epicatechin) in der feuerbrandresistenten Apfelsorte 'Evereste', sind nach VENISSE et al. (2002) der Grund für die in ihren Untersuchungen festgestellten geringen Veränderungen der Genexpressionen nach einer Feuerbrandinokulation. In Untersuchungen mit Birnenpflanzen fanden RYUGO et al. (1990) sowohl höhere Gehalte an Gesamtphenolen sowie Leucocyanindinen (= Flavan 3,4-diole) als auch eine positive Korrelation zwischen diesen phenolischen Inhaltsstoffen und der Resistenz gegenüber Feuerbrandinfektionen. Abweichend von den höheren Konzentrationen der Flavanole in den resistenten Genotypen in diesen hier beschriebenen Untersuchungsergebnissen wurden im Vergleich zu den Genotypen 'Harrow Sweet' und 'Pyrodwarf' die höchsten Konzentrationen dieser phenolischen Verbindungen in der feuerbrandanfälligen Sorte 'Abate Fetel' festgestellt. Zusätzlich zu diesen hohen Flavanolkonzentrationen ohne Inokulation, nahmen die Gehalte nach der Inokulation in dieser Sorte sogar noch zu.

Insgesamt konnte in jedem der drei Genotypen, ob feuerbrandanfällig (‘Abate Fetel’), weniger anfällig (‘Pyrodwarf’) oder resistent (‘Harrow Sweet’), mindestens ein hoher Gehalte einer der Phenolklassen nachgewiesen werden. Andererseits hob sich die als feuerbrandresistent beschriebene Birnensorte ‘Harrow Sweet’ nicht durch auffallend hohe Konzentrationen in den Phenolklassen der Hydroxyzimtsäuren, der Flavonolglykoside, der Flavanole sowie bei Arbutin von den anfälligeren Genotypen ‘Abate Fetel’ und ‘Pyrodwarf’ ab, so dass eine Korrelation zwischen der Anfälligkeit gegen den Feuerbranderreger und den Flavonoidgehalten nicht belegt werden konnte. Die Ergebnisse bestätigen die Vermutung von HARBORNE (1999), dass es keinen erkennbaren Zusammenhang zwischen der chemischen Struktur und der antimikrobiellen Wirkung einer phenolischen Substanz gibt, sondern es in Bezug auf die Resistenzwirksamkeit vor allem auf die Fähigkeit einer Pflanze ankommt, wie schnell diese eine ausreichend wirksame Menge an phenolischen Substanzen an der „richtigen“ Stelle bilden kann (HARBORNE 1982).

Nachdem im vorangegangenen Abschnitt aufgezeigt wurde, welchen Effekt eine Inokulation mit dem Feuerbranderreger auf verschiedene Phenolkonzentrationen haben kann, waren in weiteren Versuchen die Fragen zu dem Einflussfaktor Prohexadion-Ca folgende:

- Reagieren Birnenpflanzen auf eine Behandlung mit Prohexadion-Ca mit Modifikationen in der Phenylpropanoidbiosynthese?
- Werden dieselben oder ähnliche Verbindungen wie im Apfel stimuliert und/oder induziert und unterscheiden sich die beiden Obstarten in Bezug auf ihre Reaktionsgeschwindigkeit in der Biosynthese?
- Lassen sich zusätzlich zu den durch die Prohexadion-Ca-Behandlung hervorgerufenen Veränderungen in den Phenolkonzentrationen auch noch Unterschiede im Blattalter und Genotyp erkennen?

Der Eingriff von Prohexadion-Ca in die Flavonoidbiosynthese ist vor allem auf die starke Beeinflussung der Enzymaktivitäten innerhalb dieses Stoffwechsels zurückzuführen. Im Vordergrund stehen dabei einerseits die Hemmung von 2-oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen und andererseits die Aktivierung wichtiger Enzyme des Flavonoidstoffwechsels. Durch die hohe Strukturähnlichkeit mit der 2-Oxoglutarat-Säure kann Prohexadion-Ca mit Dioxygenasen, welche die 2-Oxoglutarat-Säure als Cosubstrat benötigen, konkurrieren und die Folge ist eine zeitweise Blockade dieser Enzyme (RADEMACHER 2000). 2-oxoglutarat-abhängige Dioxygenasen, welche in der Flavonoidbiosynthese beteiligt sind

und von Prohexadion-Ca gehemmt werden können, sind die FHT, FLS, FNS I und ANS (FORKMANN und HELLER 1999).

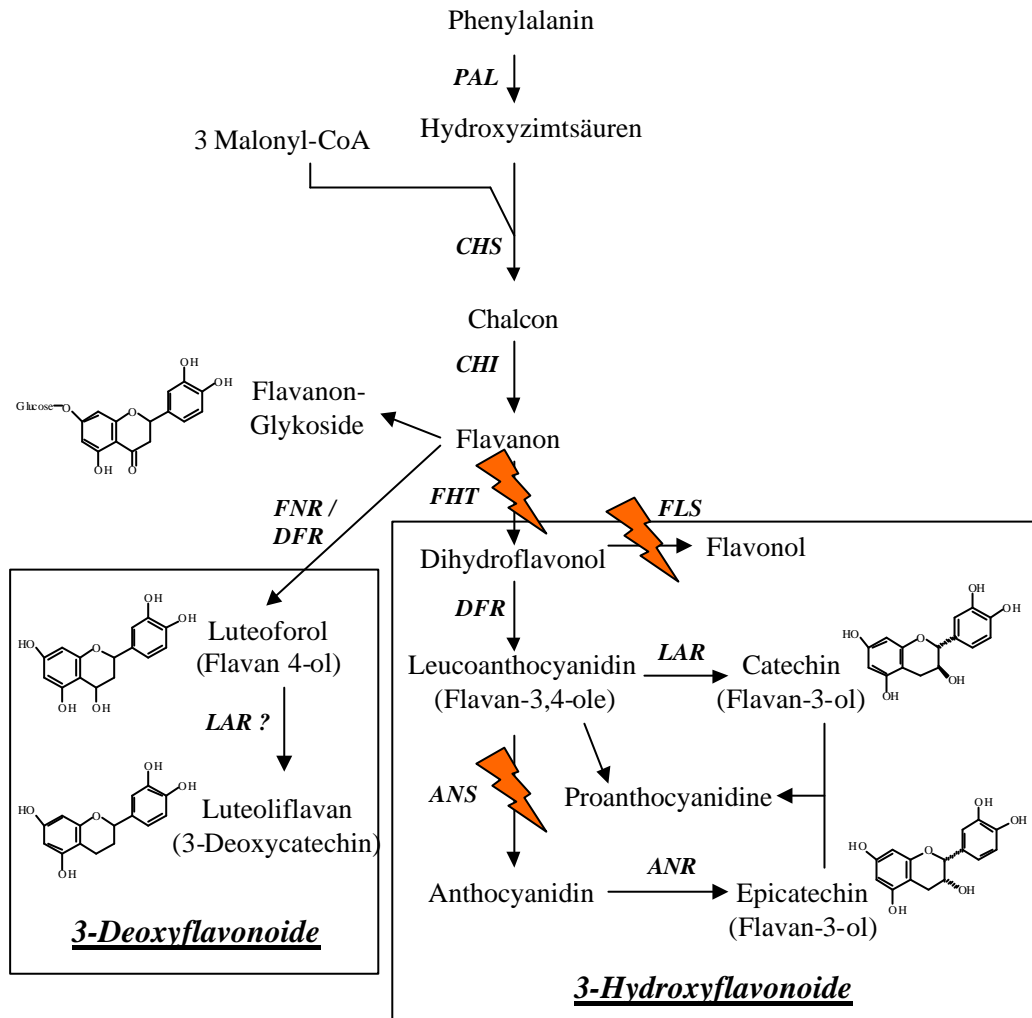


Abb. 57: Biosynthese der phenolischen Verbindungen und Effekte von Prohexadion-Ca (verändert nach FORKMANN und HELLER 1999 und XIE et al. 2004)

Die FHT katalysiert die Umwandlung der Flavanone zu den Dihydroflavonolen und ist dadurch das Schlüsselenzym für die weiteren Biosyntheseschritte zu den Flavonolen, den Flavanolen, den Anthocyanidinen und den Proanthocyanidinen. Die Folgen einer FHT-Inhibierung sind nach STICH und FORKMANN (1988) außer dem Mangel an Dihydroflavonolen für die Umsetzung zu den 3-Hydroxyflavonoiden auch eine Akkumulierung der Flavanone. Da die Flavanone in hohen Konzentrationen für die Pflanzenzellen toxisch sind, müssen diese Verbindungen schnellstens zu anderen Strukturen umgesetzt werden. Eine Möglichkeit stellt

dabei die Glykosidierung der Flavanone zu wasserlöslicheren Verbindungen dar, welche anschließend in dieser „ungiftigen“ Form in die Vakuolen der Zellen transportiert werden können. Der Nachweis von Eriodictyol 7-glukosid, Naringenin 7-glukosid und weiterer Eriodictyol-Glykoside (Kap. 3.1, 3.2.2, 3.2.3) in den mit Prohexadion-Ca behandelten Birnenblättern bestätigt diese „Entgiftungsreaktion“. Ebenfalls mit einer starken Akkumulierung von Flavanonen reagieren auch Kiwiblätter (*Actinidia* sp.) auf eine Behandlung mit Prohexadion-Ca (GOSCH et al. 2003).

Die zweite Umsetzungsreaktion der Flavanone ist die Reduktion an Position 4 zu den entsprechenden Flavan 4-olen durch das Enzym FNR (Abb. 58). Erstmals wurde dieser Enzymschritt in der Biosynthese der 3-Deoxyflavonoide in den Blütenpigmenten von *Sinningia cardinalis* und *Columnnea hybrida* beschrieben (STICH und FORKMANN 1988a,b). Durch die weitere Reduktion des Flavan 4-ols Luteoforol, welche vermutlich durch die LAR katalysiert wird, entsteht das 3-Deoxycatechin Luteoliflavan (Abb. 58). Aufgrund der chemischen Instabilität des Luteoforols kann dieser Enzymschritt als auch die Verbindung selbst nicht nachgewiesen werden. Dagegen ist das Luteoliflavan als neu induzierte Substanz nach der Prohexadion-Ca-Behandlung in den Apfelblättern (RÖMMELT 2002) und ebenso in den analysierten Birnenblättern identifiziert worden (Kap. 3.1).

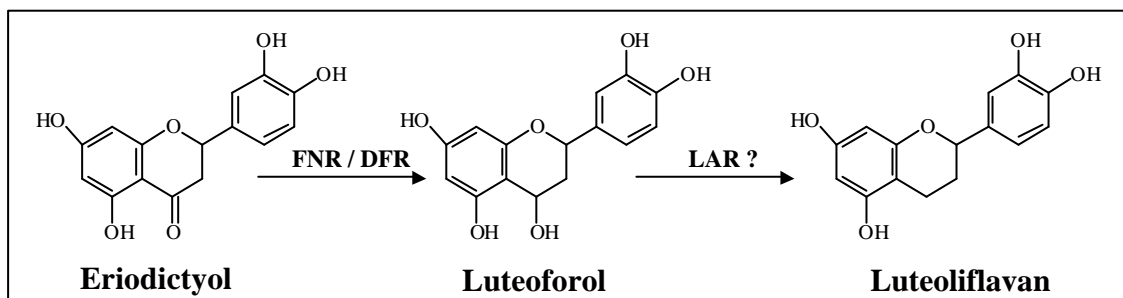


Abb. 58: Umsetzungsschritte von Eriodictyol zu Luteoliflavan

Im regulären Flavonoidstoffwechsel ist, abgesehen von der OH-Gruppe an Position 3, die DFR-Aktivität mit der Reduktion der Dihydroflavonole zu den Flavan 3,4-olen mit der sehr ähnlichen FNR-Aktivität (= Reduktion der Flavanone zu den Flavan 4-olen) vergleichbar. In biochemischen und molekularbiologischen Untersuchungen mit Maispflanzen konnte gezeigt werden, dass die Reduktion der Dihydroflavonole und der Flavanone durch die DFR möglich ist und, dass außerdem die Bildung der 3-Deoxyanthocyanidine abhängig von einer fehlenden

bzw. niedrigen FHT-Aktivität ist (HALBWIRTH et al. 2003a). In Klonierungsversuchen mit heterolog exprimierten Enzymen wurde ebenfalls nachgewiesen, dass auch die DFR-Enzyme von Birne und Apfel eine FNR-Aktivität besitzen. Zusätzlich konnten in diesen molekulargenetischen Untersuchungen Differenzen zwischen den Biosynthesen von Apfel- und Birnenblättern festgestellt werden. Neben den geringen Umsetzungsraten der Birnen-DFR von Dihydrokämpferol und Naringenin im Vergleich zu Apfel-DFR, zeigten die Enzympräparate von jungen Birnenblättern nur eine sehr schwache FNR-Aktivität (FISCHER et al. 2003).

Vergleicht man allerdings die Luteoliflavankonzentrationen in Birnenblättern mit denen aus Apfelblättern, so ergeben sich je nach Versuch nur geringfügige Differenzen.

In den Untersuchungen von Prohexadion-Ca behandelten Birnenblättern (Kap. 3.2.2) konnten bei beiden Enzymen (DFR und FNR) beim Vergleich der behandelten zu den unbehandelten Blättern veränderte Aktivitäten nachgewiesen werden. Die DFR-Aktivitäten waren dabei über den gesamten Versuchszeitraum in den behandelten Blättern höher als in den unbehandelten. Im Gegensatz dazu wurde eine gesteigerte FNR-Aktivität nur in den mit der geringeren Prohexadion-Ca-Konzentration (125ppm) behandelten Blättern festgestellt. Die FNR-Aktivität in den mit 250ppm behandelten Blättern war dagegen nur zeitweise höher als in den unbehandelten Blättern. Erstaunlicherweise zeigten sich diese Unterschiede zwischen den zwei Prohexadion-Ca-Konzentrationen in umgekehrter Weise in den Gehalten von Luteoliflavan. So waren diese Gehalte in den mit 125ppm behandelten Blättern niedriger als die der mit 250ppm behandelten.

Eine Zunahme der Flavanolgehalte, welche sich in den höheren Konzentrationen der Flavanole in den behandelten Birnenblättern zeigte, wurde ebenso in mit Prohexadion-Ca behandelten Apfelblättern (RÖMMELT 2002) und in *in-vitro* Apfelpflanzen (RÜHMANN und TREUTTER 2003) beobachtet.

Interessant war bei Birnen in dieser Phenolklasse noch die unterschiedliche Reaktion auf Prohexadion-Ca bei den monomeren Flavanolen Catechin und Epicatechin (3.2.2.2). Während die Konzentrationen bei Catechin in den behandelten Blättern meistens höher war als in den unbehandelten, lagen bei Epicatechin dagegen in den behandelten zeitweise niedrigere Konzentrationen als in den unbehandelten Blättern vor. Erklärbar ist diese Beobachtung durch die mögliche Hemmung der ANS durch Prohexadion-Ca. In der Biosynthese sind die Leucoanthocyanidine Ausgangssubstrat für die weitere Synthese der Flavanole. Im Gegensatz zu dem Epicatechin wird das Catechin jedoch nur durch einen Enzymschritt aus dieser Vorstufe gebildet (FORKMANN und HELLER 1999). Die Synthese von den

Leucoanthocyanidinen zu Epicatechin erfolgt dagegen über zwei Enzymsschritte. Der erste Schritt ist die Umsetzung zu den Anthocyanidinen durch die ANS und erst dann folgt die Reduktion durch die ANR (XIE et al. 2004). Wird nun durch eine Prohexadion-Ca-Behandlung der erste Enzymsschritt unterbrochen, kann daraus ein reduzierter Epicatechingehalt resultieren.

Eine weitere Klasse der konstitutiv vorhandenen phenolischen Inhaltsstoffe von Birnenblättern, welche durch eine Prohexadion-Ca-Behandlung in allen durchgeführten Versuchen verändert werden, sind die Flavonolglykoside (Kap. 3.2.2 und 3.2.3). Im Gegensatz zu den Flavanolen sind die Konzentrationen dieser Gruppe der 3-Hydroxyflavonoide jedoch in den behandelten Blättern niedriger als in den unbehandelten Blättern. Der Grund für diese Reduzierung der Flavonolglykoside ist vermutlich die zeitweilige Hemmung der 2-oxoglutarat-abhängigen Dioxygenase FLS. Dadurch kann die Umsetzung der Dihydroflavonole zu den Flavanolen nicht mehr stattfinden. Bestätigt wird diese Annahme der FLS-Hemmung durch die zuvor beschriebene Erhöhung der Flavanolkonzentrationen in den behandelten Blättern. Denn aufgrund der gesteigerten FHT-Aktivität nach der Prohexadion-Ca-Behandlung steht für die Bildung der 3-Hydroxyflavonoide mehr Ausgangssubstrat zur Verfügung. „Genutzt“ wird dieses Substrat jedoch nur für die Synthese zu den Flavanolen.

Beim Vergleich der behandelten mit den unbehandelten Blättern wurden keine Unterschiede in den Konzentrationen der Hydroxyzimtsäuren beobachtet. Die kontinuierliche Abnahme dieser Verbindungen über den Versuchsverlauf ist auf die ebenfalls abnehmende PAL-Aktivität zurückzuführen.

Die Reduzierung der gesamten Flavonoidbiosynthese wie sie im Rückgang der Enzymaktivitäten sowie in der Konzentrationsabnahme der Phenylpropanoide über einen längeren Versuchszeitraum zu beobachten ist (Kap. 3.2.2 und 3.2.3.1), scheint jedoch hauptsächlich durch die Blattentwicklung reguliert zu werden. Denn unabhängig ob die Blätter zuvor mit Prohexadion-Ca behandelt wurden oder nicht, entwickelt sich der Konzentrationsverlauf der Hydroxyzimtsäuren, der Flavonolglykoside, der Flavanole und der neu induzierten Verbindungen in allen Blättern bzw. in jeder Blattetage auf dieselbe Weise.

Die Frage nach den Reaktionsunterschieden verschiedener Genotypen in der Flavonoidbiosynthese auf exogene Einflussfaktoren wurde bereits anhand von Feuerbrandinokulationen beschrieben. Zusätzlich dazu wurden dieselben Genotypen (Abate

Fetel´, `Pyrodwarf´ und `Harrow Sweet´) auch nach einer Behandlung mit Prohexadion-Ca untersucht (Kap. 3.2.3.2). Dabei zeigten sich zwar Differenzen zwischen den Genotypen in der Höhe der Phenolkonzentrationen und ebenso in der Geschwindigkeit der Synthese dieser Verbindungen, in allen drei Genotypen konnte jedoch eine einheitliche Induktion der Flavanone und neu gebildeten Flavanole (v.a. Luteoliflavan) nachgewiesen werden.

In Bezug auf die befallsreduzierende Wirkung von Prohexadion-Ca war daher besonders interessant, dass die höchsten Gehalte der Flavanone in der feuerbrandresistenten Birnensorte `Harrow Sweet´ nachgewiesen wurde. Die stärkste Induktion der neuartigen Flavanole fand dagegen in der feuerbrandanfälligen Birnensorte `Abate Fetel´ statt. In dem Versuch mit unbewurzelten Sprossspitzenkulturen (Kap. 3.2.3.2) konnte allerdings beobachtet werden, dass die Sorte `Abate Fetel´ im Gegensatz zu den beiden anderen Sorte `Pyrodwarf´ und `Harrow Sweet´, auf die Behandlung mit Prohexadion-Ca mit einer deutlich langsameren Stimulierung der Flavanole sowie der neu induzierten Flavonoide reagiert.

Betrachtet man alle Modifikationen, welche durch Prohexadion-Ca in der Phenylpropanoidbiosynthese ausgelöst werden, so stellen dabei im Hinblick auf die Resistenzwirkung gegen den Feuerbranderreger *Erwinia amylovora* vor allem die neu induzierten Flavonoide und hierbei insbesondere die 3-Deoxyflavonoide den Haupteffekt dar. Neben den regulär in Birnenpflanzen vorkommenden 3-Hydroxyflavonoiden wurden die 3-Deoxyflavonoide in Rosaceen bisher nur bei Apfel, Rose, Pfirsich, Wein, Heidelbeere, Kiwi, Erdbeere und Crataegus (GOSCH et al. 2003; SCHLANGEN et al. 2003) nachgewiesen. Ihr Vorkommen ist ansonsten nur von wenigen Pflanzen wie den Gesneriaceen, Mais (*Zea mays*) und Hirse (*Sorghum* sp.) bekannt (HARBORNE 1966; STYLES und CESKA 1975; MÜLLER-HARVEY und REED 1992). Besonders interessant sind die 3-Deoxyflavonoide in *Sorghum* sp.. Denn ihre Akkumulationen finden nur in mit Pilzen infizierten Pflanzen statt und ihr Vorhandensein wird dabei vor allem mit einer erfolgreichen Pathogenabwehr in Verbindung gebracht (SNYDER und NICHOLSON 1990; LO et al. 1996, 1999; WHARTON und NICHOLSON 2000). Ein Abtöten bzw. eine Wachstumshemmung des Feuerbranderregers *Erwinia amylovora* konnte bei einer Zugabe des 3-Deoxycatechins Luteoliflavan allerdings in *in-vitro*-Tests nicht nachgewiesen werden (RÖMMELT et al. 2002). Dagegen zeigte die Vorstufe des Luteoliflavans, das Flavan 4-ol Luteoliflorol bzw. dessen Oligo- oder Polymer eine deutliche bakterizide Wirkung auf *Erwinia amylovora* (SCHLANGEN 2003). Bei den induzierten Verbindungen aus der Phenolklasse der Flavanone war sowohl bei Eriodictyol 7-glukosid als

auch bei Naringenin 7-glukosid keine antibakterielle Wirkung gegen *Erwinia amylovora* zu beobachten (RÖMMELT et al. 2002).

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass der Phenylpropanoidstoffwechsel von Birnenblätter auf Infektionen mit *Erwinia amylovora* genotyp-, sowie blattalterabhängig reagiert. Zudem löste einzig die Behandlung mit Prohexadion-Ca sowohl quantitative als auch qualitative Modifikationen im Phenylpropanoidstoffwechsel bei Birne aus und kann somit „aktiv“ in die Biosynthese der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe eingreifen.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl die konstitutiven als auch die nach einer Behandlung mit dem Bioregulator Prohexadion-Ca induzierten phenolischen Inhaltsstoffe von Birnenblättern isoliert und identifiziert. Darüberhinaus wurden die Modifikationen in der Phenylpropanoidbiosynthese nach einer Inokulation mit dem Feuerbranderreger *Erwinia amylovora* und nach einer Behandlung mit Prohexadion-Ca untersucht.

Die wichtigsten Ergebnisse lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

1. An konstitutiven phenolischen Inhaltsstoffen von Birnenblättern wurde das Hydrochinonglukosid Arbutin, die Hydroxyzimtsäuren Chlorogensäure, Neochlorogensäure, *p*-Cumarsäure, Kaffeesäure und Derivate der Kaffeesäure und der *p*-Cumarsäure identifiziert. Außer diesen Verbindungen wurden an Flavonole die Quercetinglykoside Hyperin, Isoquercitrin, Rutin, Quercitrin, Avicularin und die Isorhamnetinglykoside Isorhamnetin-glukosid, Isorhamnetin-rutinosid und ein weiteres Isorhamnetinglykosid nachgewiesen. An Flavanolen wurde Catechin, Epicatechin und die Procyanidine B1, B2, C1, B5, E-B5 identifiziert.
2. Die Behandlung mit dem Bioregulator Prohexadion-Ca bewirkte eine Induktion von neuartigen Flavonoiden. Diese Verbindungen wurden in Birnenblättern erstmalig nachgewiesen und als das 3-Deoxycatechin Luteoliflavan, Eriodictyol 7-glukosid, Naringenin 7-glukosid und zwei weitere Eriodictyolglykoside identifiziert.
3. Die Befallsstärke variierte je nach *Erwinia amylovora*-Stamm und war in den untersuchten Sorten 'Abate Fetel' und 'Harrow Sweet' unterschiedlich stark ausgeprägt.
4. Die konstitutiv höchsten Gehalte an Arbutin wurden in der Unterlage 'Pyrodwarf', die höchsten Gehalte der Hydroxyzimtsäuren in der Sorte 'Harrow Sweet' und die höchsten Gehalte der Flavonolglykoside und der Flavanole in der Sorte 'Abate Fetel' nachgewiesen.
5. Nach einer Inokulation mit dem Feuerbranderreger *Erwinia amylovora* ergaben sich in den Genotypen 'Abate Fetel', 'Pyrodwarf' und 'Harrow Sweet' Veränderungen in den Konzentrationen der Phenylpropanoide.

6. Die Behandlung mit Prohexadion-Ca bewirkte neben der Induktion neuer Flavonoide ebenso Modifikationen in den Enzymaktivitäten: Keine Veränderungen wurden in der PAL-Aktivität nachgewiesen, dagegen kam es zu einer Erhöhung der Aktivitäten der Enzyme CHS, FHT, DFR und FNR.
7. Zusätzlich zu den qualitativen Änderungen in der Flavonoidbiosynthese reagierten Birnenblätter auf Prohexadion-Ca auch mit quantitativen Änderungen: Konzentrationsabnahmen ergaben sich bei den Flavonolglykosiden und Konzentrationszunahmen fanden bei den Flavanolen statt. Keine Konzentrationsänderungen wurden dagegen bei den Hydroxyzimtsäuren festgestellt.
8. Die höchsten Konzentrationen von Phenylpropanoiden wiesen die jüngsten Birnenblätter auf. Zusätzlich zeigte sich mit zunehmender Blattentwicklung eine Abnahme der Konzentrationen der Hydroxyzimtsäuren, der Flavonolglykoside und des Catechins.
9. Qualitative Unterschiede im Phenolmuster von feuerbrandresistenten und anfälligen Genotypen wurden auch nach einer Behandlung mit Prohexadion-Ca nicht vorgefunden. Dagegen erfolgte die langsamste Stimulierung der Biosynthese von Eriodictyol 7-glukosid, Luteoliflavan und den Flavanolen in der feuerbrandanfälligen Sorte 'Abate Fetel'.

Damit konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Phenylpropanoidbiosynthese von Birnenblätter durch verschiedenste exogene und endogene Faktoren beeinflusst werden kann. Abhängig von Genotyp und Blattentwicklung reagierte die Phenylpropanoidbiosynthese von Birne sowohl auf eine Infektion mit *Erwinia amylovora* als auch auf eine Behandlung mit Prohexadion-Ca. Desweiteren konnte in den Untersuchungen belegt werden, dass Prohexadion-Ca der einzige Einflussfaktor ist, welcher neben den quantitativen Modifikationen im Phenylpropanoidstoffwechsel bei Birne auch qualitative Veränderungen bewirkt.

6 Literaturverzeichnis

Aldwinckle H.S., Bhaskara Reddy M.V. und Norelli J.L., 2002: Evaluation of control of fire blight infection of apple blossoms and shoots with SAR inducers, biological agents, a growth regulator, copper compounds, and other materials. *Acta Hort.* 590, S. 325-331

Amiot M.J., Tacchini M., Aubert S.Y. und Oleszek W., 1995: Influence of cultivar, maturity stage, and storage conditions on phenolic composition and enzymatic browning of pear fruits. *J. Agric. Food Chem.* 43, S. 1132-1137

Andrade P.B., Carvalho A.R.F., Seabra R.M. und Ferreira M.A., 1998: A previous study of phenolic profiles of quince, pear, and apple purees by HPLC diode array detection for the evaluation of quince puree genuineness. *J. Agric. Food Chem.* 46, S. 968-972

Barz W. und Köster J., 1981: Turnover and degradation of secondary (natural) products. In: Stumpf P.K., Conn E.E. (Hrsg.), *The Biochemistry of Plants*, Vol. 7, Academic Press, New York, S. 35-80

Bauer H., 1991: Untersuchungen zur Anwendbarkeit von Phenol-Bestimmungen bei der Charakterisierung von Genotypen unter dem Aspekt des Sortenschutzes. Dissertation, Lehrstuhl für Obstbau, TU München-Weihenstephan

Bazak A. und Rademacher W., 2000: Growth regulation of pome and stone fruit trees by use of prohexadione-Ca. *Acta Hort.* 590, S. 41-50

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

Beer S.V., Kim J.H., Gustafson H.L., Zumoff C.H., Momol M.T., Bodganove A.J., Laby R.J., Tanii A., Tamura O. und Aldwinckle H.S., 1996: Characterization of bacteria that cause 'bacterial shoot blight of pear' in Japan. *Acta Hort.* 411, S. 179-181

Berg C.W. und Gibbins L.N., 1983: Impairment of substrate oxidation in the cytoplasm membrane of the fire blight organism *Erwinia amylovora* by hydroquinone. Canadian Journal of Plant Pathology 5, S. 1-6

Blankenship S.M. und Richardson D.G., 1985: Changes in phenolic acids and internal ethylene during longterm cold storage of pears *Pyrus communis*. J. Am. Soc. Hort. Sci. 110; S. 336-339

Bonn W.G. und van der Zwet T., 2000: Distribution and economic importance of fire blight. In: Vanneste J.L. (Hrsg.), Fire blight – The disease and its causative agent, *Erwinia amylovora*. CABI Publishing, Wallingford, UK, S. 37-53

Brisset M.N., Cesborn S., Thomson S.V. und Paulin J.P., 2000: Acibenzolar-S-methyl induces the accumulation of defense-related enzymes in apple and protects from fire blight. European Journal of Plant Pathology 106, S. 529-536

Britsch L., Heller W. und Grisebach H., 1981: Conversion of flavanone to flavone, dihydroflavonol and flavonol with enzyme system from cell cultures of parsley. Z. Naturforschung 36c, S. 742-750

Bubán T., Sallai P., Obzsut-Truskovszky E. und Hertelendy L., 2002: Trials with applying chemical agents other than bactericides to control fire blight in pear orchards. Acta Hort. 590, S. 263-267

Bubán T., Földes L., Kormány A., Hauptmann S., Stammner G. und Rademacher W., 2003: Prohexadione-Ca in apple trees: control of shoot growth and reduction of fire blight incidence in blossoms and shoots. Journal of Applied Botany 77, S. 95-102

Calzolari A., Finelli F. und Mazzoli G.L., 1999: A severe unforeseen outbreak of fire blight in the Emilia Romagna region. Acta Hort. 489, S. 171-176

Challice J.S., 1972: Phenolic compounds of the subfamily pomoideae: a chemotaxonomic survey. Phytochemistry 12, S. 1095-1101

Challice J.S., 1973: Numerical taxonomic studies of the genus *Pyrus* using both chemical and botanical characters. Bot. J. Linn. Soc. 67, S. 121-148

Challice J.S. und Williams A.H., 1968: Phenolic compounds of genus *Pyrus* – I. Phytochemistry 7, S. 119-130

Challice J.S. und Williams A.H. 1970: Phenolic compounds of the genus *Pyrus*: A chemotaxonomic study of further oregon specimens. Phytochemistry 9, S. 1271-1276

Chappell J. und Hahlbrock K., Transcription of plant defense genes in response to UV-light or fungal elicitor. Nature 311, S. 76-78

Cooper-Driver G.A. und Bhattacharya M., 1998: Role of phenolics in plant evolution. Phytochemistry 49, S. 1165-1174

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

Costa G., Andreotti C., Sabatini E., Bregoli A.M., Bucchi F., Spada G. und Mazzini F., 2002: The effect of prohexadione-Ca on vegetative and cropping performance and fire blight control of pear trees. Acta Hort 596, S. 531-534

Deckers T. und Schoofs H., 2002, Host susceptibility as a factor in control strategies of fire blight in European pear growing. Acta Hort. 590, S. 127-134

Drumm-Herrel H., 1987: Blue light control of pigment biosynthesis – anthocyanin biosynthesis. In: Senger H. (Hrsg.), Blue light responses: Phenomena und occurrence in plants and microorganisms, Vol. I, CRC Press. Inc. Boca Raton, S. 65-75

Duggan M.B., 1969: Identity and occurrence of certain flavonol glycosides in four varieties of pears. J. Agric. Food Chem. 17, S. 1098-1101

-
- Escarpa A. und Gonzáles M.C., 1999: Fast separation of (poly)phenolic compounds from apples and pears by high-performance liquid chromatography with diode array detection. *J. Chromatography A* 830, S. 301-309
- Escarpa A. und Gonzáles M.C., 2000: Evaluation of high-performance liquid chromatography for determination of phenolic compounds in pear horticultural cultivars. *Chromatographia* 51, S. 37-43
- Evans R.R., Evans J.R., Regusci C.L. und Rademacher W., 1999: Mode of action, metabolism and uptake of BAS 125W, Prohexadione-calcium. *HortScience* 34, S. 1200-1201
- Evrenosoglu Y., Misirli A. und Gülcan R., 1999: Determination of phenolic compounds in pear cultivars resistant and susceptible to *Erwinia amylovora*. *Acta Hort.* 489, S. 327-332
- Feucht W. und Treutter D., 1989: Phenolische Naturstoffe: Ihre Bedeutung für Gartenbau, Land- und Forstwirtschaft. Obst- und Gartenbauverlag, München
- Fischer T.C., Halbwirth H., Meisel B., Stich K und 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, S. 223-230
- Forkmann G. und Heller W., 1999: Biosynthesis of Flavonoids. In: Barton D. und Nakanishi K. (Hrsg.) *Comprehensive Natural Products Chemistry*, Vol.1, Elsevier, Amsterdam, S. 714-748
- Forshey C.G. und Elfving D.C., 1987: The relationship between vegetative growth and fruiting in apple trees. *Hort. Rev.* 9, S. 229-287
- Gerard H.C., Fet W.F., Moreau R.A., Osman S.F. und Miller R.L.J., 1993: Chemical and enzymatic investigation of the leaf cuticle of pear genotypes differing in resistance to pear *Pyslla*. *Agric. Food Chem.* 41, S. 2437-2441

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

Griggs D.L., Hedden P., Temple-Smith K.E. und Rademacher W., 1991: Inhibition of gibberellin 2 β -hydroxylases by acylcyclohexanedione derivatives. *Phytochemistry* 30, S. 2513-2517

Gross G.G., 1981: Phenolic acids. In: Stumpf P.K., Conn E.E. (Hrsg.), *The Biochemistry of Plants*, Vol. 7, Academic Press, New York, S. 301-316

Grossmann K., Häuser C., Sauerbrey E., Fritsch H. und Schmidt O., 1989: Plant growth retardants as inhibitors of ethylene production. *J. Plant Physiol.* 134, S. 538-543

Halbwirth H., Martens S., Wienand U., Forkmann G. und Stich K., 2003a: Biochemical formation of anthocyanins in silk tissues of *Zea mays*. *Plant Sci.* 164, S. 489-495

Halbwirth H., Fischer T.C., Römmelt S., Spinelli F., Schlangen K., Peterek S., Sabatini E., Messina C., Speakman J.B., Andreotti C., Rademacher W., Bazz C., Costa G., Treutter D., Forkmann G. und Stich K., 2003b: Induction of antimicrobial 3-deoxyflavonoids in pome fruit trees controls fire blight. *Z. Naturforsch.* 58c, S. 765-770

Hanke V., 2003: Feuerbrand – die neue Katastrophe in den Versuchsanlagen der BAZ. *Obstbau* 11, S. 562-564

Harborne J.B. 1966: Comparative biochemistry of flavonoids. II. 3-Deoxyanthocyanins and their systematic distribution in ferns and gesnerads. *Phytochemistry* 5, S. 589-600

Harborne J.B., 1982: *Introduction to ecological biochemistry*. Academic Press, London

Harborne J.B., 1988: *The flavonoids*. Chapman & Hall, New York

Harborne J.B., 1994: Plant polyphenols and their role in plant defence mechanisms. Polyphenols 1994, Palma de Mallorca, May 23-27, INRA Editions, Paris 1995, S. 19-22

Harborne J.B., 1999: The comparative biochemistry of phytoalexin induction in plants. Biochem. Syst. Ecol. 27, S. 335-367

Haslam E., 1989: Plant polyphenols. Cambridge University Press, Cambridge

Heller W., Ernst D., Langenbartels C. und Sandermann H., 1994: Induction of polyphenol biosynthesis in plants during development and environmental stress. Polyphenols 1994, Palma de Mallorca (Spain), May 23-27, INRA Editions, S. 67-78

Heller W. und Forkmann G., 1994: Biosynthesis of flavonoids. In: Harborne J.B. (Hrsg.) The flavonoids: advances in research since 1986, Chapman & Hall, London, S. 499-535

Herrmann K., 1996: Inhaltsstoffe der Birne. Industrielle Obst- und Gemüseverwertung 1, S. 2-8

Hildebrand D.C. und Schroth M.N. 1964a: Antibiotic activity of pear leaves against *Erwinia amylovora* and it's relation to β -glucosidase. Phytopathology 54, S. 59-69

Hildebrand D.C. und Schroth M.N., 1964b: Arbutin-hydrochinone complex in pear as a factor in fire blight development. Phytopathology 54, S. 640-645

Hildebrand D.C., Powell C.C. und Schroth M.N., 1969: Fire blight resistance in *Pyrus*: localization of arbutin and β -glucosidase. Phytopathology 59, S. 1534-1539

Hildebrand D.C., 1970: Fire blight resistance in *Pyrus*: hydrochinone formation as related to antibiotic activity. Can. J. Bot., S. 177-181

Hunter D.M., Pinsonneault P., Keppel F., Quamme H.A., Bonn W.G. und Layne R.E.C., 1992: 'Harrow Sweet' pear. HortScience 27: 1331-1334

- Iturriagagoitia-Bueno T., Gibson E.J., Schofield C.J. und John P., 1996: Inhibition of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase by 2-oxoacids. *Phytochemistry* 43, S. 343-349
- Jakob H.B., 1997: Pyrodarf – eine neue Birnenunterlage mit hoher obstbaulicher Leistungsfähigkeit und schwachem Wuchs. *Obstbau* 1, S. 12-14
- Jakob H.B., 1998: Pyrodwarf, a new clonal rootstock for high density pear orchards. *Acta Hort.* 475, S. 169-172
- Ju Z.G., Yuan Y.B., Liou C.L. und Xin S.H., 1995: Relationship among phenylalanine ammonia-lyase activity, simple phenol concentrations and anthocyanin accumulation in apple. *Sci. Hortic.* 61, S. 215-226
- Ju Z.G., Yuan Y.B., Liou C.L., Zhan S. und Wang M., 1996: Relationship among simple phenol, flavonoid and anthocyanin in apple fruit peel at harvest and scald susceptibility. *Postharvest. Biol. Technol.* 8, S. 83-93
- Kodoma M., Wada H., Otani H., Kohmoto K. und Kimura I., 1998: 3,5-di-o-caffeoylquinic acid, an infection inhibiting factor from *Pyrus pyrifolia* induced by infection with *Alternaria alternata*. *Phytochemistry* 47, 371-373
- Lattanzio V., Terzano R., Pastore M. und Hallewin G.D., 2002: Changes in phenol composition of *Pyrus communis* L. leaves infected by ESFY phytoplasma. *Polyphenols 2002*, Marrakech-Marocco, September 9-12, INRA Editions, S. 113-114
- Leistner E., 1981: Biosynthesis of plant quinones. In: Stumpf P.K., Conn E.E. (Hrsg.), *The Biochemistry of Plants*, Vol. 7, Academic Press, New York, S. 403-423
- Le Lezec M., Lecomte P., Laurens F. und Michelesi J.C., 1997: Sensibilité variétale au feu bactérien (3 Teile). *Arboriculture Fruitière* 503, S. 57-61; 504, S. 33-37; 505, S. 31-40
- Lespinasse Y., Lachaud G. und Paulin J.P., 1993: Study of *Malus* sp. x *Erwinia amylovora* interactions and screening of highly resistant selections among *Novole* x *Evereste* progeny. *Acta Hort.* 338, S. 387

- Leyva A., Jarillo J.A., Salinas J. und Martinez-Zapater J.M., 1995: Low temperature induces the accumulation of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNAs of *Arabidopsis thaliana* in a light-dependent manner. *Plant Physiol.* 108, S. 39-46
- Lo S.C., Weiergang I, Bonham C., Hipskind J., Wood K. und Nicholson R.L., 1996: Phytoalexin accumulation in sorghum: identification of a methyl ether luteolinidin. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 49, S. 21-31
- Lo S.C., De Verdier K. und Nicholson R.L., 1999: Accumulation of 3-deocyanthocyanidin phytoalexins and resistance to *Colletotrichum sublineolum* in Sorghum. *Physiol. Mol. Plant Path.* 55, S. 263-273
- Loper J.E., Henkels M.D., Roberts R.G., Grove G.G., Willet M.J. und Smith T.J. 1991: Evaluation of streptomycin, oxytetracycline, and copper resistance in *Erwinia amylovora* isolated from pear orchards in Washington State. *Plant Disease* 75, S. 287-290
- Mabry T.J. und Ulubelen A., 1980: Chemistry and utilization of phenyl propanoids including flavonoids, coumarins and lignans. *J. Agric. Food Chem.* 28, S. 189-196
- Margna U., 1977: Control at the level of substrate supply – an alternative in the regulation of phenylpropanoid accumulation in plant cells. *Phytochemistry*, 16, S. 419-426
- Mayr U., Batzdorfer R., Treutter D. und Feucht W., 1994: Surfactant-induced changes in phenol content of apple leaves and fruit skins. *Acta Hort.* 381, S. 479-487
- Mayr U., 1995: Einfluss des Phenolstoffwechsels beim Apfel (*Malus domestica*) auf das Resistenzpotential gegen den Apfelschorf (*Venturia inaequalis*). Dissertation, Lehrstuhl für Obstbau, TU München-Weihenstephan
- Mayr U., Treutter D., Santos-Buelga C. Bauer H. und Feucht W., 1995: Developmental changes in the phenol concentrations of 'Golden Delicious' apple fruits and leaves. *Phytochemistry*, 38, S. 1151-1155

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

Michalek S., 1997: Stimulierung der Phenolbiosynthese des Apfels (*Malus domestica*) im Hinblick auf induzierte Resistenz. Dissertation, Lehrstuhl für Obstbau, TU München-Weihenstephan

Michalek S., Klebel C., Treutter D. und Feucht W., 1999: Stimulation of flavanol biosynthesis in apple (*Malus domestica*) by abiotic elicitors.

Momol M.T. und Aldwinckle H.S., 2000: Genetic diversity and host range of *Erwinia amylovora*. In: Vanneste J.L. (Hrsg.), Fire blight – The disease and its causative agent, *Erwinia amylovora*. CABI Publishing, Wallingford, UK, S. 55-72

Müller-Harvey I. und Reed J.D.J., 1992: Identification of phenolic compounds and their relationship to in-vitro digestibility of sorghum leaves from bird-resistant and non-bird-resistant varieties. *Sci. Food Agric.* 60, S. 176-179

Nakayama I., Miyazawa T., Kobayashi M., Kamiya Y., Abe H. und Sakurai A., 1990: Effects of a new plant growth regulator, prohexadione calcium (BX-112), on shoot elongation caused by exogenously applied gibberellins in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Plant Cell Physiol.* 31, S. 185-200

Nakamae H., und Nakamura N., 1983: Effects of metabolic inhibitors on anthocyanin accumulation in petals of *Rosa*-Hybrid cultivar 'Eshigasa'. *Plant Cell Physiol.* 24, S. 995-1002

Norelli J.L., Aldwinckle H.S. und Beer S.V., 1984: Differential host x pathogen interactions among cultivars of apple and strains of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* 74, S. 136-139

Norelli J.L., Aldwinckle H.S. und Beer S.V., 1986: Differential susceptibility of *Malus* spp. cultivars Robusta 5, Novole, and Ottawa 523 to *Erwinia amylovora*. *Plant Disease* 70, S. 1017-1019

Oba K., Conn E.E., Canut H. und Boudet A.M., 1981: Subcellular localization of 2- β -D-glucosyloxy cinnamic acids and the related β -glucosidase in leaves of *Melilotus alba* cultivar 'Spanish'. *Plant Physiol.* 68, S. 1359-1363

Öschlager C., 2002: Isolierung und Identifizierung von Catechinen und Procyanidinen aus *Sorbus domestica*-Früchten. Diplomarbeit, Fachgebiet Obstbau, TU München-Weihenstephan

Österreicher J., 2003: Regalis[®], ein neuer Wachstumsregulator für den Apfelanbau. *Obstbau-Weinbau* 4, S. 101-103

Oleszek W., Amiot M.J. und Aubert S.Y., 1994: Identification of some phenolics in pear fruit. *J. Agric. Food Chem.* 42, S. 1261-1265

Paulin J.P., Lachaud G. und Lespinasse Y., 1993: Role of aggressiveness of strains of *Erwinia amylovora* in the experimental evaluation of susceptibility of apple cultivars to fire blight. *Acta Hort.* 338, S. 375-376

Powell C.C. und Hildebrand D.C., 1970: Fire blight resistance in *Pyrus*: involvement of arbutin oxydation. *Phytopathology* 60, S. 337-340

Rademacher W., 1991: Inhibitors of gibberellin biosynthesis: Applications in agriculture and horticulture. In: Tahahaski N, Phinney B.O. und MacMillan J. (Hrsg.), Springer-Verlag, New York S. 296-310

Rademacher W., 2000: Growth Retardants: Effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. *Plant Mol. Biol.* 51, S. 501-531

Rademacher W. und Kober R., 2003: Efficient use of prohexadione-Ca in pome fruits. *Europ. J. Hort. Sci.* 68, S. 101-107

Rataboul P., Alibert G., Boller T. und Boudet A.M., 1985: Intracellular transport and vacuolar accumulation of o-coumaric acid glucoside in *Melilotus alba* mesophyll cell protoplasts. *Biochem. Biophys. Acta* 816, S 25-36

Risch B. und Herrmann K., 1988: Die Gehalte an Hydroxyzimtsäure-Verbindungen und Catechinen in Kern- und Steinobst. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 186, S. 225-230

Römmelt S., Plagge J., Treutter D., Gutmann M., Feucht W. und Zeller W., 1999a: Defence reaction of apple against fire blight: histological and biochemical studies. Acta Hort. 489, S. 335-336

Römmelt S., Treutter D., Speakman J.B. und Rademacher W., 1999b: Effects of prohexadione-Ca on the flavonoid metabolism of apple with respect to plant resistance against Fire Blight. Acta Hort. 489, S. 359-364

Römmelt S., Peterek S., Treutter D., Rademacher W., Speakman J.B., Andreotti C., Costa G., Sponza G., Tortoreto L., Bazzi C., Halbwirth H., Zimmermann N., Stich K. und Forkmann G., 2002: Alteration of phenylpropanoid biosynthesis of fruit trees as a tool for enhancement of fire blight resistance. Acta Hort. 590, S. 477-484

Römmelt S., 2002: Beteiligung phenolischer Verbindungen an der induzierten Resistenz von Apfel (*Malus domestica*) gegen Feuerbrand (*Erwinia amylovora*). Dissertation, Fachgebiet Obstbau, TU München-Weihenstephan

Römmelt S., Fischer T.C., Halbwirth H., Peterek S., Schlangen K., Speakman J.B., Treutter D., Forkmann G. und 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. of Hort. Sci., 68, S. 129-136

Römmelt S., Zimmermann N., Rademacher W. und Treutter D., 2003b: Formation of novel flavonoids in apple (*Malus x domestica*) treated with the 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase inhibitor prohexadione-Ca. Phytochemistry, 64, S. 709-716

Rosen H.R., 1935: The mode of penetration of pear and apple blossoms by the fire-blight pathogen. Science 81, S. 26

Rühmann S., Leser C., Bannert M. und Treutter D., 2002: Relationship between growth secondary metabolism, and resistance of apple. Plant biology, 4, S. 137-143

Rühmann S. und Treutter D., 2003: Effect of N-nutrition in apple on the response of its secondary metabolism to prohexadione-Ca treatment. *Europ. J. of Hort. Sci.*, 68, S. 152-159

Ryugo K., Okuse I. und Fujii Y., 1990: Correlation between fire blight resistance and phenolic levels in pears. *Acta Hort.* 273, S. 335-338

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

Scutoreanu P., Boon J.J., Claeys M.V.D., Doelen G., Ma Y.L. und Sabelis M.W., 1996: HPLC pattern and composition of leaf polyphenols in pear trees infested by *Psylla pyricola* and mechanically damaged. *Polyphenols 1996*, Bordeaux, July 15-18, INRA Editions, Paris 1998, S. 393-394

Scutoreanu P., Ma Y., Claeys M., Dommissse R. und Sabelis M.W., 1999: Induction of a p-coumaroyl trihydroxy triterpene acid in *Psylla*-infested and mechanically damaged pear trees. *Journal of Chemical Ecology* 25, S. 2177-2191

Schieber A., Keller P. und Carle R., 2001: Detemination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatography A* 910, S. 265-273

Schlangen K., 2003: Biochemische Untersuchungen zur Induzierten Resistenz gegenüber dem Erreger des Feuerbrandes bei Apfel und Birne durch Prohexadion-Calcium Behandlung. Dissertation, Institut für Verfahrenstechnik, Umwelttechnik und Technische Biowissenschaften, TU Wien

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

Schröder M., Baab G. und Zimmer J., 2003: Wuchsregulierung bei Apfel – Bioregulatoren. *Obstbau* 5, S. 250-254

Schroth M.N. und Hildebrand D.C., 1965: β -glucosidase in *Erwinia amylovora* and *Pseudomonas syringae*. *Phytopathology* 55, S. 31-33

Sierotzki H. und Gessler C., 1993: Flavan-3-ol content and the resistance of *Malus x domestica* to *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 42, S. 291-297

Smale B.C. und Keil H.L., 1966: A biochemical study of the intervarietal resistance of *Pyrus communis* to fire blight. *Phytochemistry* 5, S. 1113-1120

Snyder B.A. und Nicholson R.L. 1990: Synthesis of phytoalexins in sorghum as a site-specific response to fungal ingress. *Science* 248, S. 1637-1639

Spanos G.A. und Wrolstad R.E., 1990: Influence of variety, maturity, processing, and storage on the phenolic composition of pear juice. *J. Agric. Food Chem.* 38, S. 817-824

Spanos G.A. und Wrolstad R.E., 1992: Phenolics of apple, pear, and white grape juices and their changes with processing and storage – A Review. *J. Agric. Food Chem.* 40, S. 1478-1487

Steiner P.W., 2000: Integrated orchard and nursery management for the control of fire blight. In: Vanneste J.L. (Hrsg.), *Fire blight – The disease and its causative agent, Erwinia amylovora*. CABI Publishing, Wallingford, UK, S. 339-358

Stich K. und Forkmann G., 1988a: Biosynthesis of 3-deoxyanthocyanins with flower extracts from *Sinningia cardinalis*. *Phytochemistry* 27, S. 785-789

Stich K. und Forkmann G., 1988b: Studies on columbin biosynthesis with flower extracts from *Columnea hybrida*. *Zeitschrift für Naturforschung, C: Journal of Biosciences* 43, S. 311-314

Stockwell V.O., Sugar D., Spotts R., Johnson K.B. und Loper J.E., 1996: Recovery of streptomycin-resistant isolates of *Erwinia amylovora* from Oregon orchards. *Phytopathology* 86, S50

Strissel T., Halbwirth H., Stich K. und Treutter D., 2002: Effect of plant activators on biosynthesis and accumulation of flavonoids and scab resistance of apple leaves. Polyphenols 2002, Marrakesch-Marocco, September 9-12, INRA Editions, S. 83-84

Styles E.D. und Ceska O., 1972: Flavonoid pigments in genetic strains of maize. Phytochemistry 11, S. 3019-3021

Thompson R.S., Jacques D., Haslam E. und Tanner R.J.N., 1972: Plant proanthocyanidins. Part I. Introduction: the isolation, structure and distribution in nature of plant procyanidins. J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, S. 1387-1399

Thomson S.V., 2000: Epidemiology of fire blight. In: Vanneste J.L. (Hrsg.), Fire blight – The disease and its causative agent, *Erwinia amylovora*. CABI Publishing, Wallingford, UK, S. 9-36

Treutter D., 1985: Polyphenolmuster des Phloems der Veredelungsstelle im Hinblick auf Frühselektion verträglicher Pfropfkombinationen bei Kirschen. Dissertation, Institut für Obstbau, TU-München-Weihenstephan

Treutter D., 1989: Chemical reaction detection of catechins and proanthocyanidins with 4-dimethylaminocinnamaldehyde. J. Chromatography, 467, S. 185-193

Treutter D. und Feucht W., 1990a: The pattern of flavan-3-ols in relation to scab resistance of apple cultivars. J. Hort. Science, 65, S. 511-517

Treutter D. und Feucht W., 1990b: Accumulation of flavan-3-ols in fungus-infected leaves of Rosaceae. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz, 97, S. 634-641

Treutter D., 1991: Eine Studie über die Analytik, das Vorkommen und die pflanzenphysiologische, phytopathologische und ernährungsphysiologische Bedeutung der kondensierten Tannine und ihrer monomeren Vorstufen. Habilitationsschrift, Lehrstuhl für Obstbau, TU-München-Weihenstephan

-
- Treutter D., Santos-Buelga C., Gutmann M. und Kolodziej H., 1994: Identification of flavan-3-ols and procyanidins by high performance liquid chromatography and chemical reaction detection. *J. Chromatography A*, 667, S. 290-297
- Treutter D., 2001: Biosynthesis of phenolic compounds and its regulation in apple. *Plant Growth Regulation* 34, S. 71-89
- Van der Zwet T. und Keil H.L., 1979: Fire blight – a bacterial disease of rosaceous plants. United States Department of Agriculture Handbook 510, Washington DC
- Van der Zwet T. Bell R.L. und Blake R.C., 1984: Comparative evaluation of the degree of fire blight resistance in various pear cultivars and selections. *Acta Hort.* 151, S. 267-275
- Van der Zwet T., 2002: Present worldwide distribution of fire blight. *Acta Hort.* 590, S. 33-34
- Vanneste J.L., 2000: What is fire blight? Who is *Erwinia amylovora*? How to control it? In: Vanneste J.L. (Hrsg.), Fire blight – The disease and its causative agent, *Erwinia amylovora*. CABI Publishing, Wallingford, UK, S. 1-6
- Vanneste J.L. und Eden-Green S., 2000: Migration of *Erwinia amylovora* in host plant tissues. In: Vanneste J.L. (Hrsg.), Fire blight – The disease and its causative agent, *Erwinia amylovora*. CABI Publishing, Wallingford, UK, S. 73-83
- Wald B., Wray V., Galensa R. und Herrmann K., 1989: Malonated flavonol glycosides and 3,5-dicaffeoylquinic acid from pears. *Phytochemistry* 28/2, S. 663-664
- Wald B. und Galensa R., 1989: Nachweis von Fruchtsaftmanipulationen. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 188, S. 107-114
- Watzl B. und Leitzmann C., 1995: Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln. Stuttgart
- Wharton P.S. und Nicholson R.L., 2000: Temporal synthesis and radiolabelling of the sorghum 3-deoxyanthocyanidin phytoalexins and the anthocyanin, cyanidin 3-dimalonyl glucoside. *New Phytol.* 145, S. 457-469

Williams A.H., 1960: The distribution of phenolic compounds in apple and pear trees. In: Pridham J.B. (Hrsg.): Phenolics in plants in health and disease. Pergamon press, Oxford, S. 3-7

Xie D.Y., Shashi B.S. und Dixon R.A., 2004: Anthocyanidin reductases from *Medicago truncatula* and *Arabidopsis thaliana*. Archives of Biochemistry and Biophysics 422, S. 91-102

Yoder K.S., Miller S.S. und Byers R.E., 1999: Suppression of fireblight in apple shoots by prohexadione-calcium following experimental and natural inoculation. HortScience 34, S. 1202-1204

Zeller W. und Brulez W. 1987: Changes in phenol metabolism of ornamental shrubs (Cotoneaster species) infected with *Erwinia amylovora*. Proc. 6th Intern. Conf. Plant Path. Bact., Beltsville, Maryland, USA, S. 686-694

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Dieter Treutter für die Ermöglichung dieser Arbeit im Rahmen des EU-Projektes, sein großes Vertrauen bei der selbständigen Bearbeitung des Themas, für die offene Tür bei allen Fragen, für seine Geduld, wenn die Schreibarbeiten mal etwas länger dauerten und für die interessante und angenehme Zusammenarbeit.

Bei Prof. Dr. Walter Feucht möchte ich mich für die vielen interessanten Gespräche (z.B. bei den „Wochenenddiensten“) und die regelmäßigen Nachfragen „Und wie geht´s...“ bedanken.

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich bei Marlene Kramler für ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft und für die zahlreichen Tipps, Anregungen und Lösungen bei allen technischen, biochemischen und sonstigen Schwierigkeiten.

Besonders herzlich bedanken möchte ich mich bei meinem Zimmerkollegen und sehr guten Freund Max Mornau, für sein „offenes Ohr“ bei allen fachlichen und persönlichen, bei allen kleinen und großen Fragen und Problemen, für seinen Humor und für so manche Gesangseinlage und Philosophiestunde.

Ein großes Dankeschön auch an Carolin Ölschläger, Christof Leser, Iva Puhl, Susanne Rühmann und Thorsten Strissel für die gute Zusammenarbeit und die ausgezeichnete Atmosphäre sowie die gemeinsamen Freizeitaktivitäten wie Feiern, Kochen, Konzerte, Surfen und Weinabende...

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei Inge Lemberger für die vielen persönlichen Gespräche und für die Hilfe bei organisatorischen Formularen und Anträgen, bei Rita Wimmer für ihre tatkräftige und zuverlässige Unterstützung bei der Extraktion meiner Unmengen an Birnenproben, bei Anja Härter für die „Pflege“ der *in-vitro*-Birnenpflänzchen und bei dem gesamten Team des Versuchsfeldes für die Kultivierung der vielen Versuchspflanzen.

Herrn Helm und Herrn Sturm vom Institut für Baumschule der Fachhochschule Weihenstephan danke ich für die Bereitstellung von Pflanzenmaterial aus ihrem Versuchsfeld und Herrn Dr. Kreckl danke ich für die Möglichkeit der Nutzung der Gewächshauskammern.

Ein ganz besonderer Dank geht an alle Projektpartner, Prof. Dr. Stich, Prof. Dr. Forkmann, Prof. Dr. Costa, Prof. Dr. Bazzi und Dr. Rademacher und deren Mitarbeiter. Ganz herzlich möchte ich mich dabei zusätzlich bei Karin Schlangen für die „Nutzung“ ihrer biochemischen Analyseergebnissen zu den Untersuchungen aus Kap. 3.2.2 bedanken. Für die herzliche Aufnahme als „Costavarin“ bei meinem Aufenthalt in Bologna möchte ich mich ganz besonders bei Prof. Dr. Costa und seinem Team bedanken.

Bei Ninni, Jens, Liesi, Maren, Matthias, Manuela, Birgit, Sigrid und Hans und ganz besonders bei Chris und Georg bedanke ich mich für die Freundschaft, für die unzähligen Gespräche, für das „Hängen-Lassen“ und für die schöne gemeinsame Zeit.

Zum Schluss möchte ich mich ganz besonders herzlich bei meinen Eltern und bei meiner Schwester Nine für den Rückhalt in meinen Hoch- und Tiefphasen, für das Zuhören bei allen großen und kleinen Anliegen und vor allem für das Gefühl, dass sie an mich und meine Fähigkeiten glauben, bedanken.

Lebenslauf

Name	Peterek
Vorname	Silke
Geburtsdatum	11.05.1973
Geburtsort	Nördlingen
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Wohnort	Am Wörth 14 85354 Freising

Schulausbildung:

1979 – 1984:	Volksschule `An der Friedenstrasse´, Ottobrunn
1984 – 1994:	Gymnasium der Armen Schulschwestern, München
1994:	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Berufsausbildung:

11/94 – 04/00:	Studium der Gartenbauwissenschaften TU-München-Weihenstephan
Studienbegleitende Praktika:	Botanischer Garten, München Gärtnerei Berchtenbreiter, München Firma Neudorff, Emmerthal
Diplomarbeit:	„Möglichkeiten der Feuerbrandbekämpfung im Streuobst“
04/00:	Abschluss: Diplom (Dipl.-Ing. agr. Univ.)

Dissertation ab Mai 2000 am Fachgebiet Obstbau, TU-München-Weihenstephan im Rahmen des EU-Projektes: „Induction of pathogen resistance in fruit trees by transiently altering the flavonoid metabolism with specific enzyme inhibitors“