

Technische Universität München-Weihenstephan  
Department für Pflanzenwissenschaften  
Fachgebiet Obstbau

## **Induktion von Sekundärstoffen in *Vitis vinifera* Kalluskulturen durch Hefe-Elicitoren**

**Susanne Rühmann**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr.agr. Kurt-Jürgen Hülsbergen

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr.agr., Dr.agr.habil. Dieter R. Treutter
2. Univ.-Prof. Dr.rer.nat., Dr.rer.nat.habil. Gert Forkmann

Die Dissertation wurde am 13.05.2005 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 08.09.2005 angenommen.



## Danksagung

Da man bei der Erstellung einer Doktorarbeit auf Unterstützung, Vertrauen und Verständnis angewiesen ist, möchte ich mich an dieser Stelle bei allen herzlich bedanken, die bei der Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Dieter Treutter bedanke ich mich besonders für sein großes Vertrauen, die Unterstützung meiner Arbeit, hilfreiche Anregungen zu Forschungsfragen und seine große Toleranz für spezielle Lebensumstände, ohne die diese Arbeit nie zustande gekommen wäre.

Ein herzlicher Dank geht auch an Prof. Dr. W. Feucht, der immer ein offenes Ohr für Fragen hatte und mich so in an seinem großen Erfahrungsschatz teilhaben ließ.

Marlene Kramler danke ich tausendmal für ihre unendliche Geduld, ihren unermüdlichen Einsatz und ihre Einarbeitung in Techniken meiner experimentellen Arbeit.

Ein ebenso herzlicher Dank geht an Anja Härter, die mich in vielen Arbeiten unterstützte und ohne die meine Arbeit sicher nicht zu diesem Zeitpunkt fertig geworden wäre.

Ein großes Dankeschön gebührt aber auch allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Lehrstuhls, die mich in meinen Höhen und Tiefen begleitet, mich immer unterstützt und fortwährend durch fachliche Gespräche in meiner Arbeit inspiriert haben. Vielen Dank für das tolle Arbeitsklima, was ausschlaggebend zu meiner Motivation beigetragen hat.

Dankeschön an Inge Lemberger für ihre unermüdliche Bestärkung und Unterstützung in allen Fragen, die sich ergaben, Christof Leser für seine unermüdliche Hilfsbereitschaft bei vielen Problemen, besonders bei computertechnischen, Rita Wimmer für die ausdauernde Hilfe bei der Bewältigung von Extraktionen. Danke für Eure Aufgeschlossenheit auch an Iva, Carolin, Silke, Thorsten und Max.

Herzlichen Dank schulde ich meinen Eltern Regina und Hartwig Gundermann, die mich immer in meinem Forscherdrang unterstützt haben und mir zugetraut haben, meinen Weg zu gehen, sowie meinen Schwestern Ina und Anna, die mich immer dazu angehalten haben, diese Arbeit fertigzustellen.

Vielen Dank auch an meine Freundin Sybille Michaelis, die unermüdlich Korrektur gelesen und mich in der Endphase angehalten hat, auch kleinen Unregelmäßigkeiten in der Arbeit Bedeutung beizumessen. Ferner bedanke ich mich bei ihr und meinen anderen Freundinnen

für die fortwährende Treue unserer Freundschaft und Verständnis, auch wenn ich für einen geraumen Zeitraum abgetaucht war.

Schließlich, doch nicht zuletzt, danke ich meinem Lebenspartner Albrecht Steger für sein Verständnis, seinen Glauben an meine Fähigkeiten und sein Appell an mein Durchhaltevermögen sowie meinen Kindern für ihr geduldiges Ertragen meiner Abwesenheit für viele Stunden, Verzicht auf gemeinsame Aktivitäten und liebevolles Verständnis besonders für die Tiefen dieser Zeit.

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1</b>	<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>IDENTIFIZIERUNG PHENOLISCHER VERBINDUNGEN VON <i>VITIS VINIFERA</i> KALLUS .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1</b>	<b>Literaturübersicht .....</b>	<b>2</b>
2.1.1	Phenolische Verbindungen allgemein .....	2
2.1.2	Catechine und Proanthocyanidine .....	2
2.1.3	Anthocyane .....	3
2.1.4	Hydroxyzimtsäuren .....	5
2.1.5	Resveratrol und Resveratrol-Derivate .....	7
2.1.5.1	Vorkommen in der Rebe .....	9
2.1.5.2	Stilbeninduktion .....	9
2.1.5.3	Fungizide Wirkung .....	13
<b>2.2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>14</b>
2.2.1	Extraktion der Polyphenole aus Weinkallus .....	14
2.2.2	HPLC und Diodenarray zur Bestimmung der Polyphenole .....	14
2.2.3	Quantitative Auswertung .....	16
2.2.4	Fraktionierung von phenolischen Verbindungen von Weinkallus .....	17
2.2.5	Dünnschichtchromatographische Untersuchungen .....	17
2.2.6	Co-Chromatographie .....	18
2.2.7	Enzymatische Hydrolyse .....	18
<b>2.3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>20</b>
2.3.1	Charakterisierung von konstitutiven, phenolischen Verbindungen .....	20
2.3.1.1	Flavanole .....	20
2.3.1.2	Benzoessäuren .....	21
2.3.1.3	Resveratrol-Derivate .....	21
2.3.1.4	Flavonole .....	26
2.3.1.5	Anthocyane .....	26
2.3.2	Charakterisierung von induzierten phenolischen Verbindungen .....	26
<b>2.4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>30</b>
2.4.1	Catechine .....	30
2.4.2	Hydroxyzimtsäuren .....	30
2.4.3	Anthocyane .....	31
2.4.4	Stilbene .....	31
2.4.4.1	Monomere Resveratrol-Derivate .....	31
2.4.4.2	Oligomere Resveratrol-Derivate .....	32
<b>3</b>	<b>INDUKTION DES PHENYLPROPANOIDSTOFFWECHELS DURCH ELICITATION .....</b>	<b>40</b>
<b>3.1.</b>	<b>Literaturübersicht .....</b>	<b>40</b>
3.1.1	Resistenzmechanismen .....	40
3.1.2	Phenylpropanoide als potentielle Abwehrstoffe .....	41
3.1.3	Elicitoren des Phenylpropanoidstoffwechsels .....	41
3.1.3.1	Exogene Elicitoren .....	41
3.1.3.2	Elicitorerkennung .....	42
3.1.3.3	Reaktionen von Pflanzen auf eine Elicitation .....	43
3.1.3.4	Akkumulation von Phenolen als Abwehrreaktion .....	46
3.1.4	Mikroorganismen als Gegenspieler von Pathogenen .....	47

3.1.4.1	Hefen als Bioregulatoren .....	47
3.1.4.2	<i>Cryptococcus laurentii</i> .....	48
3.1.4.3	<i>Aureobasidium pullulans</i> [de Bary] (Arnaud 1910) .....	52
3.1.5	Antagonistische Wirkmechanismen von Hefen.....	53
3.1.5.1	Wirkmechanismen bei Nacherntebehandlungen .....	53
3.1.5.2	Toxin-Synthese von Hefen .....	57
3.1.5.3	Synergistische Effekte von Hefen und Fungiziden .....	57
3.1.6	Kalluskulturen als Modellsystem .....	57
3.1.7	Weinsorten „Nero“ und „Regent“ .....	58
<b>3.2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>60</b>
3.2.1	In vitro Kultivierung und Vermehrung der Hefeisolate .....	60
3.2.2	Weinkalluskulturen.....	60
3.2.3	Induktionsversuche .....	61
3.2.3.1	Kultivierung der Hefe.....	62
3.2.3.2	Elicitation mit einzelnen Hefestämmen .....	62
3.2.3.3	Elicitation mit einer Mischsuspension .....	62
3.2.3.4	Elicitation mit verschiedenen aufbereiteten Mischsuspension.....	63
3.2.3.5	Probenahme .....	63
3.2.3.6	Inokulation mit <i>Botrytis cinerea</i> .....	64
3.2.3.7	Stoffgruppenzuordnung.....	64
<b>3.3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>66</b>
3.3.1	Identifikation der Hefestämme nach physiologischen Testverfahren .....	66
3.3.2	28S-rDNA-Teilsequenzierung.....	67
3.3.3	Versuchsaufstellung zur Induktion von Kalluskulturen .....	67
3.3.4	Kallusgewicht der Versuche.....	67
3.3.5	Gesamtgehalt der Phenylpropanoide .....	70
3.3.6	Catechine .....	71
3.3.7	Einfache Phenole und Verbindungen der Stoffgruppe Spektrum 2.....	72
3.3.8	Benzoensäuren und Hydroxyzimtsäuren .....	74
3.3.9	Flavonole.....	74
3.3.10	Anthocyane.....	79
3.3.11	Resveratrol-Derivate.....	79
3.3.11.1	monomere Resveratrol-Derivate .....	79
3.3.11.2	Pallidol-Derivate .....	83
3.3.11.3	Oligomere Resveratrol-Derivate.....	91
3.3.12	Einfluss der Elicitorkonzentration auf die Akkumulation von Polyphenolen .....	96
3.3.12.1	Summen verschiedener Stoffklassen.....	96
3.3.12.2	Catechine .....	99
3.3.12.3	Einfache Phenole.....	100
3.3.12.4	Benzoensäuren.....	101
3.3.12.5	Flavonole .....	103
3.3.12.6	Anthocyane .....	103
3.3.12.7	Monomere Resveratrol-Derivate .....	104
3.3.12.8	Pallidol-Derivat.....	106
3.3.12.9	Oligomere Resveratrol-Derivate.....	108
3.3.13	Einfluss unterschiedlicher Hefestämme von <i>Aureobasidium pullulans</i> auf das Induktionsverhalten von Phenylpropanoiden.....	111
3.3.13.1	Gesamtgehalt an Phenylpropanoiden und Catechine.....	111
3.3.13.2	Einfache Phenole und Spektrum 2.....	112
3.3.13.3	Phenolische Säuren .....	112
3.3.13.4	Flavonole .....	113
3.3.13.5	Anthocyane .....	113
3.3.13.6	Resveratrol-Derivate .....	114
3.3.13.7	Pallidol-Derivate .....	115

3.3.13.8	Oligomere Resveratrol-Derivate.....	117
3.3.14	Stoffgruppenverteilung gegenüber dem Gesamtgehalt .....	117
3.3.15	Einfluss der Stickstoffverfügbarkeit auf die Biomassenproduktion von Weinkalli .....	123
3.3.16	Einfluss der Stickstoffverfügbarkeit auf den Phenylpropanoid-Stoffwechsel von Weinkalli .....	124
3.3.16.1	Gesamtgehalt der Phenylpropanoide .....	124
3.3.16.2	Catechine .....	125
3.3.16.3	Einfache Phenole und Verbindungen der Stoffgruppe Spektrum 2 .....	126
3.3.16.4	Hydroxyzimtsäuren und Benzoesäuren .....	129
3.3.16.5	Flavonole .....	129
3.3.16.6	Anthocyane .....	130
3.3.16.7	Resveratrol-Derivate .....	130
3.3.17	Einfluss der Stickstoffverfügbarkeit auf den pH-Wert der Kulturmedien.....	133
3.3.18	Einfluss von verschiedenen Hefekomponenten als Elicitor auf Weinkallus.....	134
3.3.1	Inokulation mit <i>Botrytis cinerea</i> .....	137
<b>3.4</b>	<b>DISKUSSION DER INDUKTIONSVERSUCHE.....</b>	<b>142</b>
3.4.1	Identifikation der Hefeisolate .....	142
3.4.2	Verwendung von Kalluskulturen als Versuchsmodell .....	142
3.4.2.1	Kulturmedium.....	143
3.4.2.2	Verbräunung von Kallusgewebe.....	143
3.4.3	Induktion der Phenylpropanoide.....	145
3.4.3.1	Konzentrationsunterschiede zwischen den Versuchen.....	145
3.4.3.2	Dynamik der Akkumulation der Phenylpropanoide.....	145
3.4.3.3	Catechine .....	148
3.4.3.4	Hydroxyzimtsäure-Derivate und Benzoesäuren .....	149
3.4.3.5	Einfache Phenole und Spektrum 2 .....	150
3.4.3.6	Monomere Resveratrol-Derivate .....	150
3.4.3.7	Oligomere Resveratrol-Derivate .....	151
3.4.3.8	Anthocyane .....	152
3.4.4	Einfluss der Elicitorkonzentration auf den Phenylpropanoidstoffwechsel .....	153
3.4.4.1	Akkumulationsdynamik von Resveratrol und dessen Derivate .....	154
3.4.4.2	Resveratrolakkumulation in Abhängigkeit von der Elicitorkonzentration .....	155
3.4.5	Einfluss des Hefestammes auf die Phenylpropanoid-Akkumulation.....	157
3.4.6	Einfluss von Stickstoff auf die Weinkalli .....	158
3.4.6.1	Die Stickstoffform als Einflussfaktor auf den Primärstoffwechsel .....	158
3.4.6.2	Stickstoffkonzentration als Einflussfaktor auf den Primärstoffwechsel .....	159
3.4.6.3	Stickstoffkonzentration als Einflussfaktor auf den Sekundärstoffwechsel.....	159
3.4.6.4	Stickstoff als Induktor von Stressmetaboliten.....	160
3.4.6.5	Einfluss der Stickstoffverfügbarkeit auf die Elicitierbarkeit von Weinkallus durch <i>Aureobasidium pullulans</i> -Kulturfiltrat .....	163
3.4.7	Einfluss von verschiedenen Hefekomponenten als Elicitor auf Weinkallus.....	168
<b>4</b>	<b>GESAMTDISKUSSION.....</b>	<b>169</b>
4.1	<b>Kalluskulturen als Modellsystem und ihre Übertragbarkeit auf Pflanze .....</b>	<b>169</b>
4.2	<b>Hefen als Elicitor.....</b>	<b>170</b>
4.3	<b>Elicitorkonzentration als Einflussgröße auf den Sekundärstoffwechsel .....</b>	<b>172</b>
4.3.1	Einfluss auf die Ausrichtung des Stoffwechsel .....	172
4.3.2	Einfluss auf die Synthesegeschwindigkeit.....	172
4.3.4	Suppressoren als Minderer der Elicitorerkennung.....	173
4.3.5	Einfluss auf die Signalübertragungen .....	173

---

<b>4.4</b>	<b>Wirkungen von <i>Hefe-Filtrat</i> auf das Resistenzpotential von Weinkallus.....</b>	<b>174</b>
4.4.1	Auswirkungen auf den Sekundärstoffwechsel .....	174
4.4.2	Resveratrol-Derivate als Phytoalexine.....	174
4.4.2.1	Nachweis der Resveratrol-Wirksamkeit mittels Transformationen .....	177
4.4.3	Fungizide Wirkungen weiterer Flavonoide .....	177
4.4.4	Hemmung des Infektionsverlaufs von <i>Botrytis cinerea</i> durch Hefefiltrat .....	178
<b>4.5</b>	<b>Stickstoff als weitere Einflussgröße auf den Sekundärstoffwechsel .....</b>	<b>179</b>
<b>4.5</b>	<b>Ausblicke.....</b>	<b>180</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>182</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>185</b>
	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>207</b>



## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Strukturen von Catechinen .....	3
Abbildung 2:	Strukturen von Anthocyanen .....	3
Abbildung 3:	Strukturen von Hydroxyzimtsäuren und Gallussäure .....	7
Abbildung 4:	Strukturen von cis- und trans-Resveratrol-Derivaten .....	8
Abbildung 5:	Dimerisation von Resveratrol .....	8
Abbildung 6:	Die Resveratrol-Dimere $\epsilon$ -Viniferin und $\delta$ -Viniferin .....	9
Abbildung 7:	Biosynthese von Stilbenen und Chalkonen nach STOESSL 1982 .....	10
Abbildung 8:	Berechnungsformel für die Stoff-Konzentration .....	16
Abbildung 9:	Flavanolmuster von Weinkalli der Sorte „Regent“ (UV-Detektion bei 640 nm nach Derivatisierung mit DMAZA) .....	20
Abbildung 10:	Phenolmuster von Weinkalli der Sorte „Regent“ (UV-Detektion bei 280 nm) .....	22
Abbildung 11:	UV-Spektren verschiedener Verbindungen aus Weinkallus .....	24
Abbildung 12:	UV-Spektren von Peak XX und Peak YY .....	25
Abbildung 13:	UV-Spektrum von Peak DD .....	27
Abbildung 14:	Phenolmuster von Weinkallus „Regent“ 24 Stunden nach einer Elicitation mit Aureobasidium pullulans Kulturfiltrat (UV-Detektion bei 280 nm) .....	27
Abbildung 15:	UV-Spektrum von Peak KK .....	28
Abbildung 16:	UV-Spektrum von Peak OO .....	28
Abbildung 17:	UV-Spektrum von Peak QQ .....	29
Abbildung 18:	UV-Spektrum von Peak RR .....	28
Abbildung 19:	UV-Spektrum von Peak TT .....	29
Abbildung 20:	UV-Spektrum von Peak VV .....	29
Abbildung 21:	UV-Spektrum von Peak WW .....	29
Abbildung 22:	UV-Spektren methanolischer Extrakte von Peak DD verglichen mit Catechin und Pallidol .....	33
Abbildung 23:	UV-Spektren methanolischer Extrakte von Peak RR verglichen mit trans- $\delta$ -Viniferin .....	35
Abbildung 24:	UV-Spektren methanolischer Extrakte von Peak WW verglichen mit trans- $\delta$ -Viniferin .....	35
Abbildung 25:	Vergleich von Resveratrol-derivat-Abfolgen aus der Literatur und den identifizierten Verbindungen .....	37
Abbildung 26:	Wechselwirkungen einiger von Pathogenen ausgeschiedener Enzyme, deren Wirkung auf die Pflanzenzelle und die daraus resultierenden Wechselreaktionen zwischen beiden. ....	45

Abbildung 27: Aureobasidium pullulans auf Kulturplatte. ....	52
Abbildung 28: Aureobasidium pullulans Hyphen und Sporen. (Enius AG 2005).....	52
Abbildung 29: Frischgewicht der unbehandelten Kontrollvariante, 5 und 50% mit Hefefiltrat behandelten Kalli gewachsen auf N1-Medium nach verschiedenen Entnahmeterminen. ....	69
Abbildung 30: Gesamtphenolgehalt von unbehandelten im Vergleich zu mit Hefefiltrat elicitierten Weinkalli A: Versuch 1 („Regent“) B: Versuch 3 („Regent“) C: Versuche 2 („Regent“) und Versuch 4 („Nero“) .....	70
Abbildung 31: Catechine von unbehandelten im Vergleich zu mit Hefefiltrat elicitierten Weinkalli zu verschiedenen Entnahmeterminen. A: Versuch 1 („Regent“) ....	71
Abbildung 32: einfache Phenole und Verbindungen der Stoffgruppe Spektrum 2; Versuch 1: unbehandelte und mit Hefefiltrat elicitierte Weinkalli („Regent“), Versuch 3 („Regent“) , Versuch 2 („Regent“) und Versuch 4 („Nero“) .....	73
Abbildung 33: Hydroxyzimtsäuren und Benzoessäuren Versuch 1: unbehandelte und mit Hefefiltrat elicitierte Weinkalli („Regent“); Versuch 3 („Regent“), Versuch 2 („Regent“) und Versuch 4 („Nero“) . ....	75
Abbildung 34: Flavonole von unbehandelten im Vergleich zu mit Hefefiltrat elicitierten Weinkalli („Regent“) aus Versuch 1.....	76
Abbildung 35: Flavonol T2 von unbehandelten im Vergleich zu mit Hefefiltrat elicitierten Weinkalli (Versuch 3) .....	76
Abbildung 36: Anthocyan BB und Anthocyan II; Versuch 1: unbehandelte und mit Hefefiltrat elicitierte Weinkalli („Regent“); Versuch 3 („Regent“), Versuch 2 („Regent“) .....	78
Abbildung 37: trans-Resveratrol-Gehalte von unbehandelten verglichen mit elicitierten Weinkalli. Versuch 1 („Regent“), Versuch 3 („Regent“), Versuch 2 („Regent“) und Versuch 4 („Nero“) .....	80
Abbildung 38: trans-Piceid und cis-Piceid, Versuch 1: unbehandelte und mit Hefefiltrat elicitierte Weinkalli („Regent“); Versuch 3 („Regent“), Versuch 2 („Regent“) und Versuch 4 („Nero“) .....	81
Abbildung 39: monomere Resveratrol-Derivate von unbehandelten im Vergleich zu mit Hefefiltrat elicitierten Weinkalli („Regent“) aus Versuch 1 .....	84
Abbildung 40: Summe der Pallidol-Derivate von unbehandelten im Vergleich zu mit Hefefiltrat elicitierten Weinkalli. Versuch 1 („Regent“), Versuch 3 („Regent“), Versuch 2 („Regent“) und Versuch 4 („Nero“) .....	86
Abbildung 41: Pallidol-Derivate von unbehandelten im Vergleich zu mit Hefefiltrat elicitierten Weinkalli („Regent“) aus Versuch 1.....	87

Abbildung 42: oligomere-trans-Resveratrol-Derivate von unbehandelten im Vergleich zu mit Hefefiltrat elicitierten Weinkalli („Regent“) aus Versuch 1 .....	89
Abbildung 43: oligomere-cis-Resveratrol-Derivate von unbehandelten im Vergleich zu mit Hefefiltrat elicitierten Weinkalli („Regent“) aus Versuch 1 .....	91
Abbildung 44: oligomere trans/cis-Resveratrol-Derivate von unbehandelten im Vergleich zu mit Hefefiltrat elicitierten Weinkalli („Regent“) aus Versuch 1 .....	94
Abbildung 45: Summen verschiedener Stoffgruppen von unbehandelten und mit zwei verschiedenen Konzentrationen Hefefiltrat (5% und 50%) elicitierten Weinkalli der Sorte „Regent“ 48 Stunden nach der Behandlung (Versuch 1). .....	97
Abbildung 46: Gesamtgehalte der Polyphenole und Summen verschiedener Stoffgruppen von unbehandelten und mit zwei verschiedenen Konzentrationen Hefefiltrat (5% und 50%) elicitierten Weinkalli der Sorte „Regent“ zu verschiedenen Entnahmeterminen (Versuch 1). .....	98
Abbildung 48: einfache Phenole A und T0 sowie Peak I von unbehandelten und mit zwei verschiedenen Konzentrationen Hefefiltrat (5% und 50%) elicitierten Weinkalli (Versuch 1) .....	100
Abbildung 49: Gallussäure-Derivat Peak B und die Summe aller Catechine von unbehandelten und mit zwei verschiedenen Konzentrationen Hefefiltrat (5% und 50%) elicitierten Weinkalli der Sorte „Regent“ zu verschiedenen Entnahmeterminen (Versuch 1) .....	101
Abbildung 50: Peak L, ein p-Cumarsäure-Derivat und das Kaffeesäure-Derivat AA von unbehandelten und mit zwei verschiedenen Konzentrationen Hefefiltrat (5% und 50%) elicitierten Weinkalli der Sorte „Regent“ zu verschiedenen Entnahmeterminen (Versuch 1) .....	102
Abbildung 51: Protocatechusäure Peak C und Vanillinsäure Peak M von unbehandelten und mit zwei verschiedenen Konzentrationen Hefefiltrat (5% und 50%) elicitierten Weinkalli der Sorte „Regent“ zu verschiedenen Entnahmeterminen (Versuch 1).....	103
Abbildung 52: Flavonole T2 und HH und Anthocyane BB und II von unbehandelten und mit zwei verschiedenen Konzentrationen Hefefiltrat (5% und 50%) elicitierten Weinkalli der Sorte „Regent“ zu verschiedenen Entnahmeterminen (Versuch 1).....	104
Abbildung 53: Verschiedenen monomere Resveratrol-Derivate von unbehandelten und mit zwei verschiedenen Konzentrationen Hefefiltrat (5% und 50%) elicitierten Weinkalli der Sorte „Regent“ zu verschiedenen Entnahmeterminen (Versuch 1).....	105

Abbildung 54: monomeres trans-Resveratrol-Derivat X von unbehandelten und mit zwei verschiedenen Konzentrationen Hefefiltrat (5% und 50%) elicitierten Weinkalli (Versuch 1).....	106
Abbildung 55: Pallidol-Derivat O, P, DD, DD1, R sowie CC von unbehandelten und mit zwei verschiedenen Konzentrationen Hefefiltrat (5% und 50%) elicitierten Weinkalli der Sorte „Regent“ zu verschiedenen Entnahmeterminen (Versuch 1) .....	107
Abbildung 56: oligomere trans-Resveratrol-Derivate Peak RR, VV und WW von unbehandelten und mit zwei verschiedenen Konzentrationen Hefefiltrat (5% und 50%) elicitierten Weinkalli der Sorte „Regent“ zu verschiedenen Entnahmeterminen (Versuch 1) .....	109
Abbildung 57: Gesamtgehalte an Phenylpropanoiden ohne Catechine und die Catechingehalte von unbehandelten und mit verschiedenen Hefeisolaten (S4, S 3.2, 10/8, 10/3) elicitierten Weinkalli der Sorte „Regent“ zu verschiedenen Entnahmeterminen (Versuch 3) .....	111
Abbildung 58: Gallussäure-Derivat Peak B und p-Cumarsäure-Derivat Peak L von unbehandelten und mit verschiedenen Hefeisolaten (S4, S 3.2, 10/8, 10/3) elicitierten Weinkalli der Sorte „Regent“ zu verschiedenen Entnahmeterminen (Versuch 3).....	113
Abbildung 59: Gehalte an dem Flavonol T2 und der Anthocyane (BB+II) von unbehandelten und mit verschiedenen Hefeisolaten (S4, S 3.2, 10/8, 10/3) elicitierten Weinkalli der Sorte „Regent“ zu verschiedenen Entnahmeterminen (Versuch 3).....	114
Abbildung 60: Gehalte an monomeren trans- und cis-Resveratrol-Derivaten von unbehandelten und mit verschiedenen Hefeisolaten (S4, S 3.2, 10/8, 10/3) elicitierten Weinkalli der Sorte „Regent“ zu verschiedenen Entnahmeterminen (Versuch 3).....	115
Abbildung 61: Gehalte an monomeren trans- und cis-Resveratrol-Derivaten von unbehandelten und mit verschiedenen Hefeisolaten (S4, S 3.2, 10/8, 10/3) elicitierten Weinkalli der Sorte „Regent“ zu verschiedenen Entnahmeterminen (Versuch 3).....	116
Abbildung 62: Gehalte an Pallidol-Derivaten und der Pallidol-ähnlichen Verbindung CC von unbehandelten und mit verschiedenen Hefeisolaten (S4, S 3.2, 10/8, 10/3) elicitierten Weinkalli der Sorte „Regent“ zu verschiedenen Entnahmeterminen (Versuch 3).....	116

- Abbildung 63: Gehalte oligomerer trans- und cis- sowie nicht zu trennende Mischvarianten beider isomeren Resveratrol-Derivate von unbehandelten und mit verschiedenen Hefeisolaten (S4, S 3.2, 10/8, 10/3) elicitierten Weinkalli der Sorte „Regent“ zu verschiedenen Entnahmetermeninen (Versuch 3)..... 118
- Abbildung 64: Stoffgruppenverteilung 5 Stunden nach der Behandlung von unbehandelten und mit verschiedenen Hefeisolaten (S4, S 3.2, 10/8, 10/3) elicitierten Weinkalli der Sorte „Regent“ (Versuch 3) ..... 119
- Abbildung 65: Stoffgruppenverteilung 10 Stunden nach der Behandlung von unbehandelten und mit verschiedenen Hefeisolaten (S4, S 3.2, 10/8, 10/3) elicitierten Weinkalli der Sorte „Regent“ (Versuch 3). ..... 120
- Abbildung 66: Stoffgruppenverteilung 10 Stunden nach der Behandlung von unbehandelten und mit verschiedenen Hefeisolaten (S4, S 3.2, 10/8, 10/3) elicitierten Weinkalli der Sorte „Regent“ (Versuch 3)..... 121
- Abbildung 67: Frischgewichtverteilung von unbehandelten und mit zwei verschiedenen Konzentrationen Hefefiltrat (5% und 50%) elicitierten Weinkalli der Sorte „Regent“ (Versuch 1) ..... 123
- Abbildung 68: Kallus Trockengewicht von unbehandelten und mit Hefefiltrat elicitierten Weinkalli der Sorte „Regent“ (Versuch 2) ..... 123
- Abbildung 69: Gehalt an Gesamt-Phenylpropanoiden von unbehandelten und mit zwei verschiedenen Konzentrationen Hefefiltrat (5% und 50%) elicitierten Weinkalli der Sorte „Regent“ (Versuch 1) 48 Stunden nach der Behandlung sowie mit Hefefiltrat behandelten Weinkalli der Sorte „Regent“ (Versuch 2) 48 Stunden nach der Behandlung ..... 125
- Abbildung 70: Gehalt an Catechinen von unbehandelten und mit zwei verschiedenen Konzentrationen Hefefiltrat (5% und 50%) elicitierten Weinkalli der Sorte „Regent“ (Versuch 1) A 24 Stunden B 48 Stunden nach der Behandlung sowie Versuch 2, 48 Stunden nach der Behandlung ..... 126
- Abbildung 71: einfache Phenole, Spektrum 2, Hydroxycimtsäuren, Benzoessäuren, Flavonole und Anthocyane von unbehandelten und mit zwei verschiedenen Konzentrationen Hefefiltrat (5% und 50%) elicitierten Weinkalli der Sorte „Regent“ (Versuch1) 48 Stunden nach der Behandlung ..... 127
- Abbildung 72: einfache Phenole, Spektrum 2, Hydroxycimtsäuren, Benzoessäuren, Flavonole und Anthocyane von unbehandelten und mit zwei verschiedenen Konzentrationen Hefefiltrat (5% und 50%) behandelten Weinkalli der Sorte „Regent“ (Versuch 2) 48 Stunden nach der Behandlung ..... 128

- Abbildung 73: Gehalt an trans-Resveratrol von unbehandelten und mit zwei verschiedenen Konzentrationen Hefefiltrat (5% und 50%) elicitierten Weinkalli der Sorte „Regent“ (Versuch 1) 24 Stunden 48 Stunden nach der Behandlung; sowie (Versuch 2) 48 Stunden nach der Behandlung ..... 131
- Abbildung 74: monomere Resveratrol-, oligomere Resveratrol- und Pallidol-Derivate von unbehandelten und mit zwei verschiedenen Konzentrationen Hefefiltrat (5% und 50%) elicitierten Weinkalli der Sorte „Regent (Versuch 1) 24 und 48 Stunden nach der Behandlung..... 132
- Abbildung 75: monomere Resveratrol-, oligomere Resveratrol-und Pallidol-Derivate von unbehandelten und mit Hefefiltrat behandelten Weinkalli der Sorte „Regent“ (Versuch 2) 48 Stunden nach der Behandlung ..... 133
- Abbildung 76: pH-Werte der Stickstoff-modifizierten Medien (N $\frac{1}{2}$  , N1 und N3) nach dem Autoklavieren und nach der 3 Wochen dauernden Kultur von Weinkallus der Sorte „Regent“ auf den Medien. .... 134
- Abbildung 77 Summen der Penylpropanoide, Resveratrol-Derivate ohne Resveratrol, monomere Resveratrol-Derivate, oligomere Resveratrol-Derivate, einfache Phenole und Verbindungen, die Spektrum 2 zugewiesen wurden von unbehandelten und mit verschiedenen Aufbereitungen eines Hefefiltrates behandelte Kalli ..... 135
- Abbildung 78 Trans-Resveratrol, monomere Resveratrol-Derivate ohne Resveratrol, Pallidol-Derivate, Flavonole, Hydroxyzimtsäuren und Benzoesäuren von unbehandelten und mit verschiedenen Aufbereitungen eines Hefefiltrates behandelte Kalli ..... 136
- Abbildung 79: Gesamtphenole, Resveratrol-Derivate ohne Resveratrol, trans-Resveratrol, Pallidol-Derivate, trans-Resveratrol-Derivate, cis-Resveratrol-Derivate und trans-/cis-Resveratril-Derivat von unbehandelten und mit Hefefiltrat elicitierten Weinkalli, jeweils mit und ohne 24 Stunden nach Elicitation durchgeführter Inokulation mit Botrytis cinerea-Sporensuspension sowie mit Mykosing als auch mit der Hefekomponente aus Mykosing behandelte Weinkalli der Sorte „Nero“ , 24, 48, 72 und 96 Stunden nach Elicitation (Versuch 5) . .... 139
- Abbildung 80: Gallussäure-Derivate von unbehandelten und mit Hefefiltrat elicitierten Weinkalli, jeweils mit und ohne 24 Stunden nach Elicitation durchgeführte Inokulation mit Botrytis cinerea-Sporensuspension sowie mit Mykosing als auch mit der Hefekomponente aus Mykosing behandelte Weinkalli der Sorte „Nero“, 24, 48, 72 und 96 Stunden nach Elicitation (Versuch 5) ..... 140

---

Abbildung 81: Befallsstärke von unbehandelten und mit Hefefiltrat elicitierten Weinkalli der Sorte „Nero“ 24 und 48 Stunden nach einer Inokulation mit <i>Botrytis cinerea</i> , entspricht 48 und 72 Stunden nach Elicitation (Versuch 5).....	141
Abbildung 82: Schema: Auszug aus dem Phenylpropanstoffwechsel .....	147
Abbildung 83: Schema: stickstoffspezifisches Akkumulationsverhalten von Anthocyanen, Gallussäure-Derivat Peak B, Flavonolen, p-Cumarsäure-Derivat Peak L, Resveratrol-Derivaten, Catechinen und einfachen Phenolen bei unbehandelten Kalli (Versuch 1). .....	160
Abbildung 84: Schema über den Einfluss von Stickstoff im Stoffwechsel einer Pflanzenzelle. ....	162
Abbildung 85: Akkumulationsverhalten von p-Cumarsäure-Derivat Peak L, Summe der mono- und oligomeren Catechine, dem Aglykon Resveratrol und den Resveratrol--Derivaten von unbehandelten und mit 5% bzw. 50% Hefefiltrat elicitierten Weinkalli unter dem Einfluss verschiedener Stickstoffverfügbarkeiten 5, 10, 24 und 48 Stunden nach Behandlung (Versuch 1)...	165
Abbildung 86: Schematische Darstellung des Akkumulationverhalten von dem p-Cumarsäure-Derivat Peak L.....	166
Abbildung 87: Schematische Darstellung des Akkumulationverhalten von Catechinen .....	166
Abbildung 88: Schematische Darstellung des Akkumulationverhalten von Resveratrol-Derivaten. ....	167

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Literaturdaten über das Vorkommen von monomeren und oligomeren Catechinen in verschiedenen <i>Vitis vinifera</i> Geweben.....	4
Tabelle 2: Literaturdaten über das Vorkommen von Anthocyane in verschiedenen <i>Vitis vinifera</i> Geweben. ....	5
Tabelle 3 : Literaturdaten über das Vorkommen von phenolischen Säuren in verschiedenen <i>Vitis vinifera</i> Geweben.....	6
Tabelle 4: Literaturdaten über das Vorkommen von Resveratrol-Derivaten in verschiedenen <i>Vitis vinifera</i> Geweben.....	11
Tabelle 5: Gradient 1 für HPLC-CRD und Diodenarraydetektor für Weinkallus.....	15
Tabelle 6: Zuordnung von Responsfaktoren .....	17
Tabelle 7: Identifizierung der monomeren- und oligomeren Catechine im Weinkallus der Sorte „Regent“ (Detektion bei 640 nm nach der Nachsäulenderivatisierung mit DMAZA)21	
Tabelle 8: Absorbtionseigenschaften von Resveratrol-Derivaten vor und nach einer enzymatischen Hydrolyse.....	23
Tabelle 9: Abschließende Zuordnung von Resveratrol-Derivaten mit Hilfe von Daten aus der Literatur.....	39
Tabelle 10: chemische Strukturen von exogenen Elicitoren .....	42
Tabelle 11: Substanzen, die nach einer Elicitation an einer Signalübertragung beteiligt sind. ....	43
Tabelle 12: pflanzliche Reaktionsmechanismen auf Elicitation.....	44
Tabelle 13: Pflanzliche Reaktionsmechanismen auf verschiedene Hefe-Elicitoren.....	49
Tabelle 14: Antagonistische Wirkungen von <i>Cryptococcus laurentii</i> und <i>Aureobasidium pullulans</i> ..	56
Tabelle 15: Nährstoffkombinationen der Medien für die Weinkalluskultivierung angelehnt an das Grundmedium von Murashige und Skoog (1962).....	61
Tabelle 16: In den Versuchen 1 und 2 verwendete Stickstoff-Varianten.....	61
Tabelle 17: Stoffgruppenzuordnung für die Versuche 1 bis 4. ....	65
Tabelle 18: Wachstumsverhalten der Hefeisolate S 3.2, 10/8 und S4.....	66
Tabelle 19: Auflistung der durchgeführten Versuche an Weinkalli der Sorten „Regent“ und „Nero“ mit den dazugehörigen Fragestellungen und Versuchsparametern.....	68
Tabelle 20: Kallustrockengewichtsentwicklung von Versuch 2 und Versuch 3.....	69
Tabelle 21: Oligomere Catechine von unbehandelten und mit Hefefiltrat elicitierten Weinkalli der Sorte „Regent“ in den Versuchen 1–3 .....	72
Tabelle 22: Flavonole von unbehandelten und mit Hefefiltrat elicitierten Weinkalli der Sorte „Regent“ (Versuch 1-3) und „Nero“ (Versuch 4) .....	77



<i>Tabelle 23: Trans- und cis-Piceid-Induktion von unbehandelten und mit Hefefiltrat elicierten Weinkalli der Sorten „Regent“ (Versuch 1-3) und „Nero“ (Versuch 4) und das Verhältnis der Induktionsraten beider Isomere. ....</i>	<i>82</i>
<i>Tabelle 24: Monomere trans- und cis-Resveratrol-Derivate von unbehandelten und mit Hefefiltrat elicierten Weinkalli der Sorte „Regent“ (Versuch 2 und 3) und „Nero“ (Versuch 4); .....</i>	<i>85</i>
<i>Tabelle 25: Pallidol-Derivate von unbehandelten und mit Hefefiltrat elicierten Weinkalli der Sorte „Regent“ (Versuch 2 und 3) und „Nero“ (Versuch 4) .....</i>	<i>88</i>
<i>Tabelle 26: Oligomere trans-Resveratrole von unbehandelten und mit Hefefiltrat elicierten Weinkalli der Sorte „Regent“ (Versuch 3) .....</i>	<i>90</i>
<i>Tabelle 27 :Oligomere cis-Resveratrole von unbehandelten und mit Hefefiltrat elicierten Weinkalli der Sorte „Regent“ (Versuch 2 und 3) und „Nero“ (Versuch 4).....</i>	<i>92</i>
<i>Tabelle 28: Oligomere cis-Resveratrol-Derivate von unbehandelten und mit Hefefiltrat elicierten Weinkalli der Sorte „Regent“ (Versuch 2 und 3) und „Nero“ (Versuch 4) .....</i>	<i>95</i>
<i>Tabelle 29: Oligomere Resveratrol-Derivate von unbehandelten und mit zwei verschiedenen Konzentrationen Hefefiltrat (5% und 50%) elicierten Weinkalli der Sorte „Regent“ zu verschiedenen Entnahmetermenen (Versuch 1) .....</i>	<i>110</i>
<i>Tabelle 30: Einfache Phenole und Verbindungen, die der Gruppe Spektrum 2 zugeordnet wurden, von unbehandelten und mit verschiedenen Hefeisolaten (S4, S 3.2, 10/8, 10/3) elicierten Weinkalli der Sorte „Regent“ zu verschiedenen Entnahmetermenen (Versuch 3) .....</i>	<i>112</i>
<i>Tabelle 31: Einteilung der Stoffgruppen nach ihrem Induktionsverhalten in Weinkallus der Sorte „Regent“ bei unterschiedlicher Stickstoffverfügbarkeit im Medium. ....</i>	<i>164</i>



## 1 Einleitung

Um einen wirkungsvollen und gleichzeitig für das ökologische Gleichgewicht unbedenklichen Pflanzenschutz entwickeln zu können, sind Kenntnisse über Resistenzreaktionen von Pflanzen als Antwort auf Pathogenangriffe von existenzieller Bedeutung. Durch die modernen Züchtungsmethoden stehen den Anbauern zwar immer mehr Genotypen mit Resistenzen beziehungsweise Toleranzen zur Verfügung, diese sind jedoch nur auf einzelne Pathogene beschränkt und werden häufig durch neue Pathogenstämme durchbrochen. Besonders im Weinanbau, wo sortenspezifische Geschmacks- und Aromausprägungen gezielt angestrebt werden, diese aber nach Kreuzungen häufig verloren gehen, ist ein ausgeprägter Pflanzenschutz zur Sicherung der wirtschaftlich notwendigen Erträge unumgänglich.

Da viele Pflanzenschutzmaßnahmen mit ökologischen und humanmedizinischen Auswirkungen verbunden sind, stützen sich moderne Anbaumethoden auf die Entwicklung von Pflanzenschutzmaßnahmen, die natürliche Antagonismen nutzen und Abwehrstrategien der Pflanzen gegen Pathogenangriffe unterstützen.

In diesem Zusammenhang gewinnen sowohl vitale Mikroorganismen wie Florfliegen und *Bacillus thuringiensis* als auch abgetötete Hefebeimischungen in verschiedenen Pflanzenstärkungsmitteln immer mehr an Bedeutung. Über die genaue Wirkungsweise der Hefebeimischungen in den Pflanzenstärkungsmitteln existieren nur wenige Anhaltspunkte.

Dass lebende Hefen die Mikroflora von Obst und Gemüse in Nacherntebehandlungen positiv beeinflussen und den Befall von pathogenen Pilzen eindämmen, konnte vielfach gezeigt werden. Über Mechanismen, wie abgetötete Hefen die Widerstandsfähigkeit von Pflanzen gegen Schadorganismen erhöhen, ist jedoch wenig bekannt.

Im Fachbereich für Obstbau der Technischen Universität München wurde das Augenmerk auf die Beteiligung von phenolischen Substanzen in den Pflanzen an der Pathogenabwehr gelegt.

Die Synthese von Resveratrol und verschiedenen Resveratrol-Derivaten bei *Vitis vinifera* als Abwehrreaktion auf Pathogenbefall war Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Ob jedoch abgetötete Hefepräparate die Synthese dieser Phytoalexine induzieren und somit das Resistenzpotential von Wein erhöhen können, war bisher nicht hinreichend untersucht worden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, anhand von Kalluskulturen die Induzierbarkeit von Weinzellen durch Applizieren des Kulturfiltrates des epiphytisch auf Wein vorkommenden, hefeähnlichen Pilzes *Aureobasidium pullulans* und seine Rolle als potenzieller biotischer Elicitor zu untersuchen.

## **2 Identifizierung phenolischer Verbindungen von *Vitis vinifera* Kallus**

### **2.1 Literaturübersicht**

#### **2.1.1 Phenolische Verbindungen allgemein**

Das Vorkommen phenolischer Inhaltsstoffe in Weinen und Trauben ist aufgrund ihrer vielfältigen Bedeutung für sensorische Eigenschaften wie Geruch, Geschmack und Farbe des Weines relativ gut untersucht. In jüngerer Zeit haben diese Verbindungen wegen ihrer antioxidativen, antithrombotischen, anticancerogenen und östrogenen Wirkungen (NIKFARDJAM et al. 2000) auch aus humanmedizinischer Sicht an Bedeutung gewonnen.

Im Rahmen eines integrierten Pflanzenschutzes im Weinbau kommt der Züchtung pilzresistenter Rebsorten und der dafür notwendigen Erforschung pflanzeigener Abwehrmechanismen weitreichende Bedeutung zu. Bei Pflanzen stehen phenolische Substanzen mit dem Resistenzpotential gegenüber Schaderregern in engem Zusammenhang. Um die Wirt-Parasit-Beziehung bei Wein (*Vitis vinifera*) besser verstehen zu können, werden neben Rebenpflanzen im Freiland und Gewächshaus auch Kallus- und Zellkulturen als Modellsysteme verwendet.

Im Hinblick auf die Resistenz nehmen die Stilbene eine besondere Stellung ein. So wird eine schnelle Akkumulation von Phytoalexinen wie Resveratrol und Viniferin mit einer Resistenz gegen *Botrytis cinerea*, dem Grauschimmel, bei Wein in Verbindung gebracht (LANGCAKE und MCCARTHY 1979).

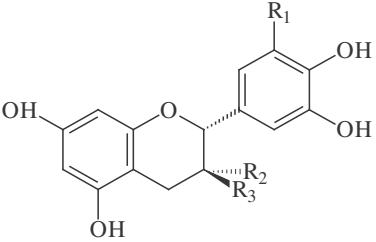
Um die Inhaltsstoffe in Blättern und Trauben mit jenen im Modellsystem Kallus-Zellkultur vergleichen zu können, sind die in der Literatur identifizierten Substanzen in Tabelle 1 bis 4 dargestellt.

#### **2.1.2 Catechine und Proanthocyanidine**

Die Hauptvertreter der Flavan-3-ole im Wein sind die Monomeren Catechin und Epicatechin. Catechine, sowie deren polymere Procyanidine liegen in der Natur meist in freier Form vor (HASLAM 1989). Ferner gibt es noch Oligomere der Beiden, in denen Epicatechineinheiten teilweise mit Gallussäure verestert ist. Verschiedenen Vertreter dieser Stoffgruppe sind in Abbildung 1 dargestellt..

Polymere Flavan-3-ole werden auch Proanthocyanidine genannt und entstehen durch enzymatische und chemische Kondensation. Sie sind farblose Substanzen, die zu farbigen Anthocyanen werden, wenn sie mit Säure oder Luft in Berührung kommen. Im Fall von Rotwein wird häufig von Procyanidin gesprochen. Auch in Kallus- und Zellkulturen wurden Catechine und Procyanidine als vorherrschende Inhaltsstoffe ermittelt. Die Daten aus der Literatur über in unterschiedlichen Pflanzenorganen sowie in Kallus- und Zellkulturen identifizierten Flavan-3-ole sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Vergorene Weine enthalten Flavanole wie Catechin, Epicatechin, dimere Procyanidine B1, B2, B3 und B4 sowie trimere C1 und T2 (CARANDO et al. 1999). Die Monomeren Epicatechin 3-O-gallat und Epigallocatechin-3-O-gallat wurden in Traubenkernen identifiziert (TREUTTER 1991).



<b>Procyanidine</b> <b>R1 = H</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>
Catechin	H	OH
Epicatechin	OH	H
Epicatechingallat	Gallussäureester	H
Catechingallat	H	Gallussäureester

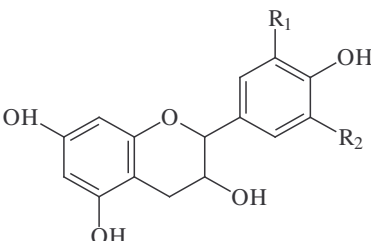
  

<b>Prodelfinidine</b> <b>R1 = OH</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>
Gallocatechin	H	OH
Epigallocatechin	OH	H
Epigallocatechingallat	Gallussäureester	H
Gallocatechingallat	H	Gallussäureester

Abbildung 1: Strukturen von Catechinen

### 2.1.3 Anthocyane

In der Fruchtschale befinden sich neben den Flavanolen auch die farbgebenden Anthocyane, die Glucoside der Anthocyanidine, die ein Flavylium-Ion als Basiseinheit aufweisen. Die Anthocyanidine des Rotweins sind vorwiegend Cyanidin und Malvidin. (FRANKEL 1995). Auch in Kallus- und Zellkulturen wurden Anthocyane gefunden, die in Auszügen in Tabelle 2 dargestellt sind.



<b>Anthocyanidin</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>
Pelargonidin	H	H
Cyanidin	OH	H
Päonidin	OCH <sub>3</sub>	H
Delphinidin	OH	OH
Petunidin	OCH <sub>3</sub>	OH
Malvidin	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>




Abbildung 2: Strukturen von Anthocyanidinen bzw. Anthocyanen

*Tabelle 1: Literaturdaten über das Vorkommen von monomeren und oligomeren Catechinen in verschiedenen Vitis vinifera Geweben*

<b>Catechine</b>	<b>Blätter</b>	<b>Zellkulturen</b>	<b>Früchte / Fruchtschale</b>
Catechin	BAUM-GARTNER 1998	WAFFO-TEGUO et al. 1996; FEUCHT et al. 1996, 1998; VITRAC et al. 2001; DECENDIT et al. 2002; SGARBI et al. 2003	GOETZ et al. 1999; REVILLA et al. 2000; PENA-NEIRA et al. 2004
Epicatechin		FEUCHT et al. 1996; WAFFO-TEGUO et al. 1996; VITRAC et al. 2001	GOETZ et al. 1999; REVILLA et al. 2000; PENA-NEIRA et al. 2004
Epicatechingallat (Epicatechin-3-O-Gallat)		FEUCHT et al. 1996, 1998; DECENDIT et al. 2002	GOETZ et al. 1999
Procyanidin B1		FEUCHT et al. 1996, 1998	REVILLA et al. 2000
Procyanidin B2		FEUCHT et al. 1996, 1998	REVILLA et al. 2000
B2-Gallat		FEUCHT et al. 1998; DECENDIT et al. 2002	
Procyanidin B3		FEUCHT et al. 1996, 1998	
Procyanidin B4		FEUCHT et al. 1996	
Procyanidin B5		FEUCHT et al. 1998	
Procyanidin B7		FEUCHT et al. 1996	
Epicatechin-4 $\beta$ -8-Epicatechin-3-O-Gallat		DECENDIT et al. 2002	
C1		FEUCHT et al. 1996	
Prodelphinidin		FEUCHT et al. 1998	

Tabelle 2: Literaturdaten über das Vorkommen von Anthocyanen in verschiedenen *Vitis vinifera* Geweben

Anthocyane	Blätter	Zellkulturen	Früchte / Fruchtschale
Cyanidin-3-O- $\beta$ -Glucosid		VITRAC et al. 1999; KRISA 1999; VITRAC 2001	
Malvidin-3-O- $\beta$ -Glucosid		VITRAC et al. 1999; KRISA 1999; VITRAC 2001	
Peonidin-3-O- $\beta$ -Glucosid		VITRAC et al. 1999; KRISA 1999; VITRAC 2001	
Cyanidin-3-6-O-p-Cumarylglucosid			REVILLA et al. 2000
Delphinidin-3-6-O-p-Cumaroylglucosid			REVILLA et al. 2000
Petunidin-3-6-O-p-Cumaroylglucosid			REVILLA et al. 2000
Malvidin-3-6-O-p-Cumaroylglucosid			REVILLA et al. 2000
Malvidin-3-O-Glucosidacetat			REVILLA et al. 2000
Malvidin-3-O-Glucosid-p-Cumarat			REVILLA et al. 2000
Peonidin-3-O-Glucosid			REVILLA et al. 2000

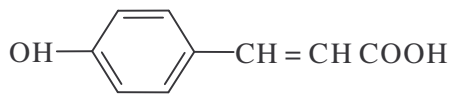
#### 2.1.4 Hydroxyzimtsäuren

Die Hydroxybenzoe- und Hydroxyzimtsäuren bilden eine in der Pflanzenwelt weitverbreitete Klasse aromatischer Verbindungen, die sowohl in freier als auch in derivatisierter Form als Glycoside bzw. Ester vorkommen. In Weintrauben wurden diese Derivate als Ester der Weinsäure, auch Tartrate genannt, identifiziert. Caffeoyl- und p-Cumaroyl-Tartrat-Derivate (RIBEREAU-GAYON 1965, zit. in BARANOWSKI und NAGEL 1981) sind bekannte Verbindungen im Wein, Feruloyl-Tartrat wurde in Rotwein gefunden. Diese Verbindungen sind als Aromakomponenten für das Geschmacks- und Geruchsbild beim Wein von großer Bedeutung. Tartrate kommen in allen grünen Geweben der Weinrebe vor und liegen in der Pflanze sowohl als trans- als auch als cis-Isomere vor, wobei die trans-Form überwiegt. Der Gehalt an Hydroxyzimtsäuren in Wein ist vor allem von der Rebsorte abhängig. In Kallus- und Zellkulturen kommen phenolische Säuren nur in geringen Mengen vor. Literaturdaten zum Vorkommen der verschiedenen Verbindungen in Blättern und Trauben sowie Kallus- und Zellkulturen sind in Tabelle 3 dargestellt.

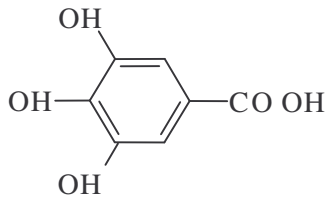
Tabelle 3: Literaturdaten über das Vorkommen von phenolischen Säuren in verschiedenen *Vitis vinifera* Geweben

Phenolische Säuren	Blätter	Zellkulturen	Früchte / Fruchtschale
Gallussäure	RAPP und ZIEGLER 1973; BAUMGARTNER 1998	SGARBI et al. 2003	RAPP et al. 1973; REVILLA et al. 2000; PENA-NEIRA et al. 2004
Benzoessäure	BACHMANN 1978		
p-Hydroxybenzoessäure	RAPP und ZIEGLER 1973; BACHMANN 1978		RAPP et al. 1973
4-Hydroxybenzoessäure	BAUMGARTNER 1998		
3-Hydroxybenzoessäure	BAUMGARTNER 1998		
Chlorogensäure	EGGER et al. 1976		
o-Cumarsäure	BAUMGARTNER 1998		
trans-p-Cumarsäure	RAPP und ZIEGLER 1973; BACHMANN 1978	SGARBI et al. 2003	RAPP et al. 1973; GOETZET al. 1999
cis-p-Cumarsäure	RAPP und ZIEGLER 1973		RAPP et al. 1973
trans-p-Cumaroyl-Tartrat	BACHMANN 1978		GOETZET al. 1999
cis-p-Cumaroyl-Tartrat			GOETZET al. 1999
trans-Ferulasäure	RAPP und ZIEGLER 1973; BACHMANN 1978	SGARBI et al. 2003	RAPP et al. 1973
trans-Feruloyl-Tartrat	BACHMANN 1978		
Gentisinsäure	RAPP und ZIEGLER 1973; BACHMANN 1978; BAUMGARTNER 1998		
trans-Kaffeessäure			RAPP et al. 1973
cis-Kaffeessäure	RAPP und ZIEGLER 1973		RAPP et al. 1973
trans-Kaffeoyl-Tartrat	RAPP und ZIEGLER 1973; EGGER et al. 1976; BACHMANN 1978; BAUMGARTNER 1998		GOETZET al. 1999; REVILLA et al. 2000
Protocatechusäure	RAPP und ZIEGLER 1973; BACHMANN 1978; BAUMGARTNER 1998		RAPP et al. 1973
Salicylsäure	RAPP und ZIEGLER 1973; BACHMANN 1978		
Syringasäure			PENA-NEIRA et al. 2004
Vanillinsäure	RAPP und ZIEGLER 1973; BACHMANN 1978		RAPP et al. 1973
Zimtsäure	BAUMGARTNER 1998		





Grundgerüst der Hydroxycimtsäure



Gallussäure

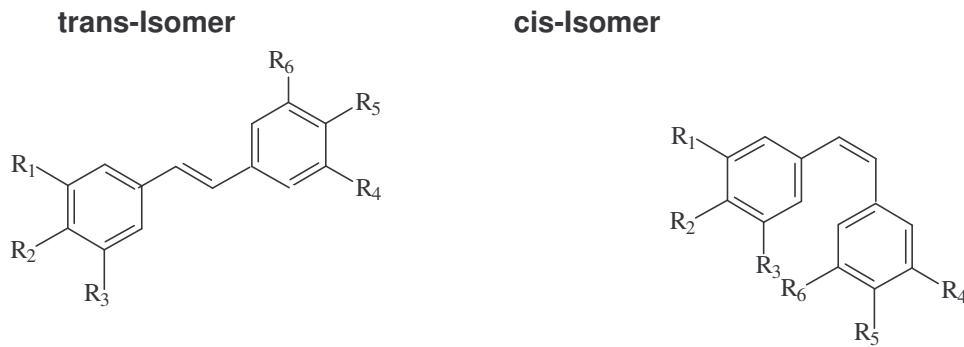
Abbildung 3: Grundgerüst der Hydroxycimtsäuren und die Strukturformel der Gallussäure

### 2.1.5 Resveratrol und Resveratrol-Derivate

Das Hauptaugenmerk der phenolischen Inhaltstoffe im Wein richtete sich in den vergangenen Jahren auf die Gruppe der Stilbene mit seinem Hauptvertreter Resveratrol (3,5,4'-Trihydroxystilben). Die meisten Stilbene sind toxisch und gelten somit als Phytoalexine (LANZ et al. 1990). Sie sind niedermolekulare pflanzliche Stoffwechselprodukte, die aufgrund einer zentralen Doppelbindung als cis- und trans-Konfiguration vorkommen können. Die cis-Isomere werden durch photometrische Isomerisation der trans-Formen gebildet. Dieser Prozess ist reversibel (JEANDET et al. 2002). Resveratrol-Glucoside nennt man Piceide. Eine Methoxylierung von Resveratrol führt zu Pterostilbenen. Die wichtigsten Resveratrol-Derivate sind in Tabelle 4 dargestellt.

Eine oxidative Dimerisation von Resveratrol-Einheiten führt zu Oligomeren, die auch Viniferine genannt werden (Abbildung 5). Das Resveratrol-Dimer  $\epsilon$ -Viniferin und das cyclische Resveratrol-Dehydrotrimer  $\alpha$ -Viniferin wurden schon vielfach charakterisiert (LANGCAKE und PRYCE 1976, 1977a, b). Ferner wurde das Vorkommen von  $\beta$ -Viniferin, einem cyclischen Resveratrol-Tetramer, und  $\gamma$ -Viniferin, einem Oligomer mit hohem Molekulargewicht, beschrieben (LANGCAKE und PRYCE 1977b). PEZET et al. (2003a) wiesen nach einer UV-C-Bestrahlung von Weinblättern auch  $\delta$ -Viniferin, ein Isomer von  $\epsilon$ -Viniferin, nach.

Bei der Biosynthese von Stilbenen ist Phenylalanin das Ausgangssubstrat. Katalysiert durch das Enzym Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) wird Phenylalanin unter Freisetzung von  $\text{NH}_3$  zu t-Zimtsäure umgewandelt. Während die Chalkonsynthase (CHS) ein Schlüsselenzym für die Bildung des Chalkons darstellt (Abbildung 6), katalysiert die Stilbensynthase die Bildung von Resveratrol aus drei Acetat-Einheiten via Malonyl-CoA und einer Cumaroyl-CoA-Einheit (RUPPRICH 1980; JEANDET et al. 2002).



Stilbene	R1	R2	R3	R4	R5	R6
Resveratrol	OH	H	OH	H	OH	H
Piceid	GlcO	H	OH	H	OH	H
Astringin (3'-OH-Piceid)	GlcO	H	OH	OH	OH	H
Piceatannol	OH	OH	H	OH	H	OH
Pterostilben	OCH3	H	OCH3	H	OH	H
Resveratrolösid	OH	H	OH	H	GlcO	H

Abbildung 4: Strukturen von cis- und trans-Resveratrol-Derivaten

Das Vorhandensein von freiem und gebundenem Resveratrol in Weinblattextrakten ließe sich durch eine Abfolge von Hypothesenschritten zum Metabolismus der Stilbene innerhalb der Pflanzen erklären. So könnte trans-Resveratrol durch die Aktivierung der Stilbensynthese in freier Form synthetisiert und anschließend durch die Glucosyl-Transferase zu trans-Resveratrol-Glucosiden (Piceid) glycosyliert werden. Danach könnte durch cis-Isomerase eine Isomerisation zu cis-Formen erfolgen (JEANDET et al. 1997a). Die anschließende Methylierung des Resveratrols führte dann zu Pterostilben.

Auch in Kallus- und Zellkulturen wurden verschiedene Resveratrol-Derivate nachgewiesen. Literaturdaten über das Vorkommen der wichtigsten Verbindungen in Blättern, Trauben und Zellenkulturen von Wein sind in Tabelle 4 zusammengestellt.

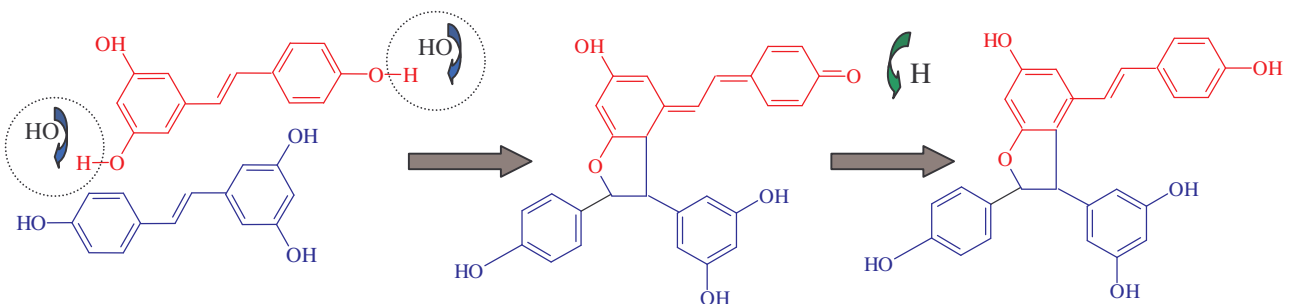


Abbildung 5: Dimerisation von Resveratrol

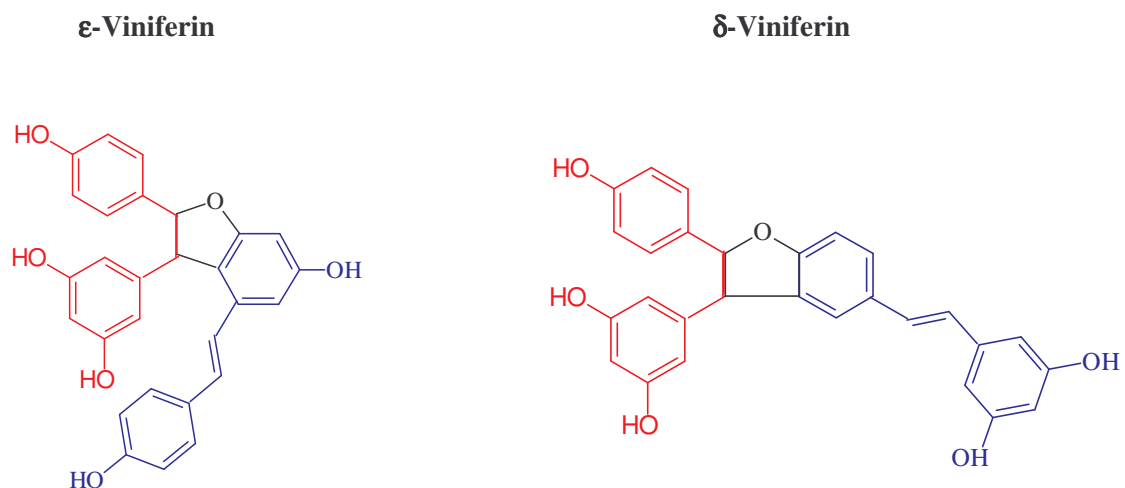


Abbildung 6: Die Resveratrol-Dimere  $\epsilon$ -Viniferin und  $\delta$ -Viniferin

#### 2.1.5.1 Vorkommen in der Rebe

Resveratrol-Derivate kommen in Pflanzen im verholzten Spross, in der Wurzel (STEIN und HOOS 1984), in Blättern und Früchten vor. Einige Vertreter, wie das Pallidol, sind nur in wenigen Weinsorten zu finden, andere, wie das Viniferin, konnten nur in Rotweinsorten nachgewiesen werden (LANDRAULT et al. 2002). LANGCAKE et al. (1978) fanden Pterostilben ausschließlich in nicht-lignifiziertem Gewebe.

Die Synthese innerhalb eines Blattes ist hauptsächlich an der Blattoberseite lokalisiert, was STEIN und HOOS (1984) durch die Bestrahlung von Blattober- und -unterseite mit UV-Licht zeigen konnten.

#### 2.1.5.2 Stilbeninduktion

In gesundem Gewebe sind einige Resveratrol-Derivate wie das Pterostilben (LANGCAKE et al. 1978, 1979b) nicht nachweisbar, andere weisen geringe konstitutive Konzentrationen auf. Stilbene werden von der Rebe unter biotischen und abiotischen Stressbedingungen synthetisiert und besitzen fungistatische und fungitoxische Eigenschaften (STEIN und HOOS 1984; JEANDET et al. 2002).

Die Bildung von Resveratrol wurde durch die Bestrahlung der Weinblätter mit UV-C oder die Inokulationen mit verschiedenen Pilzen, wie *Botrytis cinerea*, *Plasmopara viticola* oder *Oidium tuckeri* (LANGCAKE und PRYCE 1976; LANGCAKE et al. 1979b; LANGCAKE 1981; BRAVARESCO und EIBACH 1987; JEANDET et al. 1991; LISWIDOWATI et al. 1991; ADRIAN et al. 1997, 2000b; DOUILLET et al. 1999) induziert.

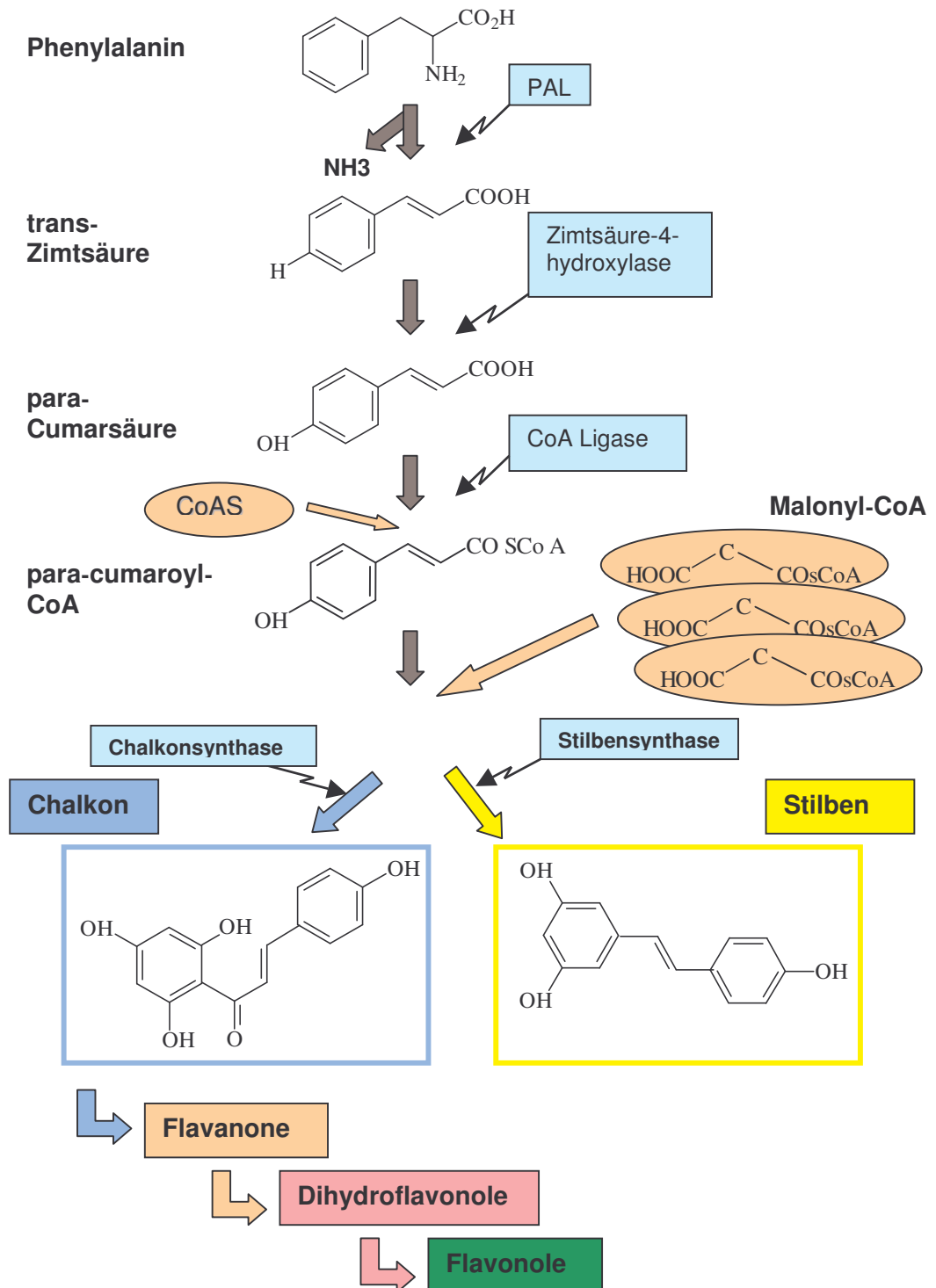


Abbildung 7: Biosynthese von Stilbenen und Chalkonen nach STOESSL 1982  
(JEANDET et al. 2002)

*Tabelle 3: Literaturdaten über das Vorkommen von Resveratrol-Derivaten in verschiedenen Vitis vinifera Geweben*

<b>Resveratrol-Derivate</b>	<b>Blätter</b>	<b>Zellkulturen</b>	<b>Früchte / Fruchtschale</b>
trans-Resveratrol	LANGCAKE et al. 1977, 1979; BLAICH 1977; BACHMANN 1980; STEIN und HOOS 1984, 1985; JEANDET et al. 1991, 1997; BREUIL et al. 1999; DELAUNAY et al. 2002	LISWIDOWATI et al. 1991; VITRAC 2001	JEANDET et al. 1991; ADRIAN et al. 2000; REVILLA et al. 2000; LANDRAULT et al. 2002; CANTOS et al. 2003;
trans-Piceid	JEANDET et al. 1997; BREUIL et al. 1999	WAFFO-TEGUO et al. 1996, 1998; KRISA et al. 1999; VITRAC 2001	ADRIAN et al. 2000; NIKFARDJAM et al. 2000; LANDRAULT et al. 2002; CANTOS et al. 2003
cis-Piceid		WAFFO-TEGUO et al. 1998; VITRAC 2001	ADRIAN et al. 2000; NIKFARDJAM et al. 2000
trans-Astringin	DELAUNAY et al. 2002	WAFFO-TEGUO et al. 1996, 1998	LANDRAULT et al. 2002; CANTOS et al. 2003
cis-Astringin		WAFFO-TEGUO et al. 1996, 1998	
Pallidol	DELAUNAY et al. 2002	WAFFO-TEGUO et al. 2000	LANDRAULT et al. 2002
trans-Pterostilben	LANGCAKE et al. 1978, 1979; STEIN und HOOS 1984; JEANDET et al. 1997; BREUIL et al. 1999; PEZET et al. 2003		ADRIAN et al. 2000
trans-Resveratrol-3-O-glucuronid		WAFFO-TEGUO et al. 1996	
cis-Resveratrol-3-O-glucuronid		WAFFO-TEGUO et al. 1996	
cis-Resveratrol-3,4'-O-β-Digluconid		DECENDIT et al. 2002	
cis / trans-Resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilben)-4'-O-β-D-Glucopyranosid		WAFFO-TEGUO et al. 1998	

Tabelle 4: Literaturdaten über das Vorkommen von Resveratrol-Derivaten in verschiedenen *Vitis vinifera* Geweben

Resveratrol Derivate	Blätter	Zellkulturen	Früchte / Fruchtschale
trans Resveratrol Dehydrodimer 11-O-β-D-Glucopyranosid		WAFFO-TEGUO et al. 2000	
Viniferin	LANGCAKE et al. 1979; STEIN und HOOS 1984; 1985; DELAUNAY et al. 2002		LANDRAULT et al. 2002; CANTOS et al. 2003
trans-α-Viniferin	PRYCE et al. 1977; LANGCAKE 1979; PEZET et al. 2003		ADRIAN et al. 2000
trans-β-Viniferin	PEZET et al. 2003		
trans-γ-Viniferin	PEZET et al. 2003		
trans-ε-Viniferin	LANGCAKE et al. 1977; 1979; JEANDET et al. 1997; BREUIL et al. 1999; PEZET et al. 2003		ADRIAN et al. 2000
cis-ε-Viniferin	LANGCAKE et al. 1977		

LANGCAKE und PRYCE (1977c) wiesen nach einer Elicitation im Wein nicht nur Resveratrol sondern auch dessen Oxidationsprodukte wie ε-, α-, β-, und γ-Viniferin (Dimer, Trimer, Tetramer bzw. höher polymerisierte Oligomere) nach.

Bei einer Pilzinfektion wird Resveratrol und auch ε-Viniferin in einer etwa 1-3 mm breiten Zone im gesunden Gewebe um die Pilzläsion herum lokalisiert (LANGCAKE und MCCARTHY 1979a; STEIN und HOOS 1984). Dabei weisen resistente Sorten nicht nur höhere Resveratrolgehalte auf, sondern sie reagieren auch mit einer schnelleren Akkumulation als anfällige Sorten (STEIN und HOOS 1984).

Resveratrol-Derivate können auch als Reaktion auf andere Stressoren wie Schwermetalle, z.B. Aluminium oder Aluminium-haltige Fungizide (DERCKES und CREASY 1989; ADRIAN et al. 1996; JEANDET et al. 1997b, 1998, 1999, 2000), aber auch durch Chemikalien wie das Ozon (SCHUBERT et al. 1997; CHIRON et al. 2000; JEANDET et al. 2002) induziert werden.

Stilbensynthase ist das Schlüsselenzym, das die Biosynthese von Stilben katalysiert. Das Enzym wurde zum ersten Mal aus Zellsuspensionskulturen von *Arachis hypogea* (SCHOEPPNER et al. 1984) aufgereinigt und auch in *Pinus sylvestris* (FLIEGMANN et al. 1992), Erdnüssen (LANZ et al. 1990) und Weinpflanzen (MELCHIOR und KINDL 1990; SPARVOLI et al. 1994) identifiziert. Die Gruppierung von Stilbensynthase-Gene erfolgt anhand ihrer Reaktionen auf externe Signale einschließlich abiotischem Stress oder biotischen Signalen ausgelöst von pilzlichen Zellen (PREISIG-MÜLLER et al. 1999; BREHM et al. 1999).

Stilbensynthese wird ausschließlich mit der Chalkonsynthese, dem Schlüsselenzym in der Flavonoidbiosynthese in Zusammenhang gebracht, da bei *Arachis hypogea* die Aminosäuresequenzen beider Enzyme zu 70–75% identisch sind (SCHRÖDER et al. 1988). Stilbensynthese und Chalkonsynthese verwenden die gleichen Substrate und katalysieren den gleichen Kondensations-Typ an Enzymreaktionen, aber sie bilden zwei verschiedene Produkte, zum einen Chalkone, zum anderen einfache Stilbene.

### 2.1.5.3 Fungizide Wirkung

Resveratrol selbst, vor allem aber einige Derivate, wie die Viniferine und das Pterostilben, können aufgrund ihrer fungitoxischen Eigenschaften als Phytoalexine bezeichnet werden (STEIN und HOOS 1984). Resveratrol ist zwar das Stilben, das nach einer Elicitation in den größten Mengen akkumuliert (DOUILLET et al. 1999), aber im Vergleich zu Pterostilben und  $\epsilon$ -Viniferin nur ein Drittel der fungitoxischen Aktivität aufweist (LANGCAKE et al. 1978; JEANDET et al. 2002). So benötigten PEZET und PONT (1988) die dreifache Menge an Resveratrol (160  $\mu\text{g/ml}$ ) im Vergleich zu Pterostilben (52  $\mu\text{g/ml}$ ), um die Konidienkeimung von *Botrytis cinerea* zu unterdrücken.

Die fungizide Wirkungen der einzelnen Stilbene (JEANDET et al. 2002) richten sich gegen verschiedene Pathogene wie *Botrytis cinerea*, *Cladosporium cucumerinum*, *Pycularia oryzae* (LANGCAKE und PRYCE 1976), *Plasmopara vitricula* (LANGCAKE 1981; DERCKS und CREAMY 1989) und *Sphaeropsis sapinea* (CELIMENE et al. 2001). Gegen pilzliche Pathogene wie *Venturia inaequalis* zeigten sie in transgenen Apfelpflanzen mit eingebrachtem Stilbensynthese-Gen allerdings keine hemmende Wirkung (SZANKOWSKI et al. 2003).

Je nach Konzentration bewirkt das jeweilige Phytoalexin eine Hemmung der Konidienatmung, vermindert das Mycelwachstum des Pilzes, reduziert die Konidienkeimung und die Keimschlauchlänge und kann das Abtöten der Pilzsporen bewirken, was ADRIAN et al. (1997b) und PEZET und PONT (1988) anhand von *Botrytis cinerea*-Konidien, die mit Pterostilben behandelt wurden, zeigen konnten. Dabei korrelierte die Wirkungsintensität signifikant mit der Stilbenkonzentration. Stilbene, wie das Pterostilben, verursachten in *Botrytis cinerea*-Konidien eine schnelle Zerstörung der Ribosomen, des endoplasmatischen Reticulums und der Membran der Mitochondrien und Zellkerne. Die Plasmamembran war nach drei Stunden völlig desorganisiert und die Konidienatmung 10 Minuten nach der Phytoalexinzugabe vollständig unterdrückt (PEZET et al. 1989).

## 2.2 Material und Methoden

Phenolische Verbindungen stehen in direktem Zusammenhang zum Resistenzpotential von Pflanzen. Um feststellen zu können, ob Kalluszellen von Wein vergleichbare Phenolmuster aufweisen wie Weinpflanzen und welche phenolischen Substanzen durch eine Behandlung mit Hefe beeinflusst werden, müssen die Verbindungen isoliert und identifiziert werden.

Ziel dieser Untersuchung war es, die durch eine Hefebehandlung elicitierten Verbindungen im Weinkallus zu charakterisieren und zu identifizieren.

### 2.2.1 Extraktion der Polyphenole aus Weinkallus

Die Weinkalli wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Gefriertrocknung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. 100 mg des gefriergetrockneten Kallus wurden in einem Mörser zerkleinert und mit 5 ml Methanol p.a. und 0,025% 6-Methoxy-Flavon als internem Standard aufgenommen und in ein Zentrifugenröhrchen (12 ml) überführt. Die phenolischen Inhaltstoffe wurden dann in einem eisgekühlten Ultraschallbad 30 Minuten extrahiert. Nach einem 10-minütigen Abzentrifugieren des Zellmaterials bei 3000 U/min und  $0^{\circ}\text{C}$  wurde der Überstand in Eppendorfgefäße (2 ml) überführt und im Vakuumrotationsverdampfer eingengt, damit die Überstände gleicher Proben in einem Eppendorfgefäß vereint und erneut bis zur Trocknung eingengt werden konnten. Anschließend wurde das Trockenextrakt in 100  $\mu\text{l}$  Methanol p.a. aufgenommen und diente der Hochdruckflüssigkeitschromatographie-Analyse (HPLC).

### 2.2.2 HPLC und Diodenarray zur Bestimmung der Polyphenole

Die Trennung und Quantifizierung der Polyphenole erfolgte mit Hilfe der HPLC. Um bei der Trennung und Detektion eine Überlagerung von Flavanolen und Hydroxyzimtsäure-Derivaten zu umgehen, wurde die von TREUTTER (1989, 1991) entwickelte Methode der Nachsäulenchromatographie mit p-Dimethylaminozimtaldehyd (DMAZA) der HPLC-Analyse nachgeschaltet

#### HPLC-Anlage mit Nachsäulenderivatisierung (HPLC-CRD) und Diodenarraydetektor

Probengeber:	Gilson-Abimed Modell 231
Pumpen:	Kontron Modell T-414 Gynkotec High Precision Pump Model 300 C
Gradientenformer:	Kontron Modell 205
Detektoren:	Micromeritics 788 Dual Variable Detector, 280 nm Kontron Detector 432, 640 nm
Säulen:	125 x 4,6 mm (ID), LiCrosher 100, RP-18, Partikelgröße 5 $\mu\text{m}$
Lösungsmittel:	A: 5%ige Ameisensäure



Lösungsmittel: B: Methanol (gradiente grade)  
 Flow: 0,5 ml/min  
 Datenverarbeitung: Chromatographie-Datensystem GynkoSoft Version 3.12

Die Nachsäulenderivatisierung erfolgte im Anschluss an die HPLC-Trennung. In einem Reaktor (gestrickte PTFE-Kapillare, Länge 9 m, ID 0,5 mm) wurden die getrennten Phenylpropanoide mit einer 1%igen Lösung DMAZA in MeOH/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (3N) (11:1) versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 3 Minuten konnte eine Komplexbildung der Polyphenole mit dem DMAZA bei 640 nm quantitativ bestimmt werden.

### Verwendete Gradienten

Tabelle 4: Gradient 1 für HPLC-CRD und Diodenarraydetektor für Weinkallus

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

Gradient 2 für HPLC-CRD und Diodenarraydetektor für Weinkallus

Zeit (min)	%B		Zeit (min)	%B	
0– 5	5	isokratisch		20	isokratisch
5–10	5–10		95–125	25–30	
10–15	10	isokratisch	125–145	30–40	
15–35	10–15		145–160	40–50	
35–55	15	isokratisch	160–225	50–90	
55–80	15–20		225–260	90– 5	isokratisch
	20	isokratisch			
80–95	20–25				

### 2.2.3 Quantitative Auswertung

Aus der Peakfläche einer bestimmten phenolischen Substanz lässt sich mit Hilfe von Eichfaktoren (Responsfaktoren) ihre Konzentration bestimmen. Dabei dient die Trockensubstanz als Bezugsgröße. Die Konzentrationen von Referenzsubstanzen lassen sich nach folgender Formel berechnen.

$$\text{Konz}(i) = \frac{A(i) \cdot \text{RF}(i)}{A(\text{IS}) + \text{RF}(\text{IS})} \cdot \text{MF} \cdot \text{Konz}(\text{IS})$$

Abbildung 8SEQARABISCH: Berechnungsformel für die Stoff-Konzentration

<i>i</i>	<i>Einzelpeak</i>
<i>IS</i>	<i>Interner Standard (6-Mrthoxyflavon)</i>
<i>Konz</i>	<i>Konzentration</i>
<i>A</i>	<i>Peakfläche</i>
<i>RF</i>	<i>Responsfaktor = Konzentration / Peakfläche</i>
<i>MF</i>	<i>Multiplikationsfaktor (bezieht die Konzentration auf 1 g TS)</i>

### Responsfaktoren

6-Methoxy-Flavon (Interner Standard)	$8,10 \times 10^{-6}$
Catechin	$6,33 \times 10^{-6}$
Epicatechin	$4,29 \times 10^{-6}$
Epicatechingallat	$1,06 \times 10^{-5}$
B3	$1,95 \times 10^{-5}$
Arbutin	$1,55 \times 10^{-4}$
Gallussäure	$1,47 \times 10^{-5}$
Protocatechusäure	$2,31 \times 10^{-5}$
Vanillinsäure	$2,49 \times 10^{-5}$
p-Cumarsäure	$7,25 \times 10^{-5}$
Kaffeesäure	$9,61 \times 10^{-6}$
Quercetin	$2,25 \times 10^{-5}$
Cyanidin	$7,25 \times 10^{-6}$
trans-Resveratrol	$6,56 \times 10^{-6}$
trans-Piceid	$4,92 \times 10^{-6}$

Die Konzentrationen der eindeutig identifizierten Verbindungen wurden mit Hilfe der Responsfaktoren anhand der entsprechenden Standards wie Catechin, Epicatechin, Epicatechingallat, B3, Protocatechusäure, Vanillinsäure, trans-Resveratrol und trans-Piceid berechnet. Verbindungen von denen keine Standards zur Verfügung standen, wurden wie folgt berechnet:

*Tabelle 5: Zuordnung von Responsfaktoren*

<b>Stoffgruppen</b>	<b>Peak (Verbindung)</b>	<b>berechnet wie:</b>
oligomere Catechine	B1	B3
einfache Phenole	A, Peak 4, T0, T1	Arbutin
einfache Phenole mit Spektrum 2	I, U, K, N	trans-Piceid
Benzoensäuren	B (Gallussäurederivat)	Gallussäure
Hydroxycimtsäuren	L (p-Cumarsäurederivat), AA (Kaffeensäure-Derivat)	p-Cumarsäure Kaffeensäure
Flavonole	HH, T2	Quercetin
Anthocyane	BB, II	Cyanidin
Resveratrol-Derivate	T, X, EE, J, Y, Z0, Z1, Z2, P, Q, R, CC, DD, DD1, RR, VV, WW, GG, OO, PP, MM, NN, KK, LL, QQ, TT, SS, UU, XX, YY	trans-Piceid

#### **2.2.4 Fraktionierung von phenolischen Verbindungen von Weinkallus**

Um Einzelbestandteile des Weinkallusextraktes genauer charakterisieren zu können, musste das Stoffgemisch fraktioniert werden. Dazu wurde eine HPLC-Analyse ohne Nachsäulenderivatisierung mit DMAZA durchgeführt und die Bestandteile parallel zum Chromatogramm mittels eines Fraktionensammlers in 1,5 ml Eppendorfgefäßen mit einer Laufzeit von je 2 Minuten aufgefangen. Der Vorgang der Fraktionierung wurde neun mal wiederholt und Aliquots mit gleichen Peaks vereint. Diese Fraktionen wurden in einem Rotationsverdampfer bis zur Trocknung eingeengt und dann wieder in 50 µl Methanol aufgenommen, bevor sie sowohl dünnschichtchromatographisch untersucht als auch einer enzymatischen Hydrolyse unterzogen wurden.

#### **2.2.5 Dünnschichtchromatographische Untersuchungen**

##### **Flavanole**

Für den Nachweis von Flavanolen wurden die zu identifizierenden fraktionierten Proben auf Kieselgel-DC-Platten aufgetragen und eindimensional mit einem Laufmittel mit Butanol:Eisessig:Wasser Oberphase = 4:1:5 aufgetrennt. Die Platten wurden mit

DMAZA (1%) in 6M Salzsäure:Ethanol = 1:1 besprüht, wodurch die einzelnen Komponenten visualisiert werden konnten. Die Substanzen wurden nach ihrem Polymerisationsgrad sowie nach ihrer Anzahl an OH-Gruppen aufgetrennt. Monomere Verbindungen wiesen höhere R<sub>f</sub>-Werte auf als oligomere.

### **Hydroxyzimtsäure-Derivate**

Die Fraktionen, die zu den Hydroxyzimtsäure-Derivaten gehörten, ließen sich auf Cellulose-DC-Platten (Macherey-Nagel) im Laufmittel Butanol:Eisessig:Wasser Oberphase = 4:1:5 auftrennen. Die Bestimmung erfolgte durch paralleles Auftragen von Vergleichssubstanzen (p-Cumarsäure, Protocatechusäure, Gallussäure, Resveratrol, Piceid, Quercetin, Vanillinsäure, Catechin, Epicatechin, Epicatechingallat, Procyanidin B3), Vergleichen des Farbverhalten unter UV-Licht und der Farbveränderungen durch Ammoniakbegasung und Besprühen mit Benedicts Reagenz.

### **Resveratrol-Derivate**

Die Auftrennung der Stilben-Fraktionen erfolgte ebenfalls auf Cellulose-Platten mit BAW-Laufmittel. Vergleiche des Farbverhaltens unter UV-Licht und der Farbveränderungen durch Ammoniakbegasung und durch ein Besprühen mit dem Naturstoffreagenz (Diphenylborsäure-β-aminoethylester, Firma Roth) 1% in Methanol plus 5% Polyethylenglucoll 400 mit parallel aufgetragenen Referenzsubstanzen (Resveratrol und Piceid), ermöglichten eine Bestimmung.

### **2.2.6 Co-Chromatographie**

Für die Charakterisierung einiger Flavanole und Hydroxyzimtsäure-Derivate konnte auf Arbeiten von TREUTTER et al. (1994) und MAYER (1995) zurückgegriffen werden. Die phenolischen Verbindungen wurden mittels Co-Chromatographie mit Reinsubstanzen wie Catechin, Epicatechin, p-Cumarsäure, Resveratrol (Roth) sowie Piceid (aufgereinigt von Dr. W. Heller, Biochemische Pflanzenpathologie der GSF Neuherberg) und B1, B5 und E-B5 (aufgereinigt von Prof. Treutter) identifiziert. Parallel dazu wurden die einzelnen Verbindungen mittels Diodenarray-Detektor bezüglich ihre UV-Spektren charakterisiert. Unbekannte Substanzen und deren aus den enzymatischen Hydrolysen resultierenden Spaltprodukte wurden mit gleichen Methoden näher charakterisiert.

### **2.2.7 Enzymatische Hydrolyse**

Zur näheren Charakterisierung der isolierten phenolischen Verbindungen wurden enzymatische Hydrolysen durchgeführt. Dabei wurde zum einen Tannase, zur unspezifischen Abspaltung jeglicher Zuckerverbindungen, und zum anderen β-Glucosidase,

zur spezifischen Abspaltung von Glucose, verwendet. Dazu wurde 1 ml eines Weinkallusextraktes wie unter 3.1 beschrieben zur Trocknung eingeeengt und anschließend in 300 ml Na-Acetatpuffer (0,1 M, pH 4,6) aufgenommen. Anschließend wurden 2 mg Tannase bzw.  $\beta$ -Glucosidase zugegeben. Die Hydrolyse erfolgte im Wasserbad bei 37°C über eine Dauer von 17 Stunden. Die Reaktion wurde dann mit 100 ml Methanol abgestoppt und die Probe dreimal mit 500 ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Die Ethylacetatphase wurde zur Trocknung eingeeengt und in 100  $\mu$ l Methanol aufgenommen um dann für die HPLC-Analyse, die Diodenarray-Untersuchung und die Dünnschichtchromatographie zur Verfügung zu stehen.

## 2.3 Ergebnisse

### 2.3.1 Charakterisierung von konstitutiven, phenolischen Verbindungen

Um die einzelnen Substanzen zu identifizieren, wurden Ergebnisse aus der UV-Spektroskopie, der HPLC-Analyse, der Dünnschichtchromatographie und der Co-Chromatographie miteinander verglichen. Zusätzlich wurden die durch enzymatische Hydrolyse erlangten Spaltprodukte mit oben genannten Untersuchungsmethoden ausgewertet.

#### 2.3.1.1 Flavanole

Das in Abbildung 9 dargestellte Chromatogramm des Weinkallus der Sorte „Regent“ zeigt das charakteristische Flavanolmuster der Weinkalli nach der Derivatisierung mit DMAZA (Detektion 640 nm). Die einzelnen Substanzen konnten mittels Co-Chromatographie mit den jeweiligen Reinsubstanzen identifiziert werden. Ferner waren die UV-Spektren (siehe Abbildung 11 Spektrum 1) und die Farbreaktionen der dünnschichtchromatographischen Untersuchung nach dem Besprühen mit DMAZA-Reagenz identisch mit denen der Reinsubstanzen. Die einzelnen Verbindungen sind in Tabelle 5 dargestellt.

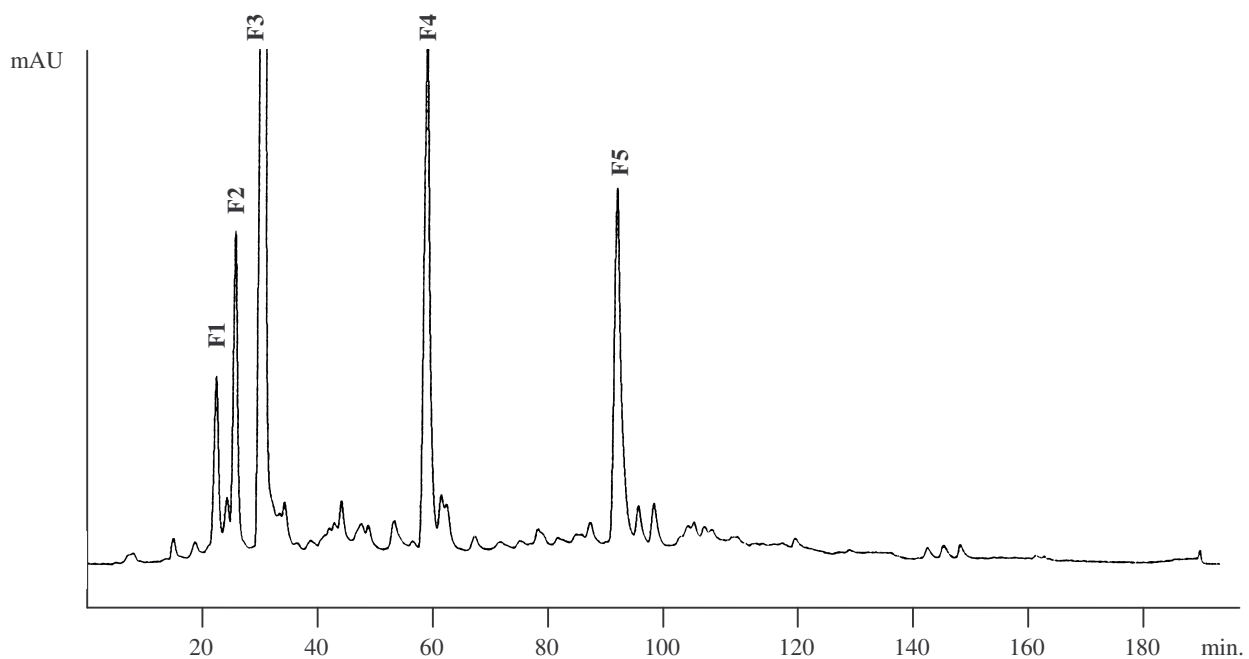


Abbildung 9: Flavanolmuster von Weinkalli der Sorte „Regent“ (UV-Detektion bei 640 nm nach Derivatisierung mit DMAZA)

Tabelle 6: Identifizierung der monomeren- und oligomeren Catechine im Weinkallus der Sorte „Regent“ (Detektion bei 640 nm nach der Nachsäulenderivatisierung mit DMAZA)

Peak	Trivialname	Struktur	UV-Absorption $\lambda_{\max}$ [nm]	Retentionszeit [min]
F1	Procyanidin B3	Catechin- (4 $\beta$ →8)-Catechin	276	26,6
F2	Procyanidin B1	Epicatechin-(4 $\beta$ →8)-Catechin	278	23,6
F3	Catechin	2,3 trans-Flavan-3-ol	278	30,2
F4	Epicatechin	2,3 cis-Flavan-3-ol	278	55,2
F5	Epicatechin-3-O-Gallat		274	84,2

Auch in einem Chromatogramm ohne Nachsäulenderivatisierung mit DMAZA detektiert bei 280 nm sind die identischen Flavanole zu erkennen. Die in Abbildung 10 mit Peak E, G, H und S bezeichneten Verbindungen stimmen mit den in Abbildung 9 dargestellten Substanzen B3, B1, Catechin, Epicatechin und Epicatechingallat in chronologischer Abfolge überein. Alle diese Substanzen weisen typische Flavanol-Spektren auf, wie in Abbildung 11 Spektrum 1 dargestellt.

Die Spektren der Peaks O und P erscheinen wie die Spektren der Flavanole, sind jedoch nach einer Nachsäulenderivatisierung mit DMAZA bei 640 nm nicht zu detektieren. Bei der dünnschichtchromatographischen Untersuchung erscheint die Substanz O nach Besprühen mit dem DMAZA-Reagenz grün, die Substanz P dagegen blau.

### 2.3.1.2 Benzoessäuren

Mittels Co-Chromatographie konnte Peak C als Protocatechusäure und Peak M als Vanillinsäure identifiziert werden. Das UV-Spektrum von Peak B (Abbildung 11 Spektrum 2) und die Retentionszeit von 7,2 Minuten ähneln der Gallussäure, das UV-Absorptionsmaximum von 278 nm weicht jedoch von der Referenzsubstanz ab. Die Identifizierung der Verbindung, z.B. als Gallussäure-Derivat war nicht Gegenstand dieser Arbeit.

### 2.3.1.3 Resveratrol-Derivate

Peak Z konnte anhand einer Referenzsubstanz als trans-Piceid und Peak EE anhand eines UV-isomeren trans-Piceid-Standards als cis-Piceid bestimmt werden. Die Co-Chromatographie von Peak FF stimmte mit trans-Resveratrol überein.

Absorbtion mAU

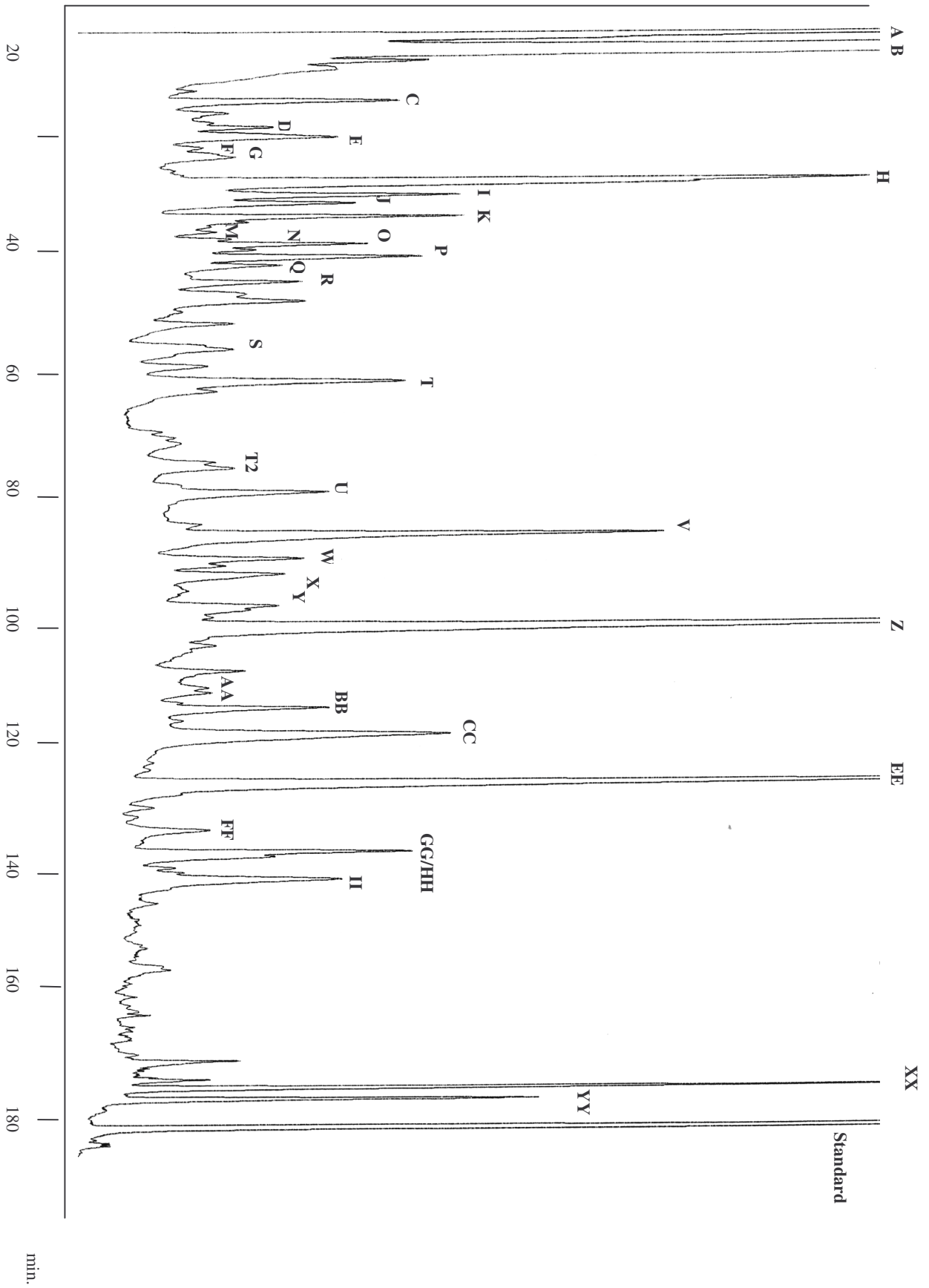


Abbildung 10: Phenolmuster von Weinkalli der Sorte „Regent“

(UV-Detektion bei 280 nm)



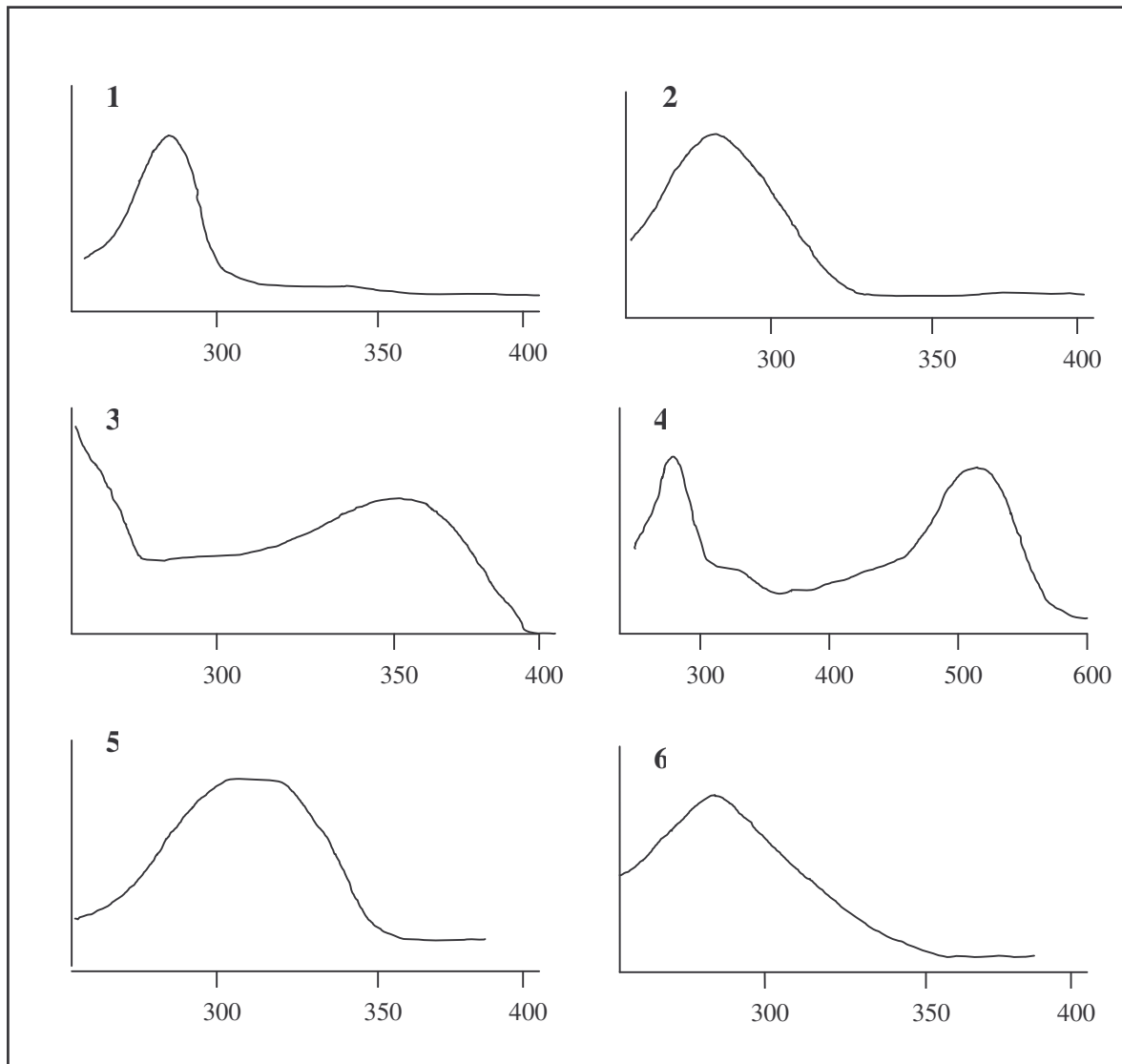
### Weitere Resveratrol-Derivate

Andere Substanzen, die nicht mittels Co-Chromatographie identifiziert werden konnten, zeigten Spektren, die mit denen von Resveratrol vergleichbar sind. UV-Spektren wie cis-Stilbene (siehe Abbildung 11 Spektrum 6) wiesen die Peaks J, Y und EE auf. Identisch mit den trans-Stilbenen (siehe Abbildung 11 Spektrum 5) waren die UV-Spektren der Peaks T, X, Z und FF.

Einige Verbindungen dieser Stoffklasse wurden durch enzymatische Hydrolysen in Aglykone reduziert. Die Daten dieser Verbindungen sind in Tabelle 8 dargestellt.

*Tabelle 7: Absorptionseigenschaften von Resveratrol-Derivaten vor und nach einer enzymatischen Hydrolyse*

Peak	Ursprüngliche Substanz			Spaltsubstanzen nach enzymatischer Hydrolyse		
	Trivialname	UV Absorption $\lambda_{\max}$ [nm]	Retentionszeit [min]	Trivialname	UV Absorption $\lambda_{\max}$ [nm]	Retentionszeit [min]
T	Resveratrol-Derivat	302, 310	57,1	trans-Resveratrol	302, 314	142,2
				cis-Resveratrol	282	147,4
X	Resveratrol-Derivat	300, 308	89,0	trans-Stilben		136,3
				cis-Stilben		142,5
Z	trans-Piceid	304, 314	101,2	trans-Resveratrol	302, 314	139,3
				cis-Resveratrol	282	145,0
EE	cis-Piceid	282	124	trans-Resveratrol	302, 314	136,5
				cis-Resveratrol	282	140,9
FF	trans-Resveratrol	302, 314	136,2	trans-Resveratrol	302, 314	137,6
				cis-Resveratrol	282	142,0



UV-Spektrum	Peaks mit diesem UV-Spektrum	UV-Spektrum entspricht	UV-Spektrum	Verbindung mit diesem UV-Spektrum	UV-Spektrum entspricht
1	E, G, H, S, V	Catechin	4	BB,II	Anthocyan
2	B	Gallussäure-D.	5	T,X,Z,FF	trans-Resveratrol-D
3	HH, T2	Quercetin-Glucosid	6	J,Y,Z0, Z1, Z2, EE	cis-Resveratrol-D.

Abbildung 11: UV-Spektren verschiedener Verbindungen aus Weinkallus

Die UV-Spektren von Peak XX und YY konnten nicht eindeutig zugeordnet werden. Beide weisen ein Maximum bei 282 nm und ein kleineres Maximum bei 310 nm auf, was entweder für die Überlagerung zweier Verbindungen spricht oder für eine Substanz, die ein Absorptionsverhalten aufweist, das sowohl dem eines cis-Resveratrols als auch dem eines trans-Resveratrols oder aber einer weiteren Substanz entspricht. Peak XX erscheint nach einer Retentionszeit von 176,2 Minuten, Peak YY wird nach 178,1 Minuten detektiert.

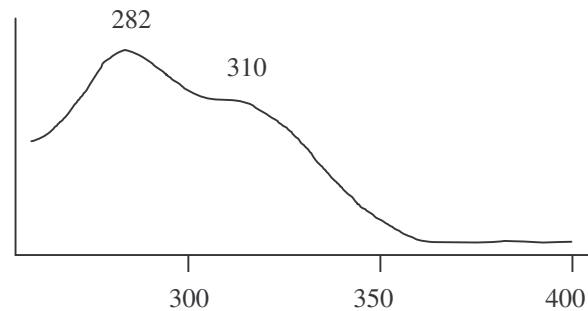


Abbildung 12: UV-Spektrum von Peak XX und Peak YY

### Einfache Phenole mit Spektrum 2

Die Verbindungen I, K, N und U wurden als „einfach Phenole mit Spektrum 2“ bezeichnet, da sie keiner Stoffgruppe eindeutig zugewiesen werden konnten. Aufgrund ihrer frühen Retentionszeit, wurden sie mit den einfachen Phenolen verglichen. Das Vorhandensein von zwei Absorptionsmaxima im UV-Spektrum wies dabei auf eine Überlagerung zweier Verbindungen hin, von denen das erste Maximum mit 282 nm dem eines cis-Resveratrol- oder Pallidol-Derivates glich. Bei Peak I erschien ein weiteres Maximum bei ca. 305–307 nm. Während Peak K einen UV-Spektrenverlauf wie ein cis-Resveratrol-Derivat aufwies, allerdings mit einem Maximum bei 278 nm, zeigte Peak N ein Maximum bei 280 nm und ein weiteres bei 308 nm. Auch das Spektrum von Peak U verlief, ausgehend von einem Absorptionsmaximum bei 282 nm, wie ein cis-Resveratrol-Derivat, zeigte jedoch ein weiteres bei 320 nm, was für die Überlagerung zweier Verbindungen spricht. Der Absorptionsverlauf gleicht dem in Abbildung 12 dargestellten UV-Spektrum.

Peak I zeigte bei der dünnschichtchromatographischen Auswertung unter UV-Bestrahlung einen violetten Fleck. Nach dem Besprühen mit Naturstoffreagenz zeigte sich ein weiterer, pinkfarbener Fleck. Die Peaks K und N zeigten durch eine Begasung mit Ammoniak einen leuchtend blauen Fleck, der bei beiden Verbindungen identische Laufhöhen aufwies. Die gleiche Reaktion zeigte der Peak P, der den Pallidol-Derivaten zugeordnet wurde, jedoch eine geringere Laufhöhe hatte. Der Peak U zeigte wie Peak I unter UV-Bestrahlung einen violetten Fleck. Eine Behandlung mit Naturstoffreagenz ließ einen weiteren, rot fluoreszierenden Fleck erscheinen.

### 2.3.1.4 Flavonole

Die Substanzen HH und T2 wiesen Spektren auf, die dem eines Quercetin-Glycosides entsprachen (siehe Abbildung 11 Spektrum 3). Die Verbindung T2 wird nach einer Retentionszeit von 77,3 Minuten detektiert, Peak HH bei 144,7 Minuten. Peak T2 wies eine maximale Absorption um 250 nm und eine bei 354 nm auf, Peak HH zeigte seine Absorptionmaxima bei 260 nm und 354 nm. Die Flavonole konnten nicht in jeder Versuchsreihe nachgewiesen werden.

### 2.3.1.5 Anthocyane

Das UV-Spektrum der Anthocyane ist in Abbildung 11 Spektrum 4 zu finden und ist mit dem der Peaks BB und II identisch. Peak BB wurde nach einer Retentionszeit von 117,6 Minuten, Peak II nach 141,7 Minuten detektiert. Beide wiesen ein Absorptionsmaximum bei 278 nm und eins bei 513 nm auf. Bei 322 nm erschien eine kleine Schulter. Da diese Verbindungen nur in geringen Mengen im Weinkallus gefunden wurden und keine gravierende Akkumulation nach einer Elicitation sichtbar war, wurden diese Anthocyane nicht genauer identifiziert.

## 2.3.2 Charakterisierung von induzierten phenolischen Verbindungen

Durch eine Elicitation des Weinkallus „Regent“ mit Hefe wurden neue Substanzen induziert. Abbildung 14 stellt ein HPLC-Chromatogramm eines Weinkallus 24 Stunden nach einer Elicitation dar. Die neu synthetisierten Substanzen sind durch rote Pfeile und mit Großbuchstaben gekennzeichnet.

### Peak DD und DD1

Diese beiden Verbindungen unterschieden sich nur geringfügig voneinander. Während Peak DD bei einer Retentionszeit von 119,4 Minuten detektiert wurde, erschien Peak DD1 bei 120,2 Minuten. Auch ihre UV-Spektren verliefen nahezu identisch mit einer maximalen Absorption von 280 nm bei Peak DD und 282 nm bei Peak DD1.

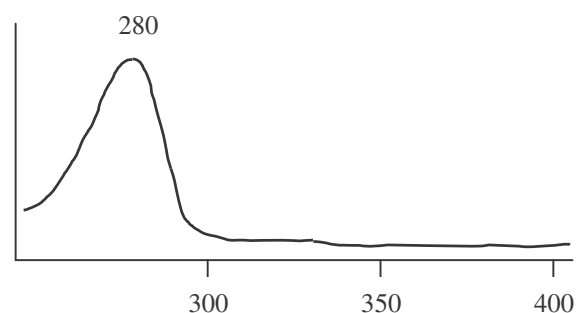


Abbildung 13: UV-Spektrum von Peak DD

Sowohl der Verlauf des UV-Spektrums als auch die Blaufärbung nach dem Besprühen mit DMAZA-Lösung bei der dünnschichtchromatographischen Untersuchung der Lösung erinnerten an ein Flavan-3-ol. Bei der Nachsäulenderivatisierung mit DMAZA war jedoch bei der 640 nm Detektion kein Peak zu erkennen.

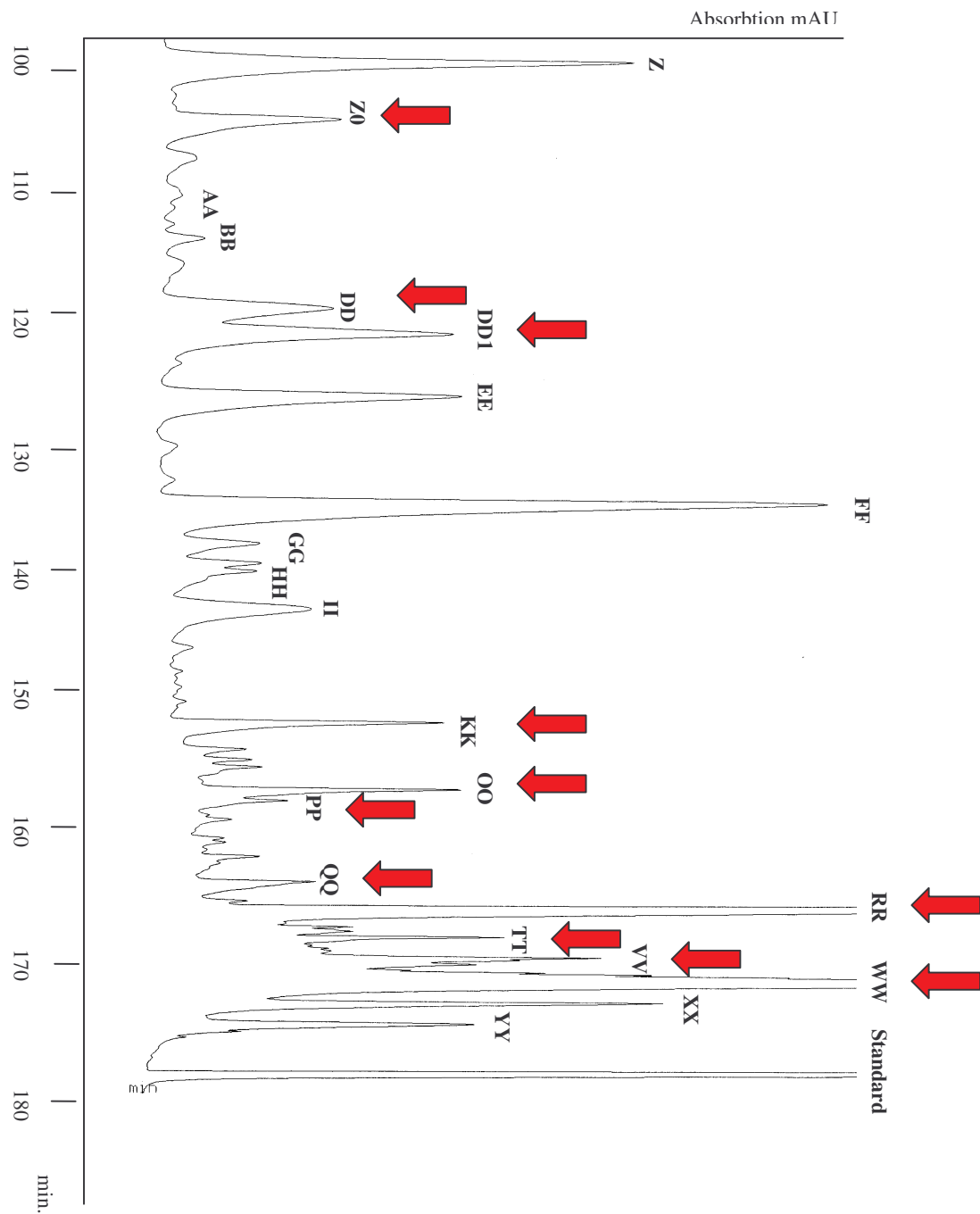


Abbildung 14: Phenolmuster von Weinkallus „Regent“ 24 Stunden nach einer Elicitation mit *Aureobasidium pullulans* Kulturfiltrat (UV-Detektion bei 280 nm)

**Peak KK** (Abbildung 15)

Diese Substanz wird bei einer Retentionszeit von 150,9 Minuten detektiert und weist ein UV-Spektrum auf, das sowohl einem trans-Resveratrol-Derivat gleicht (Maxima 302 nm und 320 nm) als auch zusätzlich ein Maximum bei 286 nm zeigt. Aus dem Chromatogramm geht hervor, dass hier zwei Substanzen übereinander liegen. Eine Aufspaltung dieser Verbindung durch enzymatische Hydrolyse spaltete eine Verbindung mit einer Retentionszeit von 158,0 Minuten ab, die ein UV-Absorptionsmaximum bei 278 nm hat und deren Verlauf einem cis-Stilben ähnelt.

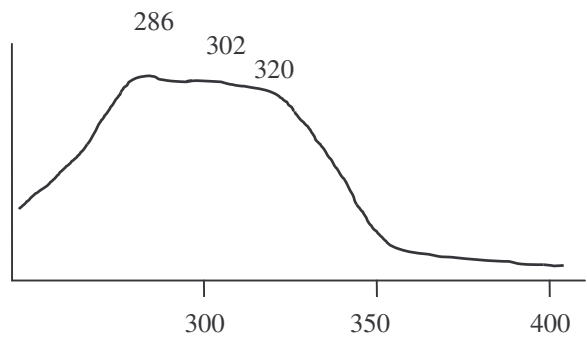


Abbildung 15: UV-Spektrum von Peak KK

**Peak OO** (Abbildung 16)

Das UV-Spektrum dieser Substanz entspricht dem eines cis-Resveratrol-Derivates mit einem Maximum bei 282 nm.

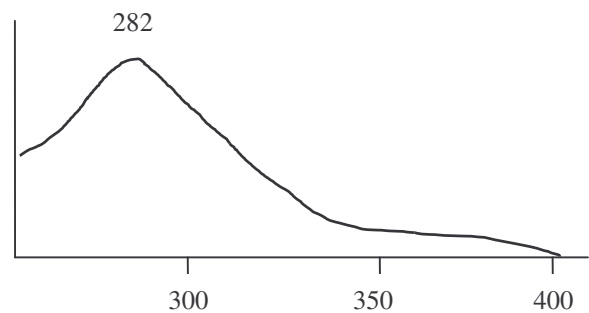


Abbildung 16: UV-Spektrum von Peak OO

**Peak QQ** (Abbildung 17)

Auch bei dieser Verbindung deutet das UV-Spektrum auf eine Überlagerung von einem trans-Stilben mit einem Absorptionsmaximum von 318 nm und einer Verbindung mit einem Maximum von 284 nm hin.

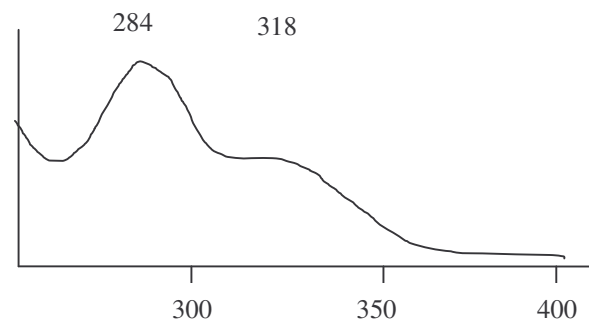


Abbildung 17: UV-Spektrum von Peak QQ

**Peak RR** (Abbildung 18)

Die Substanz RR weist ein UV-Maximum von 320 nm auf und erscheint bei einer Retentionszeit von 166,5 Minuten. Bei einer enzymatischen Hydrolyse entsteht zusätzlich zu dem Ausgangsprodukt eine Verbindung, die bei einer Retentionszeit von 160,6 Minuten detektiert wird und ein UV-Spektrum mit einem Maximum von 276 nm aufweist, was dem eines cis-Resveratrols ähnelt.

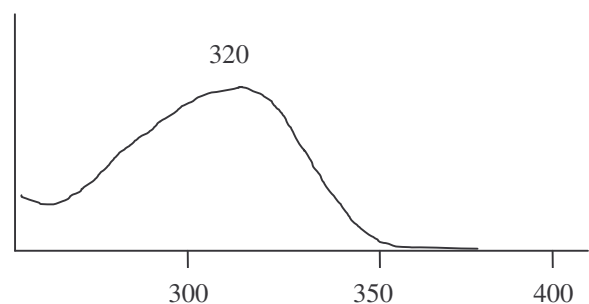


Abbildung 18: UV-Spektrum von Peak RR

**Peak TT** (Abbildung 19)

Die Substanz TT weist ein UV-Maximum bei 284 nm und ein kleineres bei 320 nm auf.

Die Verbindung erscheint bei einer Retentionszeit von 169,5 Minuten.

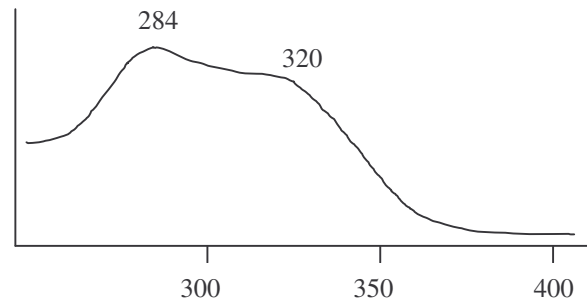


Abbildung 19: UV-Spektrum von Peak TT

**Peak VV und WW** (Abbildung 20)

Die Substanzen VV und WW weisen identische UV-Spektren mit einem Absorptionsmaximum bei 308 nm auf. Peak VV erscheint bei einer Retentionszeit von 174,9 Minuten, Peak WW bei 175,2 Minuten.

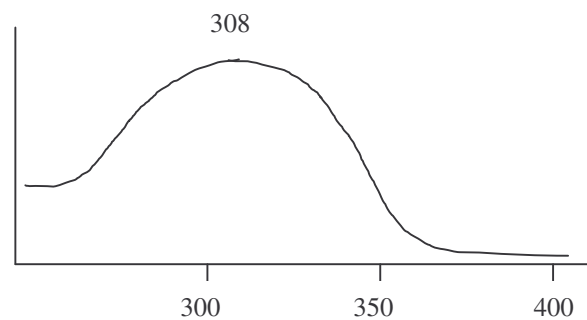


Abbildung 20: UV-Spektrum von Peak VV und Peak WW

Eine enzymatische Hydrolyse von Peak WW verändert das UV-Spektrum der Verbindung bei gleichbleibender Retentionszeit. Ein Absorptionsmaximum von 282 nm erinnert eher an ein cis-Resveratrol-Derivat, obgleich das Spektrum so aussieht, als ob diese Substanz von einer weiteren überlagert wird. (Abbildung 21).

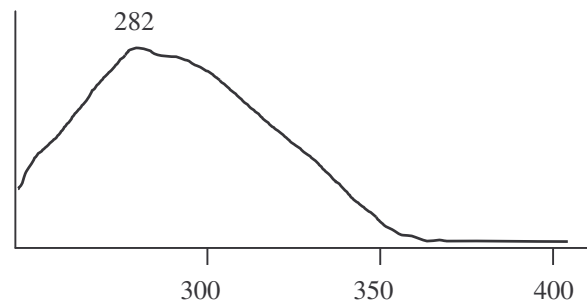


Abbildung 21: UV-Spektrum von Peak WW nach enzymatischer Hydrolyse

## 2.4 Diskussion

### 2.4.1 Catechine

Das Vorhandensein von Verbindungen wie Procyanidin B3, Procyanidin B1, Catechin, Procyanidin B2, Epicatechin im Weinkallus der Sorten „Nero“ und „Regent“ stimmt mit den Angaben von FEUCHT et al. (1996) und SGARBI et al. (2003) überein, die beim Weinkallus von „Riesling“ und „Dornfelder“ beziehungsweise „Lambrusco“ identische Flavanole identifiziert haben. Die zusätzlich in den Blättern vorkommenden Verbindungen B4, B7 und C1 waren auch bei diesen Untersuchungen nicht im Kallus zu finden. Neben den oben genannten Verbindungen wurde wie in den *Vitis vinifera*-Zellsuspensionskulturen von DECENDIT und MERILLON (1996), WAFFO-TEGUO et al. (1996a, b, 2000), KRISA et al. (1999), VITRAC et al. (2001b) und DECENDIT et al. (2002), sowie bei den Kalluskulturen von FEUCHT et al. (1996, 1998) auch in dieser Versuchsreihe Epicatechin-3-O-Gallat identifiziert. Das Gallo-Derivat der Flavan-3-ole, Epicatechin-[4 $\beta$ -8]-Epicatechin-3-O-Gallat, wie es DECENDIT et al. (2002) in Zellkulturen identifizierten, wurde hingegen nicht gefunden.

### 2.4.2 Hydroxyzimtsäuren

Die Synthese von phenolischen Säuren ist im Weinkallus gegenüber dem Blatt- und Fruchtgewebe sehr eingeschränkt. Protocatechus- (Peak C) und Vanillinsäure (Peak M) kommen in den hier untersuchten Kulturlinien nur in geringem Maße vor. Ein Gallussäurederivat ist der Hauptvertreter der einfachen phenolischen Säuren und kommt in großer Menge vor. Veresterungen von Weinsäure mit p-Cumar- oder Kaffeesäure, wie sie in Weinblättern (RAPP und ZIEGLER 1973; BACHMANN 1978) und Früchten (BARANOWSKI und NAGEL 1981; GOETZ et al. 1999; REVILLA et al. 2000) vornehmlich zu finden sind, wurden in beiden Weinkallussorten nicht identifiziert.

Auch SGARBI et al. (2003) fanden in Zellkulturlinien von *Vitis vinifera* „Lambrusco salamino“ p-Cumar-, Kaffee- und Ferulasäure nur in unveresterter Form.

Die Substanz Peak L weist ein UV-Spektrum auf, das dem von p-Cumarsäure nahe kommt, doch kann das UV-Maximum von 312 nm, ähnlich wie im Apfelblatt (RÖMMELT 2001), eher einer p-Cumaroylglucose zugeordnet werden. VITRAC et al. (2001a) identifizierten in Rotweinen ein trans-p-Cumaroyl 6''-Glucosid, welches nach SHIMOMURA (1988) in *Prunus buergeriana* gefunden wurde.

Das Aglykon der p-Cumarsäure wird nach einer Retentionszeit von 61.8 Minuten detektiert. Bei der gleichen Retentionszeit wird auch Peak T detektiert, dessen UV-Spektrum aber eher dem eines trans-Resveratrol-Derivates entspricht (302, 310 nm Absorptionsmaximum). Somit kann man das Vorkommen von ungebundener p-Cumarsäure in dieser Versuchsreihe ausschließen. Auch Kaffee-, Ferula- und Syringasäure sowie Tyrosol konnten nicht in ungebundener Form gefunden werden.



### 2.4.3 Anthocyane

Wie schon HIRASUNA et al. (1991), DECENDIT et al. (1996), LARRONDE et al. (1998) und VITRAC et al. (1999) beschrieben haben, werden die farbgebenden Anthocyandine auch in Zellsuspensionskulturen von *Vitis vinifera* und somit auch im Kallus synthetisiert. Dabei weisen aber nur einzelne Zellen im Kallusklumpen starke Rotfärbungen auf, alle anderen erscheinen weiß. Durch diesen starken Verdünnungseffekt ergibt sich in der hier dargestellten Untersuchungsreihe nur ein geringer Anthocyanidin-Gehalt im Extrakt. Nach HIRASUNA et al. (1991) lassen sich die Anthocyanidin-Gehalte in den Zellen durch Modifikation der Medien erhöhen. Die Identifikation dieser Pigmente war nicht Gegenstand dieser Untersuchungsreihe. Es ist jedoch anzunehmen, dass die zwei vorkommenden Anthocyane, Peak BB und Peak II, Cyanidin-3-Glucosid, Peonidin-3-Glucosid oder Malvidin-3-Glucosid zugeordnet werden können, wie es DECENDIT et al. (1996) in Zellkulturen der Weinsorte „Gamay Freaux“ var. Teinturier gelang.

### 2.4.4 Stilbene

#### 2.4.4.1 Monomere Resveratrol-Derivate

Trans-Resveratrol wurde im Wein erstmals von SIEMANN und CREASY (1992) isoliert. Dass Kalluskulturen und daraus resultierende Zellsuspensionskulturen Resveratrol-Derivate akkumulieren können, zeigten WAFFO-TEGUO et al. (1996a, b) und VITRAC et al. (1999, 2001b), die trans-Resveratrol, trans-Piceid und cis-Piceid nachwiesen. Diese Ergebnisse stützen die Identifikation von Peak Z als cis-Piceid, Peak EE als trans-Piceid und Peak FF als trans-Resveratrol bei den Kalluskulturen „Nero“ und „Regent“.

Trans- und cis-Piceid sind bei den untersuchten Kallusisolaten wie auch in den Zellkulturen von DECENDIT et al. (1996) und WAFFO-TEGUO (1996b) die dominanten Stilbene. Dabei scheint das Piceid das einzige Stilben zu sein, das unter natürlichen Bedingungen in der cis-Konfiguration vorkommt. Die cis-Konfigurationen der anderen Stilbene werden nach ADRIAN et al. (2000b) ausschließlich bei Extraktion unter Lichteinfluss induziert und beruhen somit auf Fehler in den Arbeitstechniken bei der Extraktion. LANGCAKE und PRYCE (1976) beschrieben die hohe Empfindlichkeit von Resveratrol gegen Licht und Luft beim Extraktionsvorgang und zeigten eine Ausschaltung von Oxidationsprozessen durch Aufkonzentration der Extrakte unter Stickstoff. Dabei führten Einengungen unter Vakuum zur Bildung einer Vielzahl neuer Verbindungen. Diese Beobachtungen konnten in der hier dargestellten Untersuchungsreihe nicht bestätigt werden. Ein Aufkonzentrieren der Extrakte im Rotationsverdampfer führte nur zur Bildung einer vernachlässigbaren Menge neuer Substanzen.

#### 2.4.4.2 Oligomere Resveratrol-Derivate

Die Verbindungen O, P, DD und DD1 weisen UV-Spektren auf, die denen der Flavanole ähnlich sind, bilden aber mit DMAZA keine Komplexe, die bei der Nachsäulenderivatisierung bei 640 nm detektiert werden konnten. Dass aber eine chemische Reaktion zwischen den Verbindungen und dem DMAZA statt findet, zeigt eine Grünfärbung von Peak O durch Besprühen mit DMAZA und eine Blaufärbung der Substanzen P, DD und DD1 nach gleicher Behandlung bei der dünnschichtchromatographischen Untersuchung. Während sowohl monomere als auch oligomere Flavanole konstitutiv im Weinkallus vorkommen und nur mäßig durch eine Hefebehandlung induziert werden, kommen die oben genannten Verbindung nur in geringem Maß konstitutiv vor und erfahren nach einer Elicitation eine starke Akkumulation.

Betrachtet man nun die UV-Spektren dieser vier Verbindungen genauer, stellt man geringfügige Abweichungen im Vergleich zum Catechin fest (Abbildung 22 A). Das Absorptionsmaximum der Verbindungen DD und DD1 verzögert sich im Vergleich zum Catechin und der Spektrumverlauf ist etwas breiter, was zum späteren Absinken der Absorptionsfähigkeit führt.

Die UV-Spektren von Peak O und P sind nahezu identisch mit einem Absorptionsmaximum von 276 nm respektive 278 nm bei Peak P. Die Spektrungsverläufe beider Verbindungen stimmen mit dem von Pallidol überein (Abbildung 22 C). Eine leichte Abweichung liegt in dem etwas spitzeren Verlauf im Bereich des Absorptionsmaximums bei Peak O und P vor. Das unregelmäßige Auslaufen des Spektrums von Peak O ist auf Verunreinigungen und einer geringeren Konzentration in dieser Fraktion zurückzuführen.

Es ist nicht unwahrscheinlich, dass Pallidol-Derivate in Weinkalluskulturen vorkommen. LANGCAKE and PRYCE (1977a) sowie JEANDET et al. (1997a) isolierten zwei dimere Resveratrol-Derivate, Pallidol 3-O-glucosid und Pallidol-3,3''-O-Diglucosid, aus mit *Botrytis cinerea* infizierten Weinblättern. Pallidol wurde auch schon bei *Vitis vinifera*-Zellsuspensionskulturen isoliert (WAFFO-TEGUO et al. 2000).

Da DELAUNAY et al. (2002) aus Weinstängeln der Sorte „Merlot“ neben anderen Resveratrol-Derivaten auch Pallidol isolierten und die hier verwendeten Weinkalluskulturen aus Internodienscheibchen von Weinstängeln gewonnen wurden, liegt die Vermutung nahe, dass auch die Weinkalluskultur befähigt ist, Pallidol-Derivate zu synthetisieren.

Neben den monomeren- und dimeren-Resveratrol-Derivaten wurden noch eine Vielzahl oligomere Resveratrol-Derivate für *Vitis vinifera* beschrieben, die auch im Weinkallus synthetisiert werden könnten. Nach LANDRAULT (2002) kommen Viniferine nur in Rotweinsorten vor. Zwei dieser Verbindungen wurden schon gut charakterisiert:  $\epsilon$ -Viniferin, ein Resveratrol-Dehydrodimer, und  $\alpha$ -Viniferin, ein cyclisches Resveratrol-Dehydrotrimer.

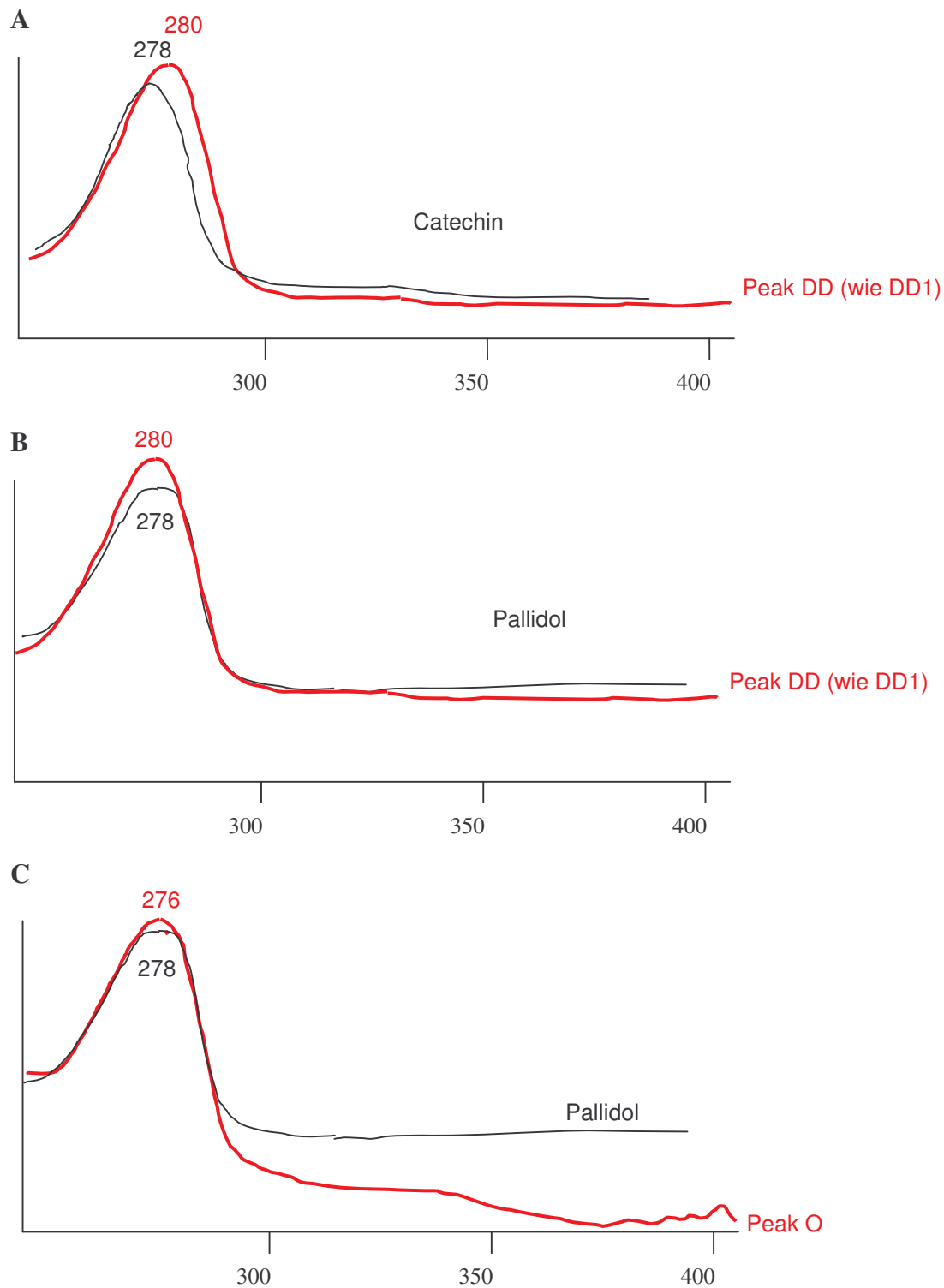


Abbildung 22: UV-Spektren methanolischer Extrakte von Peak DD verglichen mit **A**: Catechin (Standard) und **B**: Pallidol (Spektrum übernommen von LANDRAULT et al. 2002 ) und **C**: Peak O verglichen mit Pallidol

Das Vorkommen von  $\beta$ -Viniferin, einem cyclischen Resveratrol-Tetramer, und  $\gamma$ -Viniferin, einem Oligomer mit höherem Molekulargewicht, wurde bisher nur von LANGCAKE und PRYCE (1977b) beschrieben.  $\delta$ -Viniferin ist ein Isomer von  $\varepsilon$ -Viniferin. Es wird berichtet, dass diese Verbindung *in vitro* durch eine oxidative Dimerisation aus Resveratrol induziert die durch Pflanzenperoxidase oder pilzliche Laccase induziert wird (PEZET et al. 2003). Unter Verwendung von Meerrettich-Peroxidase (LANGCAKE und PRYCE 1977c) wird Resveratrol in ein Dehydrodimer, analog zum  $\varepsilon$ -Viniferin, umgewandelt, das sich aber in der Oxidationsbindung unterscheidet, da eine Hydroxyphenylgruppe an der 4'-Position beteiligt ist. Die Oxidation der 4-Hydroxystilbene wurde ausführlich von CALDERON et al. (1990, 1992) und MORALES et al. (1997) untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass die Oxidation von Resveratrol im Wein durch drei Peroxidase-Enzyme, A1 und B3 (befinden sich in der Zellwand und im zellfreien Raum) sowie B5 (befindet sich in der Vakuole), kontrolliert wird. Diese Enzyme sind allem Anschein nach sowohl an der konstitutiven als auch an der induzierbaren Abwehr von Pilzen beteiligt. Untersuchungen bezüglich der Veränderungen der Stilbenkonzentrationen in Weinblättern als Reaktion auf UV-C Bestrahlung haben gezeigt, dass die Kinetik der Resveratrol- und der  $\varepsilon$ -Viniferin-Bildung sehr ähnlich sind.

Vergleicht man in Abbildung 23 den Verlauf des UV-Spektrums einer methanolischen trans- $\delta$ -Viniferin-Fraktion (PEZET et al. 2003) mit dem von Peak RR, so kann man deutliche Parallelen, aber auch Unterschiede entdecken. Letztere sind, im Gegensatz zum Absorptionsmaximum von 327 nm und einer vorgelagerten Schulter bei 311 nm (PEZET et al. 2003a), bei Peak RR ein UV-Maximum bei 320 nm und eine nicht vorhandene Schulter. Zwar würde das bei Trans- $\alpha$ -Viniferin beobachtete Maximum bei 320 nm (LANDRAULT et al. 2002) dem von Peak RR entsprechen, doch hat das Viniferin bei 300 nm eine Schulter vorgelagert, die Peak RR fehlt. Aufgrund der guten Übereinstimmung im Spektrenverlauf kann Peak RR den Viniferinen zugeordnet werden.

Peak TT weist ein Spektrum auf, dessen zweites Absorptionsmaximum dem von trans- $\alpha$ -Viniferin entspricht, jedoch ähnelt das vordere Maximum eher cis-Viniferin. Da die trans- und cis-Isomere von oligomeren Resveratrol-Derivaten häufig dicht nebeneinander liegen, könnte es sich um eine Überlagerung von trans- und cis-Viniferinen handeln. Auch das Vorkommen von verschiedenen  $\alpha$ -Viniferinen wäre nicht verwunderlich. So berichteten CANTOS et al. (2002) von einem Extrakt mit vier  $\alpha$ -Viniferin und zwei  $\varepsilon$ -Viniferin ähnlichen Verbindungen, die sich in ihren Retentionszeit nur geringfügig unterscheiden.

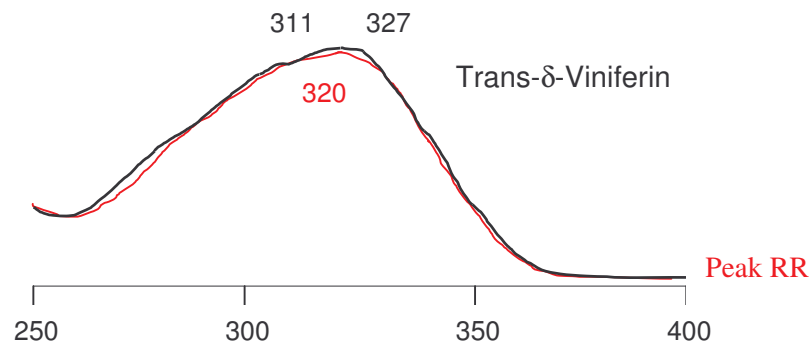


Abbildung 23: UV-Spektren methanolischer Extrakte von Peak RR verglichen mit trans- $\delta$ -Viniferin (Spektrum übernommen von PEZET et al. 2003)

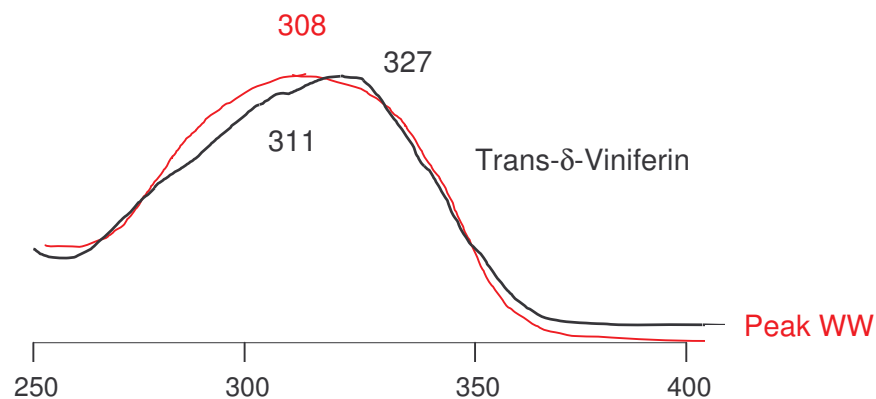


Abbildung 24: UV-Spektren methanolischer Extrakte von Peak WW verglichen mit trans- $\delta$ -Viniferin (Spektrum übernommen von PEZET et al. 2003)

Der sehr runde Spektrenverlauf von Peak VV und WW ist ungewöhnlich und kann nicht eindeutig einer Stoffgruppe zugeordnet werden. Gegen ein Pterostilben spricht die beobachtete hohe Konzentration. Nach (LANGCAKE et al. 1978) kommen Pterostilbene in mit *Botrytis cinerea* befallenen Blättern von *Vitis vinifera* nur in geringen Konzentrationen vor. Ferner sind Pterostilbene 3,5-dimethoxy-4'-hydroxy Stilbene, die in gesunden Pflanzen gar nicht vorkommen, durch pflanzliche Pathogene induzierbar (LANGCAKE et al. 1978, 1981; PEZET et al. 1989). Da mechanische Verletzungen keine Pterostilben-Synthese in Gang setzen, kann man von einer spezifischen Abwehrreaktion der Wirtspflanze sprechen.

Im Gegensatz zu Resveratrol und Viniferin, die sich sehr gut durch UV-Bestrahlung induzieren lassen, ist die Induktionsrate des Pterostilbens durch UV-Bestrahlung eher gering. Während eine Infektion des Blattes mit *Plasmopara viticola* eine Akkumulation dieses

Phytoalexins, das eine höhere fungizide Aktivität aufweist als das Viniferin, innerhalb von vier Tagen induziert (LANGCAKE et al. 1978, 1979), kann Pterostilben nach einer *Botrytis*-Infektion weder im Infektionsbereich selbst noch in seinem Umkreis festgestellt werden. Resveratrol und Viniferin hingegen akkumulieren deutlich. Im Stoffwechsel verläuft die Synthese von Pterostilben also unabhängig von der Viniferin-Synthese, die ihrerseits automatisch an das Vorhandensein von Resveratrol geknüpft ist (LANGCAKE et al. 1979). Folgt man der Annahme, dass die Synthese von Pterostilben so spezifisch ist, dass sich ihre Induktionsfähigkeit sogar bei verschiedenen Pathogenen unterscheidet, ist es in Kombination mit einem für Pterostilben unüblich hohen Gehalt, wie bei Peak WW beobachtet, sehr unwahrscheinlich, dass es sich nicht um ein Pterostilben handelt.

Piceatannol wurde nach DELAUNAY et al. (2002) in Samen und Früchten von *Vitis vinifera* (CANTOS et al. 2002, 2003) induziert. Im Weinkallus dieser Versuchsreihe konnte die Verbindung im Vergleich mit einem vorhandenen Standard nicht als Aglykon nachgewiesen werden.

In Abbildung 25 wurden Daten aus der Literatur mit vergleichbaren HPLC-Gradienten und den daraus resultierenden Retentionsreihenfolgen verschiedener Resveratrol-Derivate zusammengefasst und mit der Retentionsreihenfolge dieser Versuchsreihen verglichen. Dabei sind die Pallidol-ähnlichen Verbindungen grün, die trans-Resveratrol-Derivate rot und cis-Resveratrol-Derivate gelb gekennzeichnet. Die gelb/rot markierten Verbindungen stellen cis/trans-Gemische dar. Die blau gekennzeichneten Peaks stehen für die auffällig runden UV-Spektren, die hier mit den Viniferinen beziehungsweise den Pterostilbenen in Verbindung gebracht wurden. Die nicht farbig markierten Dreiecke auf der rechten Seite stellen Verbindungen dar, die in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen nicht vorhanden oder nicht eindeutig zuzuordnen waren.

Die Auswertung zahlreicher Chromatogramme legt nahe, dass auch Peak KK aus der Überlagerung zweier Verbindungen besteht, bei denen es sich um Viniferine handeln könnte. Das hintere Maximum könnte mit 320 nm ein  $\alpha$ -Viniferin, das vordere eine cis-Variante darstellen. Zur genaueren Identifikation, müssten mit den aufgereinigten Fraktionen massenspektroskopischen Untersuchungen, wie bei einer Vielzahl veröffentlichter Untersuchungen bereits geschehen, durchgeführt werden. In der Mehrzahl der Veröffentlichungen, die sich mit Inhaltstoffanalysen von *Vitis vinifera* beschäftigen, werden Untersuchungsmethoden wie Hochdruckflüssigkeitschromatographie, UV- und Massenspektroskopie parallel durchgeführt, um die chemische Struktur von Verbindungen exakter bestimmen zu können.

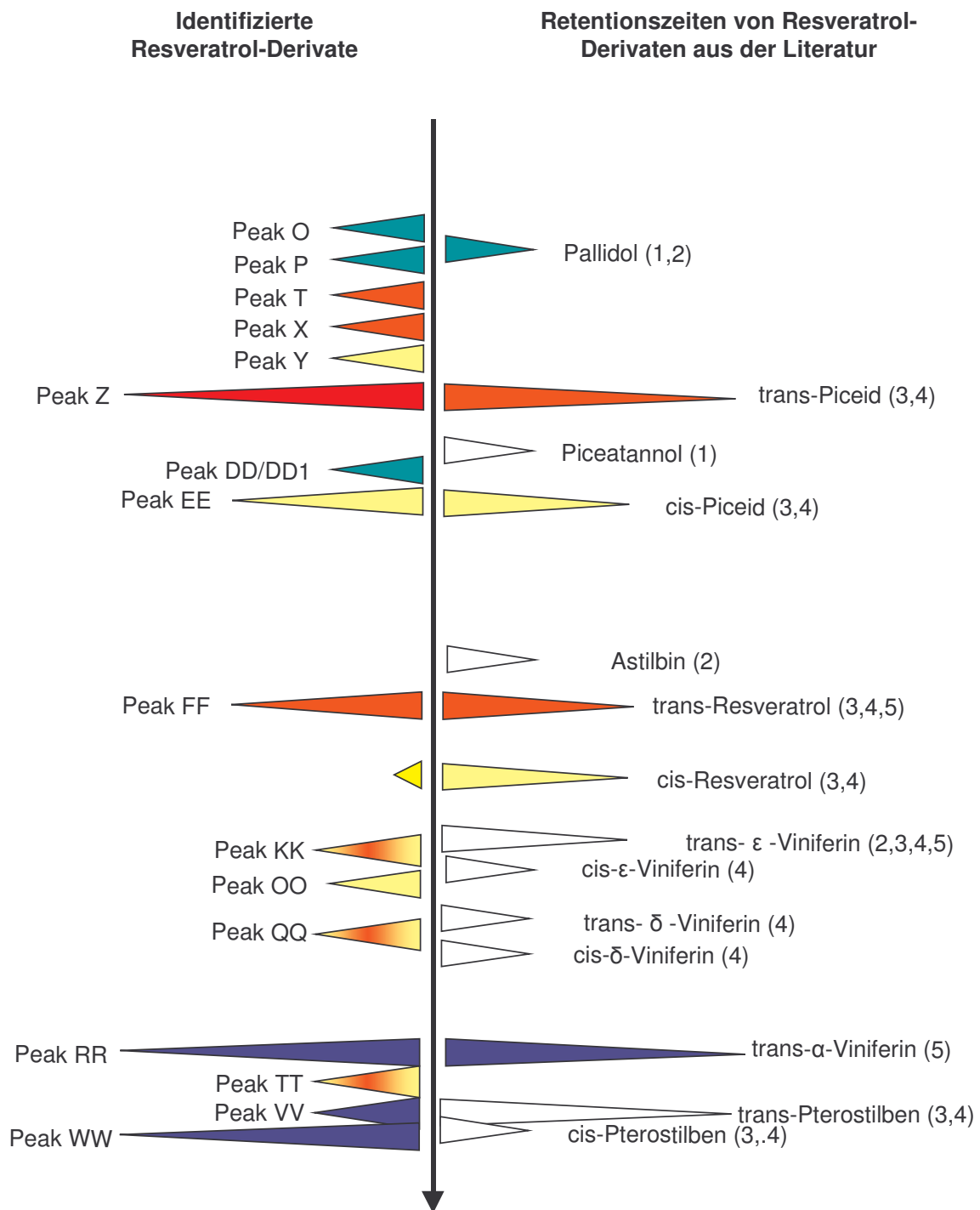


Abbildung 25: Vergleich von Resveratrol-derivat-Abfolgen aus der Literatur und den identifizierten Verbindungen

- 1 : DELAUNAY et al. 2002
- 2 : LANDRAULT et al. 2002
- 3 : JEANDET et al. 1997
- 4 : PEZET et al. 2003
- 5 : LANGCAKE et al. 1978

- cis-Resveratrol-Derivat
- trans-Resveratrol-Derivat
- Pallidol-Derivate
- trans/cis-Resveratrol-Derivat
- oligomeres Resveratrol-Derivat oder Pterostilben

Anhand aller zusammengeführten Daten ergaben sich in Tabelle 9 Zuordnungen von Resveratrol-Derivaten im Weinkallus der Sorten „Nero“ und „Regent“, die bezüglich ihrer Induzierbarkeit weiter untersucht wurden.

Ein gutes Indiz für das Vorkommen von Resveratrol-Derivaten sind die Untersuchungsergebnisse von Frau Judith Pfeifer am Lehrstuhl für Zierpflanzenbau der TU-München-Weihenstephan (Prof. Dr. Forkmann). Innerhalb einer Versuchsreihe konnte hier die signifikante Induktion der Stilbensynthase-Aktivität im Weinkallus der Sorte „Nero“ nachgewiesen werden (Pfeiffer, pers. Mitt.). Die quantitativen Untersuchungen der mRNA-Transkription anhand von Northern blots stehen allerdings noch aus.



Tabelle 8: Abschließende Zuordnung von Resveratrol-Derivaten mit Hilfe von Daten aus der Literatur

Stilbene	Aus der Literatur			Aus den Versuchen		
	Chemische Bezeichnung	UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ [nm]	Literatur	Peak	UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ [nm]	Retentionszeit [min]
Pallidol-Derivat		278	LANDRAULT et al. 2002	O	276	39
Pallidol-derivat		278	LANDRAULT et al. 2002	P	276	42
trans-Piceid	trans-3,5,4'-trihydroxystilben-3-O- $\beta$ -D-Glucosid	307,8	JEANDET et al. 1997a, CANTOS et al. 2002, WAFFO-TEGUO 1996b, GOLDBERG et al. 1995, Jeandet 1994, SIEMANN und CREASY 1992, PEZET et al. 1994, LIMA et al. 1999, DECENDIT et al. 1996b, WAFFO-TEGUO 1996b	Z	304, 314	101
Piceatannol		320, 300 sh	Standard	nicht vorhanden		
Pallidol-Derivat		278	LANDRAULT et al. 2002	DD/DD1	280	120
cis-Piceid	cis-3,5,4'-trihydroxystilben-3-O- $\beta$ -D-Glucosid	285 282	JEANDET et al. 1997a, ZOUBENKO et al. 1997, GOLDBERG et al. 1995, Jeandet 1994, LIMA et al. 1999a, VITRAC et al. 2001a, PEZET et al. 1994 DECENDIT et al. 1996b, WAFFO-TEGUO 1996b Standard	EE	282	124
trans-Resveratrol	Trans-3,5,4'-trihydroxystilben	305, 304, 314	DOMINGUEZ et al. 2001, EDWARDS 1991 Standard	FF	304, 314	136
cis-Resveratrol	cis-3,5,4'-trihydroxystilben	285 282	DOMINGUEZ et al. 2001, JEANDET et al. 1997a, VITRAC et al. 2001a, eigener Standard	wenig vorhanden		
trans-Astringin (3'-OH-trans-Piceid)		306 sh, 326 nm	WAFFO-TEGUO et al. 1996a Standard	nicht vorhanden		
Trans-a-Viniferin + Cis-Viniferin		320 sh 300 285,5 nm	LANDRAULT et al. 2002, JEANDET et al. 1997a	KK	320 sh 302 286	150
cis-Resveratrol-Derivat		282 nm	JEANDET et al. 1997a	OO	282	156
cis-Viniferin + trans-a-Viniferin		285 nm 320 sh 300	JEANDET et al. 1997a, LANDRAULT et al. 2002	QQ	284, 318	163
trans-a-Viniferin		320 sh 300	LANDRAULT et al. 2002	RR	320, 300 sh	166
cis-Viniferin + trans-a-Viniferin		285 nm 320 sh 300	JEANDET et al. 1997a, LANDRAULT et al. 2002	TT	284, 320	169
trans-d-Viniferin		311, 327 nm	PEZET et al. 2003b	VV	308	174
trans-d-Viniferin		311, 327 nm	PEZET et al. 2003b	WW	308	175

### **3 Induktion des Phenylpropanoidstoffwechsels durch Elicitation**

#### **3.1. Literaturübersicht**

##### **3.1.1 Resistenzmechanismen**

Um in ökologischen Lebensgemeinschaften ein ausgewogenes Gleichgewicht zwischen Pflanzen und Tieren und auch Mikroorganismen wie Bakterien, Pilzen und Hefen aufrecht zu erhalten, führen neue Befallsstrategien der Pathogene zu neuen Abwehrmechanismen der Wirte, was wiederum neue Strategien auf Seiten der Mikroorganismen induziert. Dabei ist eine schnelle Reaktion der Pflanze auf den Angriff durch das Pathogen von existenzieller Bedeutung. (BENHAMOU und NICOLE 1999).

Die Erkennungsmechanismen bei einem Kontakt zwischen Pathogen und Wirtspflanze finden auf beiden Seiten statt. Nachgewiesenermaßen werden, sobald die Pflanze erkannt wird, im Pathogen wichtige Gene für die Infektion induziert. Die exakte Erforschung der Erkennungsmechanismen in Pathogenen steht allerdings noch am Anfang (SCHWEIZER und MÉTRAUX 1996). Dass Pflanzen je nach Gattung, Art oder sogar Sorte nur von ganz bestimmten pathogenen Mikroorganismen befallen werden, liegt sowohl an den spezifischen Erkennungsmechanismen des Pathogens als auch an den für die Pflanze verfügbaren Abwehrreaktionen. So kann das Resistenzpotential einer Pflanzenart bzw. Sorte immer nur auf einen bestimmten Erreger oder eine Erregergruppe bezogen werden. Das Resistenzpotential einer Pflanze kann nicht nur bezüglich der Pathogenart, sondern sogar bezüglich der physiologischen Rasse des Mikroorganismus variieren. Genetisch determinierte Resistenzen werden als Basisresistenz bezeichnet. Nur wenigen Pathogenen gelingt es, diese Resistenz zu durchbrechen und die Wirtspflanze zu infizieren.

Aufgrund ihres Reaktionsmusters lassen sich lokal erworbene und systemisch induzierte Resistenz voneinander unterscheiden (ROSS 1961). Sowohl bei der lokalen als auch bei der systemisch induzierten Resistenz werden allgemeine Abwehrmechanismen im Pflanzengewebe aktiviert. Dabei bestimmen sowohl die individuelle Synthesegeschwindigkeit als auch die Endkonzentration an konstitutiven und neu synthetisierten Abwehrverbindungen den Wirkungsgrad der Abwehr und somit auch die Resistenz.

Um neben den verschiedensten Erreger zu bestehen, haben Pflanzen sehr unterschiedliche Abwehrstrategien entwickelt. Durch die Aktivierung von biosynthetischen Reaktionen stehen der Pflanze Abwehrmechanismen, wie die der Verstärkung von Kutikula und Zellwandstrukturen, die Akkumulation von Pathogen-abhängigen PR-Proteinen und Schlüsselenzymen des gesamten Phenylpropanoidstoffwechsels bis hin zum Zelltod, wie bei der hypersensitiven Reaktion zu beobachten, zur Verfügung.

### 3.1.2 Phenylpropanoide als potentielle Abwehrstoffe

Eine der am besten untersuchten Reaktionen ist die Aktivierung des Phenylpropanoidstoffwechsels, insbesondere die Induktion und Akkumulation von Phytoalexinen (WINK und LEHMANN 1996; HARBORNE, 1999). Diese antimikrobiellen Verbindungen mit kleiner Molekülmasse können in der Umgebung um eine Infektionsstelle entweder neu synthetisiert werden (Phytoalexine) oder konstitutive Verbindung werden akkumuliert.

### 3.1.3 Elicitoren des Phenylpropanoidstoffwechsels

Die Induktion der verschiedenen Abwehrreaktionen kann durch exogene Faktoren wie Trockenstress, Pflanzenschutzmittel, UV-Strahlung, Alkalinität, osmotischer Druck, Schwermetallionen, zahlreiche chemisch definierte Substanzen oder freie Radikale {abiotische Elicitoren} oder auch durch Insektenfraß und Pilz- oder Bakterieninfektionen, Kontakt mit nicht pathogenen Mikroorganismen (Epiphyten und Endophyten), Pilzsporen, Hyphenfragmenten, Stoffwechselprodukten von Mikroorganismen {biotische Elicitoren} ausgelöst werden (CONSTABEL und EILERT 1986; STANGE 1992, KLOEPPER et al. 1993; LEMANCEAU und ALABOUVETTE 1993; WEI et al. 1994; FRIEDRICH et al. 1996; GÖRLACH et al. 1996; LAWTON et al. 1996; BENHAMOU und BÉLANGER 1998). Aber auch pflanzeigene Verbindungen (endogene Faktoren) können durch mechanische Verletzungen oder enzymatische Aufspaltungen durch Pathogene freigesetzt werden und an Rezeptoren von benachbarten Pflanzenzellen ein Signal auslösen, welches dann Abwehrreaktionen induziert (DIXON et al. 1994; NÜRNBERGER 1999).

Man kann spezifische und unspezifische Elicitoren unterscheiden. Unspezifische Elicitoren induzieren Abwehrreaktionen bei allen Arten und Sorten einer Pflanzengattung, manchmal sogar bei Nichtwirtspflanzen. Spezifische Elicitoren lösen Abwehrreaktionen bei inkompatiblen Arten oder Sorten der Wirtspflanzengattung aus, jedoch keine oder nur schwache bei kompatiblen Arten (OKU 1994).

#### 3.1.3.1 Exogene Elicitoren

In dieser Untersuchung stehen exogene Elicitoren im Mittelpunkt, bei denen es anhand von vielfältigen Untersuchungen um pathogeneigene Oberflächenmoleküle, zellwandlytische Enzyme (HAHN et al. 1989; RIDE 1992) oder niedermolekulare Abbauprodukte der aus den Pilzzellwänden stammenden  $\beta$ -Glucane oder Chitosan handelt, die durch pflanzliche Enzyme freigesetzt werden (PRELL 1996). Einige chemische Strukturen dieser Verbindungen mit Elicitor-Wirkung sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 9: chemische Strukturen von exogenen Elicitoren

Elicitor	Literatur
Oligosaccharide	DIXON et al. 1983; SHARP et al. 1984; YOSHIKAWA et al. 1993
Polysaccharide	DIXON et al. 1983; SHARP et al. 1984
Polypeptide	DE WIT und SPIKEMAN 1982; GROSSKOPF et al. 1991
Proteine	GROSSKOPF et al. 1991
Glycoproteine	DE WIT und SPIKEMAN 1982; GROSSKOPF et al. 1991
Fettsäuren / Derivate	BOSTOCK et al. 1982; PREISIG and KLUC 1985
Protein-Lipid-Zucker-Komplexe	CONSTABEL und EILERT 1986; PAXTON 1991; Stange 1992; Oku 1994
niedermolekulare Verbindungen wie Chitosan	CONSTABEL und EILERT 1986; PAXTON 1991; STANGE 1992; OKU 1994
Ethylen	RIDE 1992
Abscisinsäure (ABA)	RIDE 1992
Salicylsäure	YALPANI et al. 1991; RIDE 1992
Jasmonsäure	CREELMAN et al. 1992

### 3.1.3.2 Elicitorerkennung

Die spezifische Erkennung von Elicitoren durch die Wirtszellen erfolgt nach einer Hypothese von OKU 1994 durch Rezeptoren in der pflanzlichen Zellmembran, die biochemisch von Proteinen oder Glycoproteinen verkörpert werden. Diese Hypothese wird durch die Entdeckung eines Rezeptors in Sojabohnen (YOSHIKAWA et al. 1993) und einer „single-class“ Bindungsstelle in Petersilienprotoplasten mit einer hohen Affinität zu einem Oligopeptid-Elicitor (NÜRNBERGER et al. 1994) unterstrichen.

Hat die Pflanze den Elicitor erkannt, ist eine intrazelluläre Signalweiterleitung von dem Rezeptor zum Zellkern notwendig, um Abwehrreaktionen einzuleiten (GUO et al. 1997). Je nach Elicitor werden verschiedene Signalsubstanzen und Signalübertragungswege sowohl für die Aktivierung der betroffenen Zellen als auch für die Induktion und Koordination der systemischen Induktion von Abwehrreaktionen diskutiert. Tabelle 11 listet Substanzen auf, die nach einer Elicitation an der Signalübertragung beteiligt sind.

Tabelle 10: Substanzen, die nach einer Elicitation an einer Signalübertragung beteiligt sind

An der Signalübertragung zum Zellkern beteiligte Substanzen	Literatur
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	APOSTOL et al. 1989a, GUO et al. 1997
Phospholipasen	LOCK und PRICE 1994
H <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -Austausch,	LOCK und PRICE 1994
Ca <sup>2+</sup> -Influx	LOCK und PRICE 1994
Proteinkinasen und Phosphatasen (verbunden mit Calcium-Mobilisierung),	ALAN und HEPPLER 1988
Calmodulin	ALAN und HEPPLER 1988
Polyamine	VIDHYASEKRAN 1997
Annexine	BOUSTED et al. 1989
An der systemischen Aktivierung beteiligte Substanzen	
Jasmonat	STASWICK 1995; THALER et al. 1999
Salicylsäure	KLESSIG und MALAMY 1994; RASKIN 1995; CONRATH et al. 1996; THALER et al. 1999
Oligogalacturonide	VIDHYASEKARAN 1997
Fettsäuren	VIDHYASEKARAN 1997
Absisinsäure	PENA-CORTES et al. 1989
Ethylen	ESQUERRE-TUGAYE et al. 1993

### 3.1.3.3 Reaktionen von Pflanzen auf eine Elicitation

Eine Vielzahl an Untersuchungen über Reaktionen von Pflanzenzellen auf einen Elicitor zeigen ein vielfältiges Zusammenspiel an zeitlich und räumlich regulierten Reaktionen. Einige vielfach untersuchte Reaktionen von Pflanzen auf eine Elicitation oder Pathogenangriff sind in Tabelle 12 aufgelistet. Obwohl die Resistenzreaktionen in der Regel unspezifisch sind, können gleiche Abwehrreaktionen einer Wirtspflanze aufgrund unterschiedlicher Elicitoren verschiedene Abwehrmechanismen zugrunde liegen (RIDE 1992).

Dass sich die Strategien der Pathogene und die der Pflanzen gegen die Pathogene im Laufe der Evolution aufeinander abgestimmt haben, legt Abbildung 26 nahe.

Tabelle 11: pflanzliche Reaktionsmechanismen auf Elicitation

Wie reagieren Pflanzenzellen auf Elicitation	Literatur
<b>Physiologische Zellveränderungen</b>	
Elektrolytischer Verlust	REPKA 2001
Ansäuerung des Cytoplasmas	MATHIEU et al. 1994
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Akkumulation	Guo 1998; Apostol et al. 1989a; Becker 2000; Repka 2001
sinkender pH-Wert im Cytosol => K <sup>+</sup> -Efflux	ROOS 1998
steigender pH-Wert in der Vakuole	ROOS 1998
Membran .Depolarisation	REPKA 2001
Zelltod	RON 2000
Enzymeaktivierung	MENKE 1999b
Induktion der PAL	SCHMIDT 1999
<b>Proteinase-Inhibitoren,</b>	
β-1,3-Glukanasen,	BUSAM et al. 1997; FAJARDO 1998; REPKA 2001
Chitinasen,	BUSAM et al. 1997; FAJARDO 1998; BECKER 2000; REPKA 2001
Peroxidasen	FAJARDO 1998
Endoproteinasen	
<b>Akkumulation von phenolischen Verbindungen</b>	
Hydroxizimtsäuren	KOLB 2003
Phytoalexinbildung	CONRAD 2000a; REPKA 2001
Benzophenanthridin A.	ROOS 1998
Terpenoid-Indol A.	MENKE 1999a
Kartoffel: Rishitin, Lubimin; Soja: Glyceollin;	CONRAD 2000a, b
Petersilie: Furanocumarin	
<b>Proteine</b>	
Akkumulation an löslichen Proteinen	FAJARDO 1998
Protein Phosphorylierung / Dephosphorylierung	REPKA 2001
Bildung von „pathogenrelated“- Proteinen (PR-Proteine)	REPKA 2001
<b>Verstärkte Signalstoff-Biosynthese</b>	
Jasmonsäure.	MENKE 1999a; REPKA 2001
Salicylsäure	REPKA 2001
Ethylen	ROOS 2000; REPKA 2001

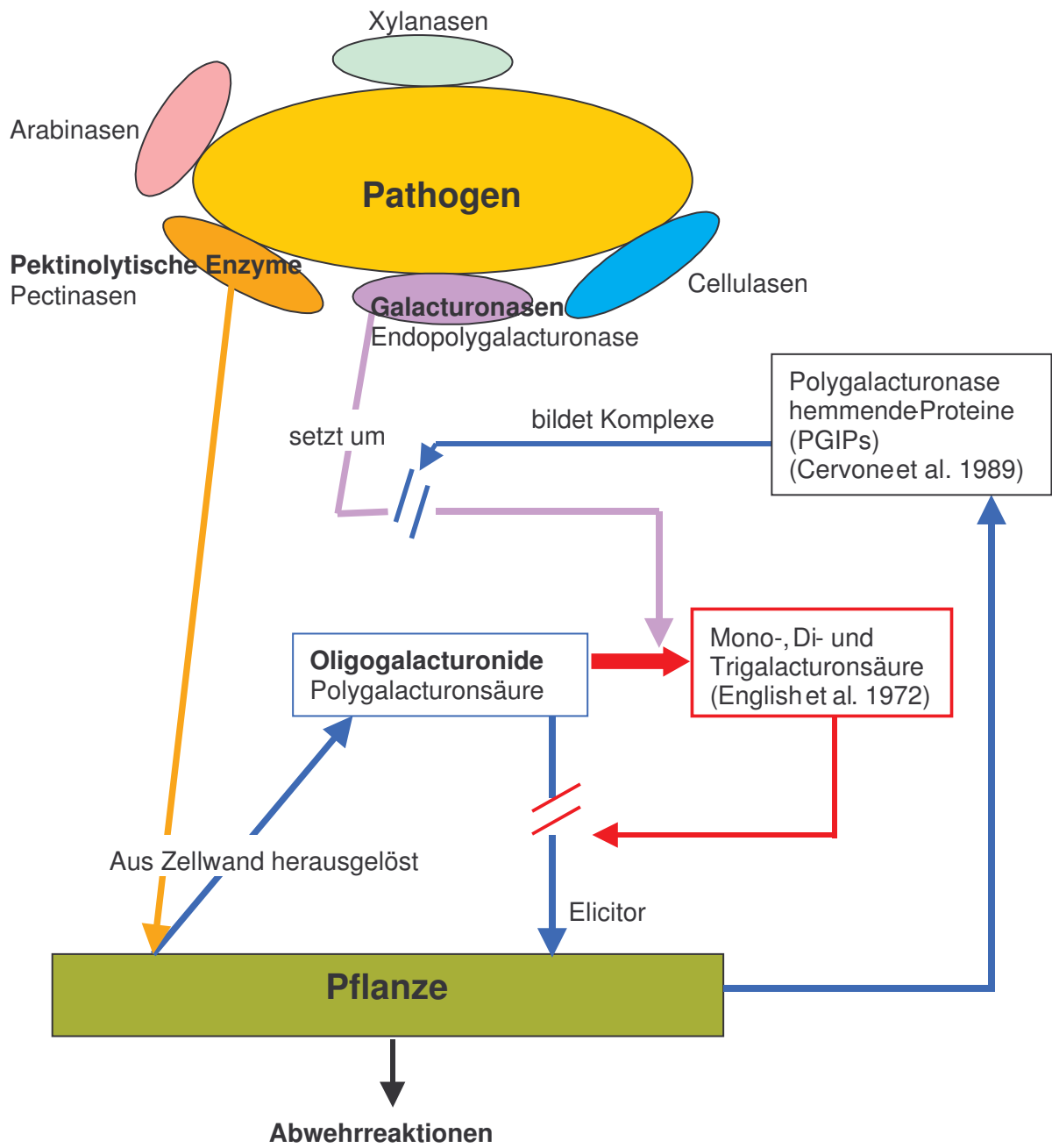


Abbildung 26: Wechselwirkungen einiger von Pathogenen ausgeschiedener Enzyme, deren Wirkung auf die Pflanzenzelle und die daraus resultierenden Wechselreaktionen zwischen beiden

Pathogene Pilze scheiden zellwandauflösende Enzyme aus, die auch das Herauslösen von Oligogalacturoniden verursacht. Diese wiederum werden von benachbarten Zellen als Elicitor empfunden und setzen so eine Reihe von Abwehrreaktionen in Gang, die gegen das Pathogen gerichtet sind. Durch Freisetzen von Galacturonasen seitens des Pilzes werden

die Oligogalacturoniden in Galacturonsäuren (ENGLISH et al. 1972) metabolisiert und wirken dadurch der Funktion als Elicitor entgegen. Als Antwort darauf, setzt die Pflanze Polygalacturonase-hemmende Enzyme (PGIP) frei (CERVONE et al. 1989), die ihrerseits durch eine Komplexbildung mit den Galacturonasen der Metabolisierung von Oligogalacturoniden in Galacturonsäuren entgegenwirkt. Die beobachteten Aktionen und Reaktionen zeigen, wie sich sowohl die pathogenen Pilze als auch die Wirtspflanzen auf die immer neu entwickelten Strategien des anderen eingestellt und Gegenmaßnahmen entwickelt haben.

#### **3.1.3.4 Akkumulation von Phenolen als Abwehrreaktion**

Die in höheren Pflanzen vorkommenden Flavonoide dienen zum einen dem UV-Schutz der Pflanze (SCHMELZER et al. 1988), zum anderen sind sie direkt oder indirekt an Interaktionen zwischen Pflanzen und Pathogenen beteiligt. Phenolische Verbindungen sind entweder konstitutiv in der Pflanze vorhanden und können nach einer Infektion akkumulieren (TREUTTER und FEUCHT 1990) oder werden, ausgelöst durch Stressreaktionen, neu synthetisiert. Phenolische Substanzen können aber auch als Reaktion auf einen Pathogenbefall in die Zellwand eingelagert werden (BECKMANN et al. 1974). Ein hoher Tanningehalt ist häufig mit einer allgemein höheren Widerstandsfähigkeit gegenüber Mikroorganismen gekoppelt (HWANG 1983; ZHANG et al. 1990). In Tabelle 12 (Seite 44) sind phenolische Verbindungen zusammengefasst, die nach Elicitation oder Pathogenbefall in größeren Mengen oder neu von den Pflanzen synthetisiert werden.

Phenolische Verbindungen wurden auch in den folgenden Untersuchungen mit Resistenzmechanismen in Zusammenhang gebracht. So stellten BARNES und WILLIAMS (1961), HOLOWCZAK et al. (1962) und RAA (1968) nach einer *Venturia inaequalis*-Infektion bei Apfelblättern eine Phloridzin-Induktion um die Infektionsstellen fest, die bei resistenteren Sorten stärker akkumulierte. Auch ALT und SCHMIEDLE (1980) brachten sowohl Phloretin als auch Phloridzin mit Abwehr gegen *Phytophthora cactorum* in Verbindung. Vertreter der Flavan-3-ole, wie das Catechin, korrelieren im Gehalt mit der Resistenz gegen *Venturia inaequalis* bei Apfelblättern und Früchten (HASLAM 1989; TREUTTER und FEUCHT 1990; SCALBERT 1991; TREUTTER 1991; SIEROTZKI und GESSLER 1993; FEUCHT et al. 1994; MAYER 1995; PICINELLI et al. 1995). Eine Akkumulation von Catechinen und Proanthocyanidinen wurde vielfach als Reaktion der Pflanze auf das Einwirken abiotischer Stressoren, wie mechanische Verletzungen, Luftverschmutzung oder Trockenstress, beobachtet (HAMACHER und GIERSEPEN 1989; FEUCHT et al. 1985). Auch biotische Stressfaktoren, wie Infektionen durch Mikroorganismen oder Insektenfraß (SCHULZ und BALDWIN 1982; WAAGE et al. 1984; FEUCHT et al. 1992) induzieren vielfach die Flavanol-Synthese.



Einige Phenylpropanoid-Abkömmlinge werden Phytoalexine genannt und sind antimikrobiell wirksame Verbindungen mit niedrigem Molekulargewicht, die in vielen Pflanzen als Folge einer Infektion oder nach Stresseinwirkung induziert werden (RIDE 1992). Chemisch gesehen lassen sich darunter beispielsweise Flavonoide, Stilbene, Terpene oder auch Polyacetylene finden. VIDHYASEKARAN (1997) unterscheidet begrifflich genauer zwischen Phytoalexinen, die *de novo* nach einem Pathogenangriff synthetisiert werden und Phytoanticipien, die bereits vor Pathogenkontakt konstitutiv in der Pflanze vorhanden waren oder nach einer Infektion ausschließlich aus vorhandenen Bestandteilen gebildet werden (VANETTEN et al. 1995). Wichtige in Pflanzen vorkommenden Phytoanticipine sind Phenole, Glucosinolate, cyanogene Glucoside, Saponine, Alkaloide und Diene (VIDHYASEKARAN 1997).

### 3.1.4 Mikroorganismen als Gegenspieler von Pathogenen

Nicht pathogene Mikroorganismen können die Pflanzen direkt oder indirekt vor Pathogenbefall schützen. So sind Hefen und Bakterien (ELAD et al. 1994) bekannt für ihre Fähigkeit, die Konidienkeimung von pathogenen Pilzen zu reduzieren, indem sie dem Pathogen durch eine schnelle Vermehrungsrate und Nährstoffaufnahme die Lebensgrundlage entziehen. Außerdem können sie in Pflanzen auch unterschiedliche Abwehrmechanismen aktivieren. So löst eine Infektion mit *Erwinia amylovora* bei Birnen einen erhöhten Gesamtphenolgehalt aus (RYUGO et al. 1990; MARTINS und MORAES 1996; RÖMMELT 2002; PETEREK 2004). Auch *Cotoneaster*-Arten zeigten nach einer Feuerbrandinfektion neben einer gesteigerten Peroxidaseaktivität auch einen erhöhten Gesamtphenolgehalt (ZELLER 1985, zit. in RÖMMELT 2002). MARTINS und MORAES (1996) beobachteten bei Kaffeepflanzen durch eine Filtratbehandlung mit einigen nicht pathogenen Bakterien und Pilze eine Resistenz gegen den Rostpilz *Hemileia vastrix*, was auch durch Filtrate von *Bacillus thuringiensis* (ROVERATTI et al. 1989) induziert werden konnte.

Im Gegensatz zu Bakterien und Viren ist die Oberfläche von Pilzen mit einer Vielfalt an elicitierenden Verbindungen bedeckt. Zusätzlich haben auch die von pilzlichen Pathogenen abgegebenen zellwandabbauenden Enzyme wie pectinolytische Enzyme, Cellulasen, Arabinasen, Xylanasen und Galactanasen elicitierende Wirkungen.

#### 3.1.4.1 Hefen als Bioregulatoren

Der bekannteste antagonistische Wirkmechanismus zwischen Hefen und pflanzenpathogenen Pilzen ist die Nahrungskonkurrenz. So reduzierten saprophytische Hefeisolate (*Rhodotorula glutinis* und *Cryptococcus albidus*) die Sporulation von *Botrytis cinerea* an Tomaten und Bohnen (ELAD et al. 1994). Diese hemmende Wirkung wurde durch Zugabe von Glucose und  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  zum Suspensionsmedium der Konidien reduziert, was ebenfalls

auf Nährstoffkonkurrenz als Wirkmechanismus hinweist. Da aber auch abgetötete Hefezellen die *Botrytis*-Infektionen vermindern, müssen über die Nahrungskonkurrenz hinaus noch weitere Resistenzmechanismen induziert werden. So scheiden Hefen wie *Pichia guilliermondii* (WISNIEWSKI et al. 1991, zit in ELAD et al. 1994) zellwandzerstörende Enzyme aus, die aber keine zerstörende Wirkung auf Zellwände von *Botrytis*-Konidien haben. Da die sonst antagonistisch gegenüber *Botrytis*-Konidien wirksame Hefe keine Resistenz induziert, wenn sie nur kurz vor dem Pathogen appliziert wird, liegt es nahe, dass die Aktivierung des Sekundärstoffwechsels als Mechanismus an der Pathogenabwehr beteiligt ist.

Durch Hefepräparationen ausgelöste Abwehrmechanismen sind in Tabelle 13 a-c aufgeführt.

Epiphytische Hefen besiedeln Pflanzenoberflächen oder Wunden auch unter trockenen Bedingungen über lange Zeiträume. Sie produzieren extrazelluläre Polysaccharide (BENBOW und SUGAR 1999), was ihre Überlebenschancen erhöht, verwenden bei einer schnellen Vermehrung zur Verfügung stehende Nährstoffe und sind teilweise unempfindlich gegen Pflanzenschutzmittel. Einige Hefen besitzen die Fähigkeit, phytopathogene Pilze, die die Früchte erst nach der Ernte befallen, einzudämmen. Sind diese Hefen zusätzlich noch nicht-pathogen gegenüber den Früchten und auch für den Menschen ungefährlich, da sie bei einer Temperatur von über 37°C nicht mehr wachsen, können sie als Bioregulatoren in Betracht gezogen werden.

#### 3.1.4.2 *Cryptococcus laurentii*

##### Physiologie der Hefe

*Cryptococcus laurentii* (Kufferath) Skinner var. ist eine kugelförmige Hefe, die auch in einer länglichen Zellvariation auftreten kann. Sie reproduziert sich durch multilaterales Knospen und zeichnet sich durch beige bis ocker oder gelblich bis pink pigmentierte Kolonien aus. Diese Hefe besitzt kein Pseudomycelium und kann sich nicht sexuell reproduzieren (Skinner 1950). Durch Verwendung von chinesischer Tusche konnte veranschaulicht werden, dass die Hefe eine feine Kapsel besitzt (MUSSA et al. 2000).

*Cryptococcus laurentii* ist in der Literatur auch unter folgenden Synonymen bekannt: *Chromotorula aurea*, *Cryptococcus flavescens*, *Cryptococcus laurentii* var. *Flavescens*, *Rhodotorula aurea*, *Rhodotorula laurentii*, *Thodotorula nitens*, *Rhodotorula peneaus*, *Torula aurea*, *Torula flavescens*, *Torula laurentii*, *Torulopsis carnescens*, *Torulopsis flavescens* und *Torulopsis laurentii*.

Tabelle 12: Pflanzliche Reaktionsmechanismen auf verschiedene Hefe-Elicitoren

induziert in der Pflanze	Elicitor	Pflanzenart	Literatur
<b>Physiologische Wirkung</b>			
schnelle Papillenbildung bei Mehltau	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Zellwandextrakt)	Sojabohnen	REGLINSKI et al. 1994
Zelltod	Mycelium von <i>Botrytis cinerea</i>	Wein	REPKA et al. 2001
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Anreicherung	Mycelium von <i>Botrytis cinerea</i>	Wein	REPKA et al. 2001
<b>Signalstoffbildung</b>			
Salicylsäure	Mycelium von <i>Botrytis cinerea</i>	Wein	REPKA et al. 2001
Ethylenstimulation	<i>Trichoderma viride</i> (Xylanase)	Tomaten, Tabak	ROOS 2000
induziert Vorstufen von alpha-Linolen-Säure	Hefeextrakt	<i>Catharantus roseus</i>	MENKE 1999a
Jasmonsäure-Induktion	Hefeextrakt	<i>Catharantus roseus</i>	MENKE 1999a
<b>Enzymstimulation</b>			
Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL)	Hefezellwandextrakt	Sojabohnen	REGLINSKI et al. 1994
	Hefe-Elicitor	62 Pflanzenarten	GRUNDLACH et al. 1992
	Mycelium von <i>Botrytis cinerea</i> ; <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Zellwandextrakt)	Soja; Wein;	REGLINSKI et al. 1994; REPKA et al. 2001
4-cumarate-CoA ligase (4CL),	Mycelium von <i>Botrytis cinerea</i>	Wein	REPKA et al. 2001
Chalkonsynthase (CHS)	Mycelium von <i>Botrytis cinerea</i>	Wein	REPKA et al. 2001
Chalkonisomerase (CHI).	Mycelium von <i>Botrytis cinerea</i>	Wein	REPKA et al. 2001
Isoflavone-O-Methyltransferase	Zellwände von Bäckerhefe oder von <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	Alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> )	EDWARDS 1991
S-Adenosyl-L-Methionin-Synthase (Methylgruppen-Geber)	<i>Phytophthora megasperma</i> sp. <i>Glycinea</i>	Erbsen ( <i>Pisum sativum</i> )	KAWALLECK et al. 1992

Tabelle 13: Pflanzliche Reaktionsmechanismen auf verschiedene Hefe-Elicitoren

induziert in der Pflanze	Hefe	Pflanzenart	Literatur
Stimulation des Phenylpropanoidstoffwechsels	<i>Candida oleiphila</i> ; <i>Pichia anomala</i> (Oligosaccharide)	Apfel	CREEMERS 2001
Zimtsäuren	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Zellwandextrakt)	Soja	REGLINSKI et al. 1994
Resveratrolsynthese => Resveratrol	Elicitor von <i>Phytophthora megasperma</i> und Hefeextrakt	Erdnüsse	LANZ et al. 1990
Methoxychalkon; 3 Methylflavane	Zellwände von Hefe	<i>Hippeastrum x hortorum</i>	WINK und LEHMANN 1996
Nicht identifiziertes Phytoalexin	Glucan-Präparation von Hefeextrakt ( <i>Phytophthora megasperma</i> )	<i>Glycine max</i> ; <i>Thalictrum rugosum</i>	FUNK et al. 1987
Furanocumarin	Hefezellwandextrakt	<i>Glenia littoralis</i>	Kitamura 1998
Erhöhen der Berberin-Biosynthese	Kohlehydratfraktion isoliert aus Hefeextrakt	<i>Thalictrum rugosum</i>	FUNK et al. 1987
Pterocarpin, Medicarpin und Maackiain	Hefe-Glucan-Elicitor	Kichererbsen	GUNIA et al. 1991
Medicarpin und seine malonylierten Glycoside.	Zellwände von <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	Alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> )	EDWARDS 1991
Benzophenanthridin A.	Hefe Elicitor oder <i>Penicillium cyclopium</i> Sporen; Kohlehydratfraktion von einem Hefeextrakt;	<i>Escholtzia californica</i> ; <i>Catharantus roseus</i>	ROOS 1998; MENKE 1999a; VILLEGAS 2000
Rishitin, Lubimin; Glyceollin; Furanocumarin;	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ; <i>Yarrowia lipolytica</i> ; <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Kartoffel; Soja; Petersilie;	CONRAD 2000a, b
<b>Proteine</b>			
Akkumulation von PR-Proteinen	Mycelium von <i>Botrytis cinerea</i>	Wein	REPKA et al. 2001

Tabelle 13: Pathogen-hemmende Wirkungen von verschiedenen Hefe-Elicitoren

Pathogen-hemmende Wirkung	Hefe	Pflanzenart	Literatur
Resistenz gegen Mehltau	Hefezellwandextrakt	Sojabohnen	REGLINSKI et al. 1994
Verminderte Konidienkeimung von <i>Botrytis cinerea</i>	<i>Rhodotorula glutinis</i> ; <i>Cryptococcus albidus</i> (auch abgetötet)	Tomaten und Bohnen	ELAD et al. 1994
Verminderte Sporulation von <i>Cochliobolus sativus</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>	Weizen	ELAD et al. 1994
Systemische Resistenz gegen <i>Hemileia vastrix</i>	Hefefiltrat	Kaffee	MARTINS und MORAES 1996
<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Pichia guilliermondii</i>	Bohnen und Tomaten	WISNIEWSKI et al. 1991, zit in ELAD et al. 1994
<i>Botrytis cinerea</i> und <i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Phytoalexine)	Salat und Sojabohnen	REGLINSKI et al. 1995
<i>Venturia inaequalis</i>	<i>Candia oleiphila</i> ; <i>Pichia anomala</i> (Oligosaccharide)	Apfel	CREEMERS 2001

Taxonomisch ist *Cryptococcus laurentii* wie folgt einzugliedern (Skinner 1950):

Reich: Pilze  
 Stamm: Basidiomycota  
 Unterstamm: Basidiomycotina  
 Ordnung: Sporidiales  
 Familie: Sporidiobolaceae  
 Gattung: *Cryptococcus*  
 Art: *laurentii*

*Cryptococcus laurentii* ist in der Natur weit verbreitet und wurde sowohl aus dem Wasser als auch von den verschiedensten Pflanzen isoliert (CLARK et al. 1954; HISLOP et al. 1969; FOKKEMA et al. 1974, 1975; ANDREWS et al. 1980). Beim Menschen, wo sie nur in Ausnahmefällen einen pathogenen Charakter besitzt, wurde sie schon auf der Haut und den Schleimhäuten gefunden.

Die Hefe kann in einem Temperaturspektrum von 0–35°C wachsen und zeigt gegenüber verschiedenen Fungiziden nur geringe Empfindlichkeit (LIMA et al. 1998).

Beim Apfel ist die Hefe auf Blüten, Blättern und Früchten zu finden. Gegenüber Apfelfrüchten verhält sich *Cryptococcus laurentii* nicht pathogen (CHAND-GOYAL und SPOTTS 1996a) und induziert weder Nekrosen noch Verfärbungen. (ROBERTS 1990).

### 3.1.4.3 *Aureobasidium pullulans* [de Bary] (Arnaud 1910)

#### Physiologie der Hefe:

Die Kolonien von *Aureobasidium pullulans* erscheinen auf Agar-Nährböden (Potato-Dextrose-Agar) feucht, glatt und hefeähnlich. Die jungen rosafarbenen Kolonien werden mit zunehmendem Alter dunkler oder sogar schwarz. Verursacht wird dies durch die Einlagerung von Melanin im Mycel. Die septierten Hyphen erscheinen im jungen Stadium durchsichtig, dunkeln aber bei Alterung ins

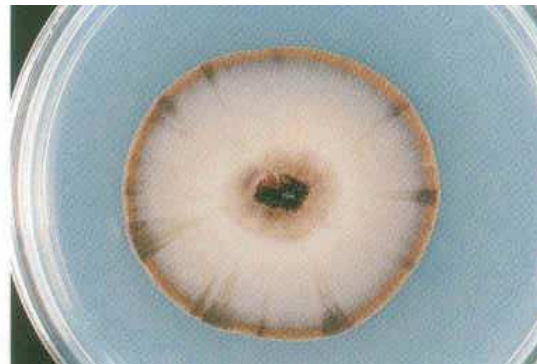


Abbildung 27: *Aureobasidium pullulans* auf Kulturplatte. (Anonym 2005: *Mold Inspector Laboratory International*)

Bräunliche nach. Im Allgemeinen sind sie 2–10 µm stark, können aber auch 15–20 µm erreichen. Die einzelligen, eiförmigen Sporen von *Aureobasidium pullulans* sind dunkel gefärbt und werden lateral an den Hyphen gebildet. Es handelt sich um Blastokonidien, die durch Knospung weitere Konidien bilden können. Unter ungünstigen Lebensbedingungen wächst der Pilz in Form von schwarzen Sprosszellen hefeartig. Das Wachstumsoptimum von *Aureobasidium pullulans* liegt bei 25 °C, das Minimum bei 5 °C, das Maximum bei 35 °C.

Taxonomisch ist *Aureobasidium pullulans* wie folgt einzugliedern (Anonym 2005: Merops Datenbank):

Reich: Pilze  
 Stamm: Ascomycota  
 Unterstamm: Pezizomycotina  
 Ordnung: Eurotiomycetes  
 Familie: Dothioraceae  
 Gattung: *Aureobasidium*  
 Art: *pullulans*

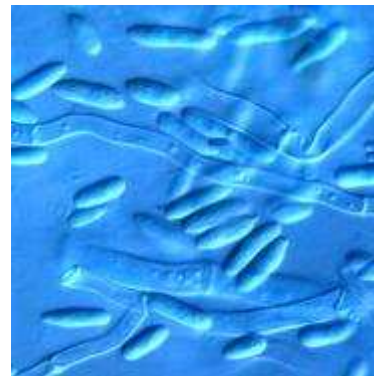


Abbildung 28: *Aureobasidium pullulans* Hyphen und Sporen. (Anonym 2005: *Enius AG 2005*)

*Aureobasidium pullulans* ist einer der am weitverbreitetsten und am besten angepassten hefeähnlichen Pilzorganismen, der sowohl in der Phyllosphäre vorkommt (SCHENA et al. 1999, ADIKARAM et al. 2002) als auch in Böden, Abwässern und in verschiedenen Baumaterialien, wie Farbanstrichen und Tapeten, zu finden ist. Er ist in der Lage die

Cellulose in Pflanzenfasern jeglicher Art abzubauen. Dabei kann auch Holz direkt, jedoch nicht die Ligninkomponente (Anonym 2005; *Enius AG 2005*), angegriffen werden.

Der Organismus zeichnet sich durch eine extreme Variabilität und genetische Instabilität aus (COOKE 1959; BULAT und MIRONENKO 1992; YURLOVA et al. 1995). Morphologie und Kulturmerkmale reichen nicht aus, um die Stämme unterscheiden und identifizieren zu können. Hierfür sind PCR-Analysen notwendig.

Sowohl auf den Oberflächen von Äpfeln (RIST und ROSENBERGER 1995; MATTESON-HEIDENREICH et al. 1997), Birnen (CHAND-GOYAL und SPOTTS 1996b) als auch Erdbeeren (LIMA et al. 1997a; ADIKARAM et al. 2002) wurde diese Hefe gefunden. Auch die Oberfläche von gesunden Weintrauben wird vornehmlich von Hefen wie *Aureobasidium pullulans*, *Metchnikovia*-, *Hanseniaspora*-, *Cryptococcus*- und *Rhodotorula*-Arten besiedelt (VERCESI et al. 1982; MERCIER und WILSON 1994; PANAGOPOULOS et al. 2002; FLEET 2003; MILEK et al. 2003). Wachstumsstandort, die Rebsorte oder die Temperatur scheinen dabei keinen Einfluss auf das Vorkommen zu haben (PANAGOPOULOS et al. 2002).

Obwohl *Aureobasidium pullulans* in vielen Untersuchungen als nicht pathogen bezeichnet wird, gilt er nach ABOU-HEILAH (1985) als Nacherntepathogen bei Apfel und ist zusammen mit *Rhodotorula glutinis* ein möglicher Verursacher der Berostung bei Äpfeln (MATTESON-HEIDENREICH et al. 1997).

Möglicherweise gibt es typbedingte Unterschiede bezüglich der Pathogenität dieses Pilzes.

### **3.1.5 Antagonistische Wirkmechanismen von Hefen**

#### **3.1.5.1 Wirkmechanismen bei Nacherntebehandlungen**

Über die Wirkmechanismen von Hefen auf Nacherntepathogene gibt es eine Vielzahl von Untersuchungsansätzen. Dabei scheinen diese Hefen nicht in der Lage zu sein, Antibiotika zu bilden. Die wichtigsten Mechanismen scheinen die Konkurrenz um Nährstoffe (DROBY et al. 1989; LIMA et al. 1997a), direkte physiologische Interaktionen zwischen Hefe und Pilzhyphe, die Bildung von Zellwand-auflösenden Enzymen (WISNIEWSKI et al. 1991; CASTORIA et al. 1997) und die Induktion von Resistenzen der Wirtspflanze (WILSON und WISNIEWSKI 1994; ARRAS 1996) zu sein.

Die Hefen *Cryptococcus laurentii* und auch *Aureobasidium pullulans*, die ein großes Spektrum an Pathogenen hemmen, wurden schon in vielen Untersuchungen als vielversprechende Bioregulatoren gegen Nachernteeerkrankungen von Früchten beurteilt, (LIMA et al. 1999b). Beide Hefen sind Bioregulatoren, die sehr gut an das Wundverhalten von Früchten angepasst sind, da sie Fruchtwunden schnell, unverwundete Früchte aber nur gemäßigt besiedeln (LIMA et al. 1998, 2003; ZHANG et al. 2003) und somit für andere epiphytischen Pflanzenorganismen bedeutende Nährstoffkonkurrenten darstellen. Dabei

steht die Wachstumsgeschwindigkeit verschiedener Hefeisolate mit ihrer Wirksamkeit gegen Pathogene in engem Zusammenhang. Die starke Vermehrungsrate von *Cryptococcus laurentii* im Vergleich zu anderen Hefenarten ist auf die Fähigkeit, die vorhandenen Nährstoffe an der Wundstelle besser verwerten zu können, zurückzuführen. Gleichzeitig produziert *Cryptococcus laurentii* auch große Mengen des Enzyms  $\beta$ -1,3-Glucanase, das an dem Abbau von Zellwänden beteiligt ist, obwohl die Hefe nicht pathogen gegenüber den Früchten zu sein scheint (ROBERTS 1990). Das Herauslösen von Zellwandbausteinen könnte das Angebot an einfachen Kohlenstoffverbindungen für die Hefe erhöhen. Auf die Wundheilung scheint die Hefe aber keinen Einfluss, da sie in frische Wunden appliziert die gleiche Pathogen-hemmende Wirkung hat wie bei der Inokulation in 72 Stunden alte Wunden (ROBERTS 1990).

Die Effektivität der Hefe steht in Abhängigkeit zur Wirtspflanze und auch zum Pathogen. So reduziert *Cryptococcus laurentii* den *Penicillium expansum*-Befall bei Birnen um 90–100, bei Stachelbeeren aber nur um 67%. Der Befall von *Botrytis cinerea* an Äpfeln wird um 90–100%, der Befall von *Penicillium expansum* an Äpfeln aber nur um 67% vermindert (LIMA et al. 1997b, 1998).

Obwohl *Aureobasidium pullulans* in besiedelten Wunden von Äpfeln Aminosäuren ausscheidet, ist nach JANISIEWICZ et al. (2000) die hemmende Wirkung auf die Konidienkeimung von *Penicillium expansum* auf die Nährstoffkonkurrenz zurückzuführen.

Aber nicht nur die Raum- und Nährstoffkonkurrenz zwischen Hefe und Pilz stehen als mögliche Erklärung für Abwehrmechanismen zur Diskussion sondern auch der Mechanismus der induzierten Resistenz. ADIKARAM et al. (2002) stellten eine verminderte *Botrytis cinerea*-Infektion bei Erdbeeren nach einer Vorbehandlung mit *Aureobasidium pullulans* fest. Da jedoch bei grünen Erdbeeren eine hemmende Wirkung festzustellen war, bei den reifen jedoch nicht, und sowohl lebende als auch abgetötete Hefezellen eine Infektionshemmung hervorriefen, *Aureobasidium pullulans* aber nicht befähigt ist Antibiotika zu produzieren, stellten ADIKARAM et al. (2002) die Hypothese auf, dass eine Induktion des Fruchtgewebes ein zusätzlicher Wirkmechanismus sein könnte. Diese Hypothese wird dadurch gestützt, dass die Epidermis von grünen Erdbeeren, die mit *Aureobasidium pullulans* behandelt wurden höhere antifungische Aktivitäten aufwiesen als unbehandelte Früchte. Dabei ist auffallend, dass die Hefe *Botrytis cinerea* am effektivsten hemmt, wenn sie in die Blüte appliziert wird. Entweder findet dabei schon zum Zeitpunkt der Blüte eine Induktion des Sekundärstoffwechsels statt, die dann für die spätere Fruchtentwicklung von Bedeutung ist und Einfluss auf das Resistenzpotential der Früchte nimmt oder die Applikation der Hefezellen verhindert über den Mechanismus der Nahrungskonkurrenz eine latente Erstinfektion mit *Botrytis cinerea*-Konidien und vermindert somit die spätere Ausbreitung des Pilzes.



Sowohl bei der Verwendung von *Cryptococcus laurentii* als Bioregulator in der Nacherntebehandlung von Arbutusbeeren, *Mycira rubra* (ZHENG et al. 2004), als auch bei Applikationen auf Blätter, Blüten und Früchten von Apfel, Kirsche und Pfirsich (ROBERTS 1990) weisen nur lebenden Zellen eine antagonistische Wirkung auf Pathogene auf. Dass diese Wechselwirkung besteht, beweist die Tatsache, dass gewaschene Zellkulturen von *Cryptococcus laurentii* signifikant stärkere Wirkungen gegen Nacherntepathogene zeigten als ungewaschene und, dass Behandlungen mit zellfreien Kulturfiltraten überhaupt keine Befallsreduktion bewirkten (ROBERTS 1990; ZHENG et al. 2004).

Literaturdaten über nachweisliche antagonistische Wirkungen von *Cryptococcus laurentii* bei der Nacherntebehandlung von Kulturpflanzen sind in Tabelle 14 aufgelistet.

Die antagonistische Wirkung von *Cryptococcus laurentii* beruht weitgehend auf physiologischen Mechanismen (COLGAN et al. 1997; LIMA et al. 1999b, 1998). Dabei hemmen nicht nur Hefebehandlungen auf schon geernteten Früchten den Befall mit Nacherntepathogenen, sondern auch Hefeapplikation bis zu 3 Wochen vor der Ernte führen zu einer guten Fruchtbesiedelung zum Zeitpunkt der Ernte, die sich positiv auf die Fruchtgesundheit bei der Lagerung auswirkt.

Aber nicht nur die Nährstoffkonkurrenz, sondern auch andere, direkt auf das Pathogen wirkende, Mechanismen können einen Befall an der Pflanze reduzieren. So akkumuliert während des Befalls zum Beispiel *Penicillium* Patulin, dessen Metabolisierung allerdings von *Rhodotorula* und *Cryptococcus* gehemmt wird (CASTORIA et al. 2002).

Bislang konnte jedoch noch keine Induktion von Resistenzreaktionen durch *Cryptococcus laurentii* in den Pflanze festgestellt werden. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die meisten Untersuchungsansätze auf eine Anwendung der Hefe in der Nacherntebehandlung ausgelegt sind, und sich die Früchte zu diesem Zeitpunkt in einem Zustand befinden, in dem der Stoffwechsel stark eingedämmt ist. So konnten CHAND-GOYAL und SPOTTS (1996a) bei der Verwendung von *Cryptococcus laurentii* als Bioregulator in der Nacherntebehandlung von Apfel gegen *Penicillium* weder induzierte Resistenz, noch Hyperparasitismus oder fungizide Wirkungen feststellen. Die Produktion von Enzymen wurde dabei allerdings nicht untersucht.

Eine Antibiotikawirkung spielt auch bei *Cryptococcus laurentii* als antagonistischer Wirkmechanismus keine Rolle (FILONOW et al. 1996).

Tabelle 134: Antagonistische Wirkungen von *Cryptococcus laurentii* und *Aureobasidium pullulans*

<b><i>Chryprococcus laurentii</i> auf folgende Kulturpflanzen</b>	<b>Antagonistische Wirkung gegen:</b>	<b>Literatur</b>
Arbutusbeeren ( <i>Mycira rubra</i> )	<i>Penicillium citrinum</i> und <i>Verticicladiella abielina</i>	ZHENG et al. 2004
Birne	<i>Penicillium expansum</i>	LIMA et al. 1998, 1999b; Benow und Sugar 1999; ZHANG et al. 2003
Apfel	<i>Penicillim expansum</i>	CHAND-GOYAL und SPOTTS 1996a; LIMA et al. 1998, 1999b, 2003; CALVO et al. 2003; HE et al. 2003
Apfel	<i>Botrytis cinerea</i>	ROBERTS 1990; LIMA et al. 1998, 2003; CALVO et al. 2003
Apfel	<i>Pezicula alba</i>	GRABOWSKI 1999
Apfel; Birne; Stachelbeere; Kiwi; Weintrauben; Citrus; Pfirsiche; Pflaumen; Oliven	<i>Aspergillus niger</i> ; <i>Botrytis cinerea</i> ; <i>Rhizopus stolonifer</i> ; <i>Penicillim expansum</i>	LIMA et al. 1998, 1999b
Weizen; Reis	<i>Septoria nodorum</i> ; <i>Cochliobolus sativus</i>	Fokkema et al. 1975, 1979
Rosen	<i>Botrytis cinerea</i>	REDMOND et al. 1987
Mais	<i>Colletotrichum graminicola</i>	WILLIAMSON und FOKKEMA 1985
Jujube	<i>Alternaria alternata</i> ; <i>Monilia fructicola</i>	QIN und TIAN 2004
<b><i>Aureobasidium pullulans</i> auf folgende Kulturpflanzen</b>		
Apfel	<i>Botrytis cinerea</i>	FALCONI und MENDGEN 1994; LEIBINGER et al. 1997; LIMA et al. 2003
	<i>Penicillium expansum</i>	FALCONI und MENDGEN 1994; LEIBINGER et al. 1997; LIMA et al. 1998, 2003; JANISIEWICZ et al. 2000
	<i>Pezicula malicortis</i>	LEIBINGER et al. 1997
	<i>Monilia fructigena</i>	FALCONI und MENDGEN 1994
Erdbeere	<i>Rhizopus</i> spp.	LIMA et al. 1997a, b
	<i>Botrytis cinerea</i>	LIMA et al. 1996, 1997; ADIKARAM et al. 2002
Weintrauben	versch. Nacherntepathogene	SCHENA et al. 2002
	<i>Botrytis cinerea</i>	SCHENA et al. 1999, LIMA et al. 1999c

### 3.1.5.2 Toxin-Synthese von Hefen

Wie viele *Cryptococcus*-Arten produziert auch *Cryptococcus laurentii* ein Toxin (Mycocin), das ein Protein mit spezifischer Toxizität ist (VITAL et al. 2002). Verschiedene Stämme produzieren Toxine mit unterschiedlichen Wirkungsspektren. Einige wirken nur gegen andere *Cryptococcus*-Spezies andere gegen Atractiellales, Filobasidiales und Tremellales und nicht-sporenbildende basidiomycetische Hefen (GOLUBEV und KUZNETSOVA 1989). Bei der Abwehr von anderen *Cryptococcus* Arten zeigt sich, dass das Mycocin nicht bei allen Gattungsverwandten gleich wirksam ist. So zeigt das Toxin gegen *Cryptococcus neoformans* var. *Gattii* eine hemmende Wirkung, gegen var. *Neoformans* hingegen nicht (BOEKHOUT und SCORZETTI 1997). Innerhalb einer Hefespezies kann die Sensitivität gegenüber Mycocinen unterschiedlich sein.

*Aureobasidium pullulan* synthetisiert ein  $\alpha$ -Glucan (Pullulan). Nach MCMAHON et al. (1999) ist die Hefe befähigt sowohl  $\alpha$ -L-Arabinofuranosid,  $\beta$ -Glucosid,  $\alpha$ -L-Rhamnopyranosid als auch Glycoside, die in Weintrauben gefunden wurden, zu hydrolisieren. Auf einem Apfelpektin-haltigen Medium bildet *Aureobasidium pullulans* extrazellulär Aktivitäten gegen Pektin (MANACHINI et al. 1988). Bisher konnten zwei Pektin-Hydrolasen und zwei Pektin-Lyasen aufgereinigt und charakterisiert werden.

### 3.1.5.3 Synergistische Effekte von Hefen und Fungiziden

Als Zusatz zu einem Fungizid kann eine Hefe eine synergistische Wirkung haben. So hatte *Cryptococcus laurentii* keinen hemmenden Einfluss auf den Befall mit *Monilia* bei Äpfeln. Und auch die Variante mit dem Fungizid 20  $\mu$ g/ml Iprodion allein zeigte keine signifikant hemmende Wirkung. Kombiniert man hingegen *Cryptococcus laurentii* mit 20  $\mu$ g/ml Iprodion, zeigte sich die gleiche Wirkung wie die in der Praxis verwendete Iprodion-Konzentration von 1175 $\mu$ g/ml (CHAND-GOYAL und SPOTTS 1996a). Dieser synergistischer Effekt wird auch bei dem Einsatz von Benomyl gefunden (LIMA et al. 2003).

### 3.1.6 Kalluskulturen als Modellsystem

Bei der Verwendung von Kalluskulturen als Modellsystem muss man immer vor Augen haben, dass es sich dabei um undifferenziertes Gewebe und nicht um Pflanzen handelt, die aus verschiedenen Gewebetypen mit unterschiedlichen Eigenschaften und Funktionen bestehen. Es gibt weder ein Spross- noch ein Wurzelsystem. Aus diesem Modellsystem gewonnene Ergebnisse können nicht automatisch auf Pflanzen übertragen werden, die unter realen Bedingungen gewachsen sind. Dennoch bietet sich dieses Modellsystem für Untersuchungen der Wirkung von Elicitoren oder Wirt-Pathogen-Wechselbeziehungen auf Zellebene an, da störende Einflussfaktoren ausgeschlossen werden können.

Besonders bei Untersuchungen des Sekundärstoffwechsels von Kalluskulturen, haben nicht nur das Alter und das Ausgangsgewebe sondern auch die Medienzusammensetzung und die Kulturbedingungen Einfluss auf die Zusammensetzung der phenolischen Inhaltstoffe. Während das Wachstum des Kallus bei *Vitis vinifera* hauptsächlich durch ABA, BA und Zucker im Medium beeinflusst wird, hat der Saccharose-Gehalt bis 4g/Liter Medium einen signifikant positiven Einfluss auf den Flavanol-Gehalt bei Kalluskulturen (FEUCHT et al. 1996) und die Akkumulation der Anthocyane in Zellsuspensionskulturen (LARRONDE et al. 1998). Dabei spielt die Saccharose keine osmotische Rolle, da Mannitol und Sorbitol keine Effekte aufweisen. Die Synthese von Stilbenen, sowohl des trans- als auch des cis-Piceid, verläuft, wie die Biomassenproduktion, unabhängig vom Saccharoseangebot (LARRONDE et al. 1998). Bei einer Kombination von geringen Stickstoff- und hohen Zuckerraten in Kulturmedien von Weinzellen stellten HIRASUNA et al. (1991) zunehmende Gehalte an Anthocyanen fest. Das Trockengewicht von *Vitis vinifera*-Zellsuspensionskulturen blieb bei Verwendung von Kinetin im Medium unverändert, jedoch erhöhte sich gleichzeitig die Anthocyan-Konzentration. BAP hatte den gegenläufigen Einfluss. Eine Steigerung der Auxin-Konzentrationen im Medium führte zu reduzierten Anthocyan-Konzentrationen, wobei das Trockengewicht unverändert blieb (KRISA et al. 1999b).

Um geringe Gehalte an Stilbensynthese bei nicht induzierten *Vitis vinifera*-Zellsuspensionskulturen, die eine hohe Sensitivität gegenüber einem Elicitor aufweisen, zu erlangen, verminderten LISWIDOWATI et al. (1991) die Calcium-Konzentration im Medium. Kallus- bzw. Zellsuspensionskulturen können, wie HRAZDINA et al. (1997) an Apfelpfanzkulturen, die nach einer Behandlung mit Hefeextrakt Malusfuran akkumulierten, demonstrieren, andere phenolische Verbindungen als ihre Ausgangspflanzen aufweisen. Bei Apfelpflanzen konnte dieses Phytoalexin bislang noch nicht nachgewiesen werden.

Der Einfluss des Zellenalters auf den Sekundärstoffwechsel wird besonders in Zellsuspensionskulturen deutlich. So ist bei PELTONEN et al. (1997) die Reaktionsfähigkeit von Bohnen- und bei FUNK et al. (1987) von *Glycine max*- und *Thalictrum rugosum*-Zellkulturen auf eine Elicitor-Behandlung abhängig vom physiologischen Stadium der Zellen. Bei diesen Versuchen verhielten sich die Zellsuspensionskulturen etablierter Zellkulturen sensibler gegenüber einer Elicitorbehandlung als jüngere Zellkulturen.

### 3.1.7 Weinsorten „Nero“ und „Regent“

Die frühreife, 1965 von Jozef Csizmazia in Ungarn (Eger) aus („Medoc Noir“ x „Perle von Csaba“) x (S.V. 12375 x „Gardonyi“) gezüchtete Rotweinsorte „Nero“ weist, neben einer guten Frostverträglichkeit, einen mittleren Resistenzgrad gegen Falschen Mehltau und *Botrytis cinerea* auf. Größere Infektionsstellen nach einer Infektion mit falschem Mehltau treten als Folge einer hypersensitiven Reaktion auf (SZÖKE et al. 1997).

Die Rebsorte „Regent“ stammt aus Zuchtprogrammen des Geilweilerhofs (Deutschland) und ist eine mittelfrühe Rotweinsorte mit mittlerem bis starkem Wuchs. Da die Befallsstärke mit Falschem Mehltau je nach Standort, Jahr und Kulturmaßnahme stark variiert, gilt diese Sorte als teilresistent. Die *Oidium*-Resistenz ist in den meisten Fällen ausreichend, auch der Rotbrenner führt bei dieser Rebsorte zu keinen nennenswerten Ausfällen. Die *Botrytis*-Resistenz der Trauben ist hoch, jedoch kann es im Frühjahr zu Ausfällen durch Frühbotrytis kommen (SZÖKE et al. 1997).

## 3.2 Material und Methoden

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Möglichkeit einer Induktion von phenolischen Verbindungen durch endophytisch isolierte Hefen als Einflussgröße auf das Resistenzpotential von Wein untersucht werden. Ferner sollten Wechselwirkungen zwischen der N-Versorgung der Pflanzenzelle und der Elicitierbarkeit betrachtet werden. Um eine optimale Wechselwirkung zwischen Pflanzenzelle und potentiell Hefe-Elicitor zu gewährleisten, wurde die Kalluskultur als Modellsystem verwandt.

### 3.2.1 In vitro Kultivierung und Vermehrung der Hefeisolate

Die Hefeisolate wurden von Apfelblättern der Sorte „Golden Delicious“ aus der Versuchsanlage des Fachgebietes für Obstbau der TU München-Weihenstephan isoliert. Die Isolate wurden in Petrischalen auf PCH-Medium (Plate count modifiziert für Hefen), bestehend aus 5 g/Liter Glucose (Merck), 5 g/Liter Pepton aus Casein (Merck), 0,25 g/Liter eines Hefeextraktes (Merck) und 9 g/Liter Agaragar, kultiviert. Um die Isolate langfristig kultivieren zu können, wurden sie im Dunkeln auf einem Wasser-Agar mit 9 g/Liter Agaragar kultiviert und die Petrischalen, um ein Austrocknen der Kultur zu verhindern, mit Parafilm verschlossen. Auf diesem Medium bildeten die Isolate dunkle hyphenähnliche Auswüchse, die sich auch nach zweijähriger Einlagerung durch ein Umsetzen auf PCH-Medium wieder zum Wachstum mit Kolonienbildung anregen ließen.

Die verschiedenen Hefestämme wurden einem Screening bezüglich ihrer Induktionsfähigkeit unterzogen.

Die Identifikation von drei der vier wirksamsten Isolate erfolgte, anhand physiologischer Testverfahren, zwei von ihnen mittels 28S-rDNA-Teilsequenzierung, durch Dr. Herbert Seiler vom Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittelforschung, Abteilung Mikrobiologie (Leitung: Prof. Dr. Siegfried Scherer). Für die Auswertung der physiologischen Tests wurde die Vergleichsdatenbank ‚Yeast Identification Program‘ von BARNETT (1996) verwendet. Der Abgleich der 28S-rDNA-Teilsequenzierung erfolgte anhand der NCBI Blastn 2.2.9 [Mai 01-2004]-Datenbank.

### 3.2.2 Weinkalluskulturen

Als Versuchssystem dienten Weinkalluskulturen der Sorten „Regent“ und „Nero“. Die Kalli wurden im vierwöchigen Kulturintervall auf einem Filterbrückensystem bei 22°C und 16 Stunden Belichtung mit  $60 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  auf einem Medium nach MURASHIGE und SKOOG (1962), mit den in Tabelle 15 aufgeführten Nährstoffen und den in Tabelle 16 dargestellten Modifikationen, kultiviert.

Tabelle 14: Nährstoffkombinationen der Medien für die Weinkalluskultivierung angelehnt an das Grundmedium von Murashige und Skoog (1962)

Nährstoffkomponente	Chemische Darstellung der Nährstoffkomponente	Konzentration im Nährmedium [mg/L]
Ammoniumnitrat	(NH <sub>4</sub> )NO <sub>3</sub>	1650
Kaliumnitrat	KNO <sub>3</sub>	1900
Calciumchlorid	CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	440
Kaliumdihydrogenphosphat	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
Magnesiumsulfat	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	370
Natrium-Eisen-EDTA	NaFe-EDTA	36.7
Mangansulfat	MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	16.9
Zinksulfat	ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	8.7
Borsäure	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2
Kaliumjodid	KJ	0.83
Natriummolybdat	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0.025
Kupfersulfat	CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0.0025
Coboltchlorid	CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0.0025
Thiamindichlorid		0.1
Pyridoxolhydrochlorid		0.5
Nicotinsäure		0.5
Myoinosit		100
Glycin		2
Saccharose		40000
Benzaminopurin	Cytokinin-Komponente	0.2
Indolessigsäure	Auxin-Komponente	10
pH-Wert		5.7

Tabelle 15: In den Versuchen 1 und 2 verwendete Stickstoff-Varianten

N-Variante	Bezeichnung	Ammoniumnitrat [in mg/L Nährmedium]	Kaliumnitrat [in mg/L Nährmedium]
N-mangelversorgt	N ½	0	950
N-optimalversorgt	N 1	1650	1900
N-überversorgt	N 3	4950	1900

### 3.2.3 Induktionsversuche

Für Induktionsversuche wurden die Kalluskulturen einer zweiwöchigen Vorkultivierung auf einem Filterbrückensystem unterzogen. Das Hefefiltrat wurde dem Kulturmedium des

Weinkallus zugesetzt, ohne dass Elicitorlösung direkt an oder über den Kallus gelangte. Als Kontrollvariante diente eine Zugabe von K2-Medium, dem 5 g Glucose pro Liter zugesetzt wurden. In Versuch 2 erfolgte die Kontrollbehandlung mit K2-Medium ohne Glucosezusatz. Die Kulturbedingungen blieben vor und nach der Induktion bis zur Probenahme konstant.

### **3.2.3.1 Kultivierung der Hefe**

Um den Einfluss zusätzliche Faktoren möglichst gering zu halten, wurden die Hefeisolate im selben Kulturmedium angezogen wie die Kalluskulturen. Als Kulturgefäße dienten 250 ml Erlenmeyerkolben mit Sterilstopfen. Von einem 48 Stunden alten Plattenausstrich auf PCH-Medium (5g Glucose/l, 5 g Pepton aus Casein/l und 5 mg Hefeextrakt /l Merck) wurden Hefekolonien in 100 ml K2-Nährlösung mit 5 g Glucose überführt, bevor die Suspension auf einem Schüttler mit 100 U/min bei 24°C und Dunkelheit für weitere 48 Stunden kultiviert wurde.

Für die Verwendung in Elicitationsversuchen wurde die Suspension mit K2 Medium auf eine Zelldichte von  $4 \cdot 10^{12}$  Zellen pro ml eingestellt und anschließend bei 121°C für 20 Minuten autoklaviert, um die Zellen abzutöten. Der pH-Wert der abgekühlten Hefesuspension wurde mittels 1-molarer HCl-Lösung auf 5,7 eingestellt. Ein anschließendes zehnmütiges Abzentrifugieren bei 3000 U/min ermöglichte die Trennung von Zellmaterial und Kulturfiltrat.

### **3.2.3.2 Elicitation mit einzelnen Hefestämmen**

Um die Variabilität verschiedener Hefestämmen bezüglich ihrer Elicitationsfähigkeit zu untersuchen, wurden 15 Hefeisolate separat kultiviert, die Kulturfiltrate wie oben beschrieben gewonnen und jeweils 10 ml eines Kulturfiltrates in die schon vorhandenen 10 ml Kulturmedium der Kalluskultur gegeben, sodass sich eine Kulturfiltratsendverdünnung von 1:1 (v:v) ergab. Anschließend wurden die Stämme einem Screening bezüglich ihrer Induzierbarkeit von Polyphenolen unterzogen. Vier Stämme (S4, S3.2, 10/8, 10/3) wurden ausgewählt und in den folgenden Induktionsversuchen einzeln oder als Gemisch verwendet. Das Kulturfiltrat dieser 4 Stämme wurde in Versuch 3, jeweils in einem Mischungsverhältnis von 1:1 (v:v), dem Kulturmedium der Kalluskultur zugeführt.

### **3.2.3.3 Elicitation mit einer Mischsuspension**

Für die Herstellung einer Suspension, die alle Hefeisolate enthielt, wurden die Hefeisolate S4, S3.2, 10/3 und 10/8 zuerst einzeln kultiviert und dann zu einer Mischsuspension vereint, bevor sie die Arbeitsschritte zur Kulturfiltratgewinnung durchliefen. Für die Versuche 1 (Hefe 50%) und 2 wurde dem Kulturmedium der Kalluskultur das Kulturfiltrat der Mischsuspension unverdünnt in einem Mischungsverhältnis von 1:1 (v:v) zugeführt. Für Versuch 1 (Hefe 5%)



wurde das Kulturfiltrat der Mischsuspension nochmals 1:10 mit K2-Medium verdünnt, bevor es dem Kulturmedium der Kalluskultur wiederum in einem Mischungsverhältnis von 1:1 (v:v) zugefügt wurde. Diese Variante wird in den Versuchsauswertungen als Behandlung mit Hefefiltrat bezeichnet.

#### **3.2.3.4 Elicitation mit verschiedenen aufbereiteten Mischsuspension**

Für die Durchführung von Versuch 4 wurde eine Mischsuspension hergestellt und das Kulturfiltrat, wie oben beschrieben, gewonnen. Anschließend wurde das Kulturfiltrat verschiedenen Aufbereitungsmethoden unterzogen. In der 1. Variante wurde es, wie bisher üblich, dem Kulturmedium der Kalluskultur in einem Mischungsverhältnis von 1:1 (v:v) zugesetzt. Um für Variante 2 und 3 die hydrophilen von den hydrophoben Bestandteilen zu trennen, wurde das Kulturfiltrat dreimal mit Ethylacetat ausgeschüttelt und die Ethylacetatphase in einem Scheidetrichter von der Wasserphase getrennt.

Für die 2. Variante wurde das Lösungsmittel aus der Ethylacetatphase im Rotationsverdampfer verdampft und die hydrophoberen Verbindungen mit K2 Medium auf das Ausgangsvolumen gebracht. Der pH-Wert dieser Variante wurde mittels 1-molarer HCl-Lösung auf 5,7 eingestellt, und in einem Mischungsverhältnis von 1:1 dem Kulturmedium der Kalluskultur zugesetzt.

Die 3. Variante enthielt die in der Wasserphase gelösten hydrophileren Verbindungen des Hefefiltrates. Für die Herstellung dieser Variante wurde die Wasserphase in einem Rotationsverdampfer getrocknet und die verbliebenen Verbindungen wie in der 2. Variante in K2 Medium gelöst. Der pH-Wert wurde auf 5,7 justiert und in einem Mischungsverhältnis von 1:1 dem Kulturmedium der Kalluskultur zugesetzt.

Für die 4. Variante dieses Versuches wurde eine 1%ige Lösung eines Hefeextraktes (Merck) in K2 Medium mit einem pH-Wert von 5,7 verwendet und diese in einem Mischungsverhältnis von 1:1 (v:v) dem Kulturfiltrat der Kalluskultur zugesetzt.

#### **3.2.3.5 Probenahme**

Die Probenahmen erfolgten 5, 10, 24, 48 und 72 Stunden nach Elicitation durch Schockgefrieren der Weinkalli mit Flüssigstickstoff. Bis zur Gefriertrocknung wurden die Proben bei  $-20^{\circ}\text{C}$  zwischengelagert.

Bei der Extrakterstellung für die Polyphenolanalysen wurden jeweils 5 Kalli zu einer Mischprobe vereint. Die Extraktionsmethode wurde im Kapitel 2.2 beschrieben.

### 3.2.3.6 Inokulation mit *Botrytis cinerea*

#### Kultivierung von *Botrytis cinerea*

Das von Erdbeeren gewonnene Isolat von *Botrytis cinerea* wurde auf PDA-Platten bei 18°C im Dunkeln kultiviert. Nach einer Kulturdauer von ca. 2 Wochen waren die Agarplatten von dem Konidien-bildenden Pilzmycel überzogen. Dieser Mycelüberzug wurde mit 10 ml einer sterilen 0,6%-igen NaCl-Lösung übergossen und die Konidien mittels Spatel vom Mycel abgetrennt und in die Lösung überführt. Die Sporenlösung, die natürlich auch Mycelbruchstücke enthielt, wurde auf eine Konidienkonzentration von  $1 \times 10^6$  Konidien/ml justiert.

#### Inokulation der Kalluskultur mit *Botrytis cinerea*

Die Weinkalli wurden wie in Versuch 2 mit einer Mischsuspension aus den Kulturfiltraten der vier Hefeisolate behandelt. 24 Stunden nach der Elicitation wurde auf jeden Weinkallus ein 50 µl-Tropfen der *Botrytis cinerea*-Konidiensuspension gegeben. Der auf die Oberseite des Kallus platzierte Tropfen sollte dabei nicht am Kallus herunterlaufen, um eine an mehreren Seiten beginnende Infektion zu verhindern. Die Probenahme erfolgte 24, 48, 72 und 96 Stunden nach der Hefebehandlung bzw. 0, 24, 48 und 72 Stunden nach der *Botrytis cinerea*-Inokulation. Die Bonituren wurden 24, 48 Stunden und 1 Woche nach der Inokulation mit *Botrytis cinerea* durchgeführt.

### 3.2.3.7 Stoffgruppenzuordnung

Anhand der in Kapitel 2.3 identifizierten Verbindungen wurden, die bei der Auswertung der Induktionsversuche gefundenen Verbindungen bezüglich ihrer chemischen Zusammengehörigkeit in Stoffgruppen zusammengefasst. Diese Zuordnungen wurde in allen Versuchen gleichermaßen vorgenommen und sind in Tabelle 17 dargestellt.

Dabei wiesen die als einfache Phenole bezeichneten Verbindungen ein UV-Spektrum mit einem Maximum bei  $\lambda = 293$  nm und  $T_1 = 284$  nm auf. Der Spektrenverlauf der einfachen Phenole mit Spektrum 2 ähnelt dem von Peak QQ (Abbildung 17) mit Absorptionsmaxima: I= 282 nm, sh 305 nm; K= 280 nm; N= 282 nm, sh 313 nm; U=282 nm, sh 320 nm.

Tabelle 16: Stoffgruppenzuordnung für die Versuche 1 bis 4

<b>Stoffgruppe</b>	<b>Peak (Verbindung)</b>
monomere Catechine	H (Catechin), S (Epicatechin), V (Epicatechingallat)
oligomere Catechine	E (B1), G (B3)
einfache Phenole	A, Peak 4, T1
einfache Phenole mit Spektrum 2	I, K, N, U
Benzoessäuren	B (Gallussäurederivat), C (Protocatechusäure), M (Vanillinsäure)
Hydroxycimtsäuren	L (p-Cumarsäure-Derivat), AA (Kaffeensäure-Derivat)
Flavonole	HH, T2
Anthocyane	BB, II
monomere trans-Resveratrol-Derivate	Z (trans-Piceid), T, X
monomere cis-Resveratrol-Derivate	EE (cis-Piceid), J, Y, Z0, Z1, Z2
trans-Resveratrol (Aglykon)	trans-Resveratrol
dimere Resveratrol-Derivate (Pallidol-Derivate)	O, P, Q, R, CC, DD, DD1
oligomere trans-Resveratrol-Derivate	RR, VV, WW
oligomere cis-Resveratrol-Derivate	GG, OO, PP, MM, NN
oligomere cis-/trans-Resveratrol-Derivate	KK, LL, QQ, TT, SS, UU, XX, YY

### 3.3 Ergebnisse

#### 3.3.1 Identifikation der Hefestämme nach physiologischen Testverfahren

Da alle vier Isolate makroskopisch und mikroskopisch auf Kartoffel-Dextrose-Agar (Difco), Plate count (PC)-Medium und Wasseragar gleiche physiologische Eigenschaften aufwiesen, hielt es das untersuchende Institut für ausreichend, nur drei der Stämme näher zu charakterisieren. Aufgrund der in Tabelle 18 aufgeführten Wachstumseigenschaften der Hefeisolate bei unterschiedlichen physiologischen Bedingungen und deren Fähigkeit zur

Tabelle 17: Wachstumsverhalten der Hefeisolate S 3.2, 10/8 und S4

Wachstums- verhalten	S 3.2	10/8	S 4	Wachstums- verhalten	S 3.2	10/8	S 4
D-Glucose	-	-	-	2-Keto-D-gluconat	+	+	+
Wachstum auf				5-Keto-D-gluconat	+	+	+
D-Glucose	+	+	+	D-Gluconat	+	+	+
D-Galactose	+	+	+	D-Glucuronat	+	+	+
L-Sorbose	+	+	+	DL-Lactat	-	-	-
D-Glucosamin	+	+	+	Succinta	+	+	+
D-Ribose	+	+	+	Citrat	+	+	+
D-Xylose	+	+	+	Nitrit	+	+	+
L-Arabinose	+	+	+	Ethylamin	+	+	+
L-Rhamnose	+	+	+	L-Lysin	+	+	+
Saccharose	+	+	+	Cadaverin	+	+	+
Maltose	+	+	+	Glucosamin (Nitrogen)	+	+	+
$\alpha,\alpha$ -Trehalose	+	+	+	W/o Vitamine	+	+	+
Me $\alpha$ -D-Glucosid	-	-	-	W/o Thiamin	+	+	+
Cellobiose	+	+	+	Bei 25 °C	+	+	+
Salicin	+	+	+	Bei 30 °C	+	+	+
Arbutin	+	+	+	Bei 37 °C	-	-	-
Melibiose	+	+	+	Bei 40 °C	-	-	-
Lactose	-	-	-	0,01% Cycloheximid	-	-	-
Raffinose	+	+	+	0,1% Cycloheximid	-	-	-
Melezitose	+	+	+	Harnstoff-Hydrolyse	+	+	+
Glycerol	+	+	+	Pinkfarbene Kolonien	-	-	-
Erythritol	+	+	+	Zellknospen	+	+	+
Ribitol	+	+	+	Zitronenförmige Zellen	-	-	-
Xylitol	+	+	+	Knospen mit Stielen	-	-	-
L-Arabinitol	+	+	+	sich teilende Zellen	-	-	-
D-Glucitol	+	+	+	Filamente	+	+	+
D-Mannitol	+	+	+	Pseudohyphen	+	+	+
Galactitol	+	+	-	Septierte Hyphen	-	-	-
Myo-Inositol	+	+	+	Arthronidien	-	-	-
D-Glucono-1,5-lacton	-	+	+	Blastokonidien	-	-	-
				Identifiziert als <i>Cryptococcus laurentii</i>	100%	99%	17,3%

Umsetzung von verschiedenen Nährstoffen, wurde das Isolat 10/8 nach einem Abgleich mit der Vergleichsdatenbank zu 99%, das Isolat S 3.2 sogar zu 100% als *Cryptococcus laurentii* identifiziert. Dem Isolat S4 mangelte es an der Fähigkeit Galactitol umzusetzen, so dass die Übereinstimmung-Wahrscheinlichkeit nur 17,3% betrug.

### 3.3.2 28S-rDNA-Teilsequenzierung

Der Blast-Search der beiden Hefeisolate 10/3 und 10/8 ergab mit gleichen Homologiewerten (score = 1146 entspricht 100%) die Art *Aureobasidium pullulans*. Beide Stämme hatten eine identische Sequenz. Es konnten keine Homologiewerte zu der Art *Chryptococcus laurentii* festgestellt werden.

### 3.3.3 Versuchsaufstellung zur Induktion von Kalluskulturen

Im Rahmen dieser Dissertation wurden verschiedene Versuche mit unterschiedlichen Untersuchungsschwerpunkten durchgeführt. Die Versuchsparemeter und die jeweiligen Fragestellungen sind in Tabelle 19 aufgeführt.

### 3.3.4 Kallusgewicht der Versuche

Da das Zellalter Einfluss auf die Stoffwechselaktivität und somit auf die Polyphenolgehalte und die Induzierbarkeit des Kallus hat, sollte sich das Versuchsmaterial in einem möglichst homogenen Alterszustand befinden. Um diesen Aspekt genauer zu untersuchen, wurde das Frischgewicht der N 1-Variante von Versuch 1 in Abbildung 25 sowie das Trockengewicht der Kalli von Versuch 2 und Versuch 3 in Tabelle 20 aufgeführt.

Die Homogenität der Kalli wird besonders bei den unbehandelten Varianten deutlich. Da beim Einsetzen der Kultur die Kalli nicht gewogen wurden, zeigen sich bei Versuch 1 (Abbildung 29) in der unbehandelten Variante Biomassenunterschiede von maximal 25%. Ferner wiesen auch die behandelten Kalli innerhalb der 48 Stunden im Vergleich zu den unbehandelten hinsichtlich ihrer Biomasse auch keine deutlichen Unterschiede auf.

Die Trockengewichte der Kalli bei Versuch 2 wiesen auf eine gute Homogenität im Ausgangsmaterial hin, bei Versuch 3 waren die Schwankungen im Kallusgewicht etwas größer.

Die Schwankungen der Biomassen zwischen den verschiedenen Behandlungen schienen nicht auf den verschiedenen Hefeisolaten (Versuch 3) zu beruhen, sondern verhielten sich über alle Behandlungen gleich dynamisch.

Die ermittelten Werte belegten zwar die Homogenität der Biomasse im Versuchssystem, sie sagten jedoch nichts über den physiologischen Zustand der einzelnen Kalli aus.

Tabelle 18: Auflistung der durchgeführten Versuche an Weinkalli der Sorten „Regent“ und „Nero“ mit den dazugehörigen Fragestellungen und Versuchsparametern

Versuch	Fragestellung	Varianten	Sorte	Anzahl Kalli pro Variante
1	Elicitationsdynamik unter dem Einfluss von verschiedenen Stickstoffkonzentrationen im Medium und Elicitation mit zwei verschiedenen Hefefiltrat-Konzentrationen	N (1/2), N (1), N (3) 5,10,24,48 hnB Hefe (1:1); (19:1)	„Regent“	20
2	Wechselwirkung von Stickstoffkonzentration und Elicitation durch Hefefiltrat 48 Stunden nach Behandlung	N (1/2), N (1), N (3)	„Regent“	10
3	Elicitationsdynamik induziert durch verschiedene <i>Aureobasidium pullulans</i> -Isolate	S4, S3.2, 10/8, 10/3 und 5,10,24 HNB	„Regent“	40
4	Elicitationsreaktionen durch verschiedene Hefeaufbereitungen 48 Stunden nach Behandlung	Hefefiltrat Ethylacetatph. Hefe Wasserph. Hefe 1 %iger Hefeextrakt (Merck)	„Nero“	15
5	Wechselwirkungen von Elicitation durch Hefefiltrat und einer <i>Botrytis cinerea</i> -Infektion. Unterschiede in der Induzierbarkeit durch Behandlung mit Mykosin bzw. der Hefekomponente aus Mykosin	Nicht elicitiert (48,72,96 hnB) Nicht elicitiert + <i>B. c.</i> (48,72,96 hnB) Elicitiert (H.) (24,48,72,96 hnB) Elicitiert (H.) + <i>B. c.</i> (48,72,96 hnB) Elicitiert Mykosin (48,72,96 hnB) Elicitiert (H. Myk.) (48,72,96 hnB)	„Nero“	10 10 (+20 Bon.) 10 10 (+20 Bon.) 10 10

*hnB* :                         *Stunden nach Behandlung mit dem Elicitor*  
*S4, S3.2, 10/8, 10/3* *Hefeisolate von Aureobasidium pullulans/ Chytridococcus laurentii*  
*B.c.:*                         *Botrytis cinerea*  
*H.:*                             *Hefefiltrat*  
*H. Myk.:*                    *Hefekomponente aus Mykosin*  
*Bon.:*                         *Bonitur*

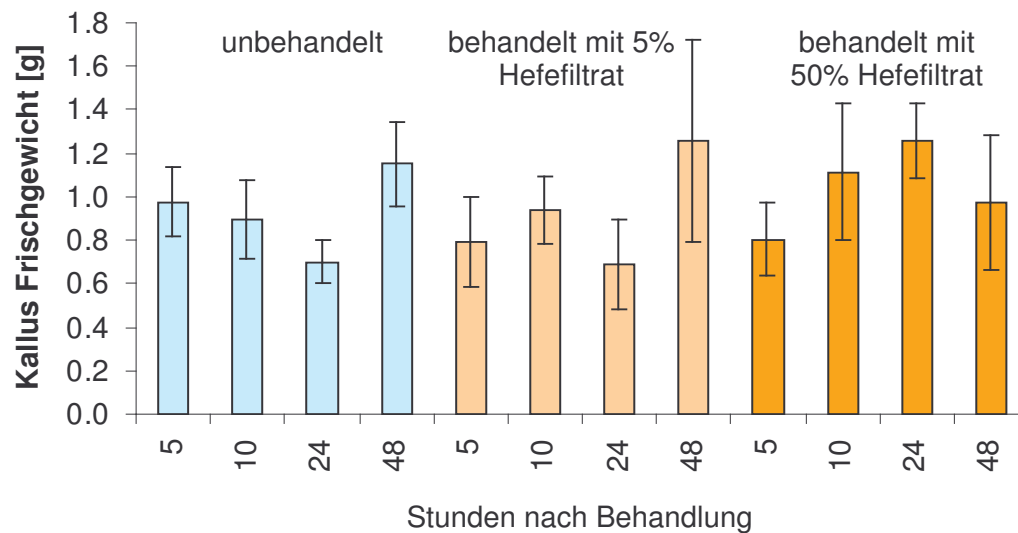


Abbildung 29: **Versuch 1:** Frischgewicht der unbehandelten Kontrollvariante, 5 und 50% mit Hefefiltrat behandelten Kalli gewachsen auf N1-Medium nach verschiedenen Entnahmeterminen. Messwerte (5, 10, 24, 48 Stunden nach Behandlung) aus: unbehandelt (je 8 Kalli); mit 5% Hefe behandelt (12, 8, 11, 9 Kalli); mit 50% behandelt (je 6 Kalli)  $\pm 0,5 \times$  Standardabweichung

Tabelle 19: Kallustrockengewichtsentwicklung von Versuch 2 und Versuch 3

Versuch	Behandlung	Entnahme [h]	Trockengewicht [mg]	S.E.	n
Versuch 2	Kontrolle	48	51.26	15.54	10
	Hefe	48	60.67	18.78	10
Versuch 3	Kontrolle	5	131.63	14.12	8
	Kontrolle	10	239.16	62.54	8
	Kontrolle	24	191.08	84.10	8
	S 4	5	146.03	50.84	6
	S 4	10	266.81	66.06	6
	S 4	24	162.33	57.72	8
	S 3.2	5	158.88	53.34	7
	S 3.2	10	254.95	60.60	5
	S 3.2	24	171.06	53.94	7
	10/8	5	217.67	61.88	8
	10/8	10	205.18	35.54	5
	10/8	24	168.67	38.80	7
	10/3	5	133.74	30.06	8
	10/3	10	254.50	62.02	11
	10/3	24	181.90	46.72	7

S.E.: Standardabweichung

n: Anzahl der gewogenen Kalli pro Variante

S4, S 3.2, 10/8, 10/3: Hefeisolate

### 3.3.5. Gesamtgehalt der Phenylpropanoide

In Versuch 3 wiesen die Weinkalli der Sorte „Regent“ konstantere Gesamtphenylpropanoid-Gehalte auf, was auf eine höhere Anzahl an Messungen im Vergleich zu Versuch 1 zurückzuführen sein könnte. Auch bei diesem Versuch konnten leichte Induktionen der Gesamtgehalte festgestellt werden (Abbildung 30 B). Eine deutlich sichtbarere Induktion der Gesamtphenole durch Elicitation mit Hefefiltrat in Versuch 2 (Abbildung 30 C), könnte in einer starken Streuung durch eine unzureichende Probenanzahl pro Variante begründet liegen.

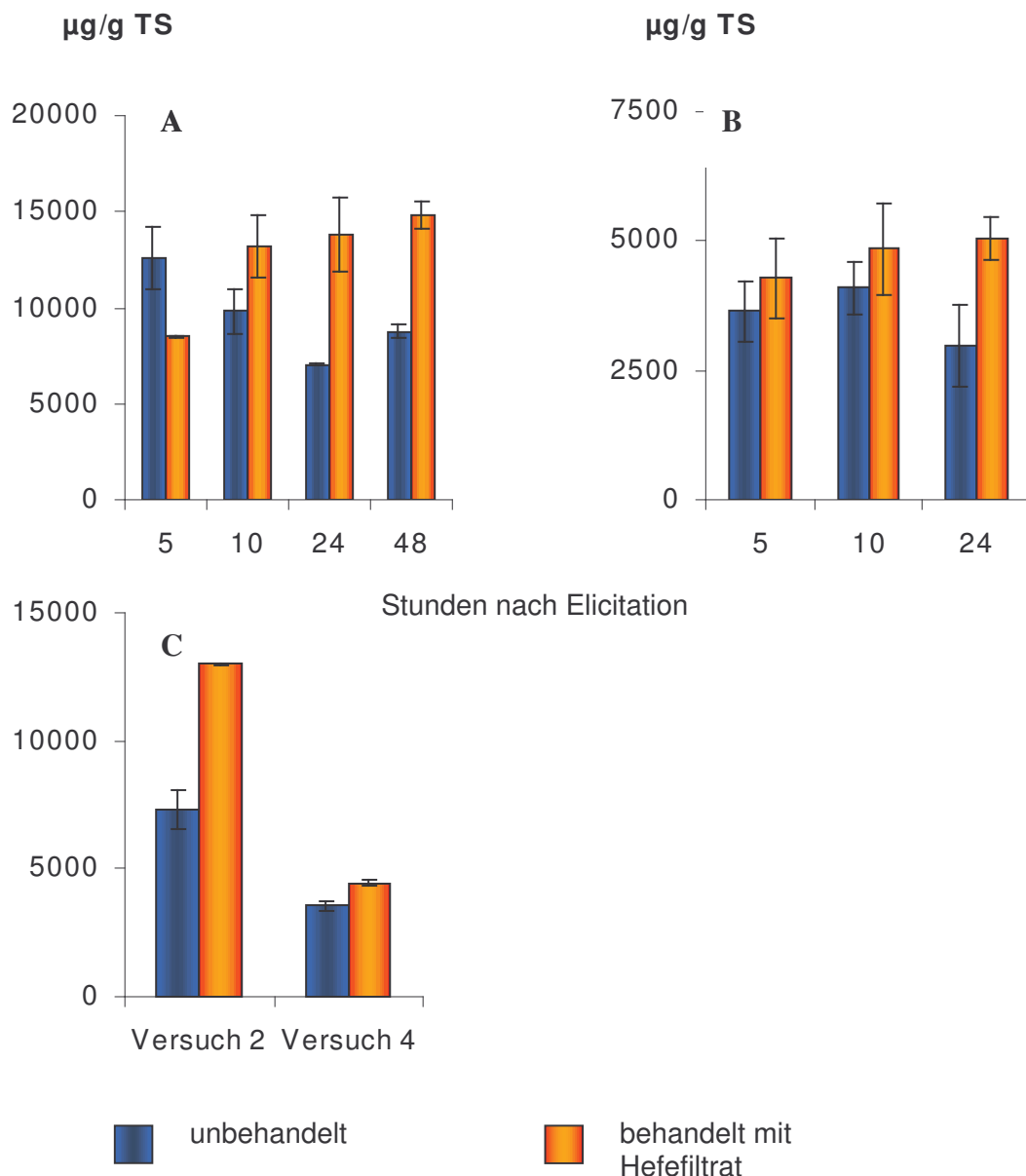


Abbildung 30: Gesamtphenolgehalt von unbehandelten im Vergleich zu mit Hefefiltrat elicitierten Weinkalli **A: Versuch 1** („Regent“) Mittelwerte aus 4 Messwerten  $\pm 0,5 \times$  Standardabweichung **B: Versuch 3** („Regent“) Mittelwerte aus 8 (unbehandelte Kalli) bzw. 6 (Hefe S4 behandelte) Kalli  $\pm 0,5 \times$  Standardabweichung **C: Versuche 2** („Regent“) Mittelwert aus 2 Messwerten und **Versuch 4** („Nero“) Mittelwert aus 6 Messwerten beide 48 Stunden nach Behandlung mit Hefefiltrat.



Die Gesamtgehalte an Polyphenolen lagen bei der Weinsorte „Nero“ etwas niedriger als bei „Regent“, wie in Abbildung 30 C für Versuch 4 dargestellt ist. Aber auch hier war eine tendenzielle Zunahme der Summe an Phenylpropanoiden erkennbar.

### 3.3.6 Catechine

Die Gesamtgehalte der Catechine (monomere Catechine) und Proanthocyanidine (oligomere Catechine) im Weinkallus „Regent“ unterlagen im Versuch 1 schon in der unbehandelten Variante großen Schwankungen innerhalb der verschiedenen Entnahmetermine (Abbildung 31 A) mit einer tendenziellen Gehaltsabnahme 24 Stunden nach der Kontrollbehandlung. Nicht nur die unbehandelten Varianten, sondern auch die mit Hefefiltrat elicitierten Kalli zeigten eine starke Streuung bei den einzelnen Entnahmetermenen, sodass sich keine eindeutige Gesetzmäßigkeit erkennen ließ.

Die unbehandelten Kalli in Versuch 3 zeigten zwischen den einzelnen Entnahmetermenen zwar keine so großen Schwankungen im Gehalt der monomeren Catechine, wie die in Versuch 1, jedoch war die Streuung der einzelnen Messwerte so groß, dass auch hier nur Tendenzen bezüglich dem Induktionsverhalten nach einer Elicitation mit Hefefiltrat erkannt werden konnten. Tendenziell war ein mit zunehmender Elicitationsdauer abnehmender Gehalt an monomeren Catechinen zu beobachten.

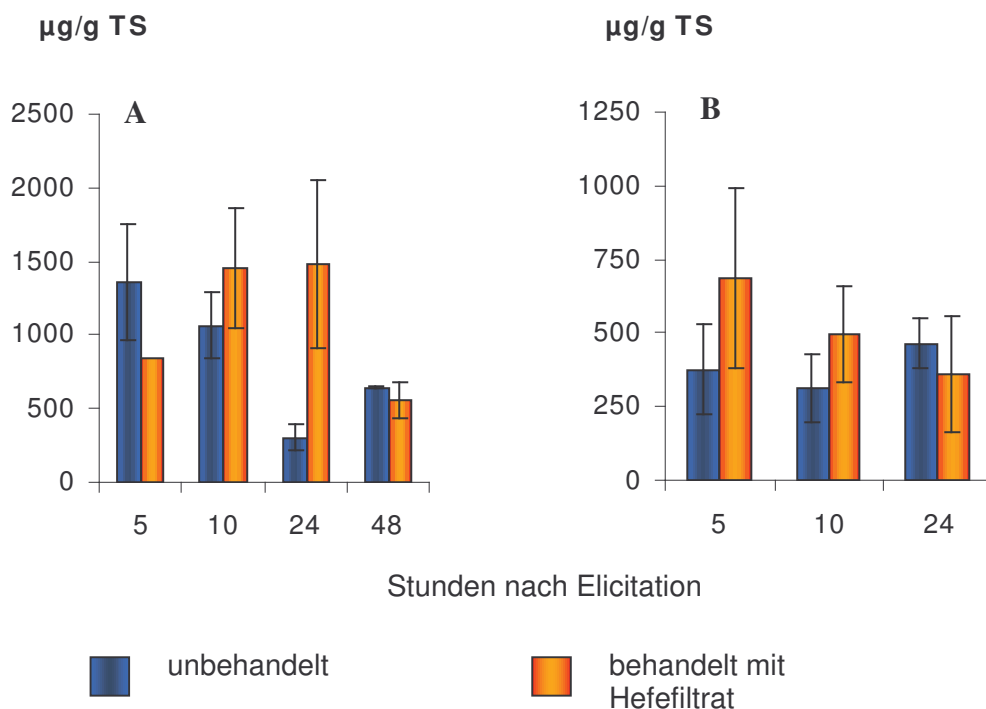


Abbildung 31: Catechine von unbehandelten im Vergleich zu mit Hefefiltrat elicitierten Weinkalli zu verschiedenen Entnahmetermenen. **A: Versuch 1** („Regent“) Mittelwerte aus 4 Messwerten; **B: Versuch 3** („Regent“) Mittelwerte aus 8 Messwerten (unbehandelte Kalli) bzw. 6 Messwerten (Hefe S4 behandelte) Kalli  $\pm 0,5 \times$  Standardabweichung.

In Versuch 2 unterschieden sich die Gehalte der monomeren Catechine mit 1376 µg/mg Trockensubstanz ( $\pm 74,9\mu\text{g/g TS} = 0,5 \times \text{Standardabweichung}$ ) in der unbehandelten Variante und 1354 µg/g Trockensubstanz ( $\pm 107,9 \mu\text{g/g TS}$ ) in der mit Hefefiltrat behandelten Weinkalli der Sorte „Regent“ 48 Stunden nach Elicitation nur unwesentlich voneinander.

Bezüglich der Dynamik und dem Induktionsverhalten gegenüber einer Elicitation mit Hefefiltrat verhielten sich die Gehalte der oligomeren Catechine identisch wie die monomeren Flavane (Tabelle 21). In den Weinkalli der Sorte „Nero“ in Versuch 4 sind nur geringe Gehalte an Catechinen festzustellen gewesen.

Tabelle 20: Oligomere Catechine von unbehandelten und mit Hefefiltrat elicitierten Weinkalli der Sorte „Regent“ in den Versuchen 1–3

	Stunden nach Elicitation	unbehandelte Kalli			elicitierte Kalli		
		Mittelwert [µg/g TS]	S.E.	n	Mittelwert [µg/g TS]	S.E.	n
Versuch 1	5	772.55	380.65	4	192.80		1
	10	424.26	195.85	3	793.61	432.18	4
	24	69.94	22.66	3	811.91	484.54	3
	48	96.68	7.29	3	287.41	39.67	4
Versuch 3					S4		
	5	69.86	52.85	8	135.71	81.16	5
	10	53.81	37.82	8	123.49	56.16	5
	24	84.75	20.97	8	62.25	50.06	7
Versuch 2	48	439.95		2	388.52		2

S.E. : Standardabweichung

unbeh. : unbehandelt

n : Anzahl der Wiederholungen bei 5 Kalli pro Phenylpropanoid-Analyse

TS : Trockensubstanz

### 3.3.7 Einfache Phenole und Verbindungen der Stoffgruppe Spektrum 2

Während die als einfache Phenole zusammengefassten Verbindungen (Kapitel 3.2.3.7 Tabelle 17) in Versuch 1 und 2 sehr homogene Gehalte aufwiesen und keine Induktionsreaktionen nach einer Elicitation mit Hefefiltrat zu erkennen waren, wurden die Verbindungen der Gruppe Spektrum 2 mit steigender Elicitationszeit zunehmend akkumuliert (Abbildung 32 A–D). Die Weinkallussorte „Nero“ (Versuch 4) war im Gehalt der einfachen Phenole im Gegensatz zu den Konzentrationen der Verbindungen „Spektrum 2“ mit dem von „Regent“ vergleichbar.

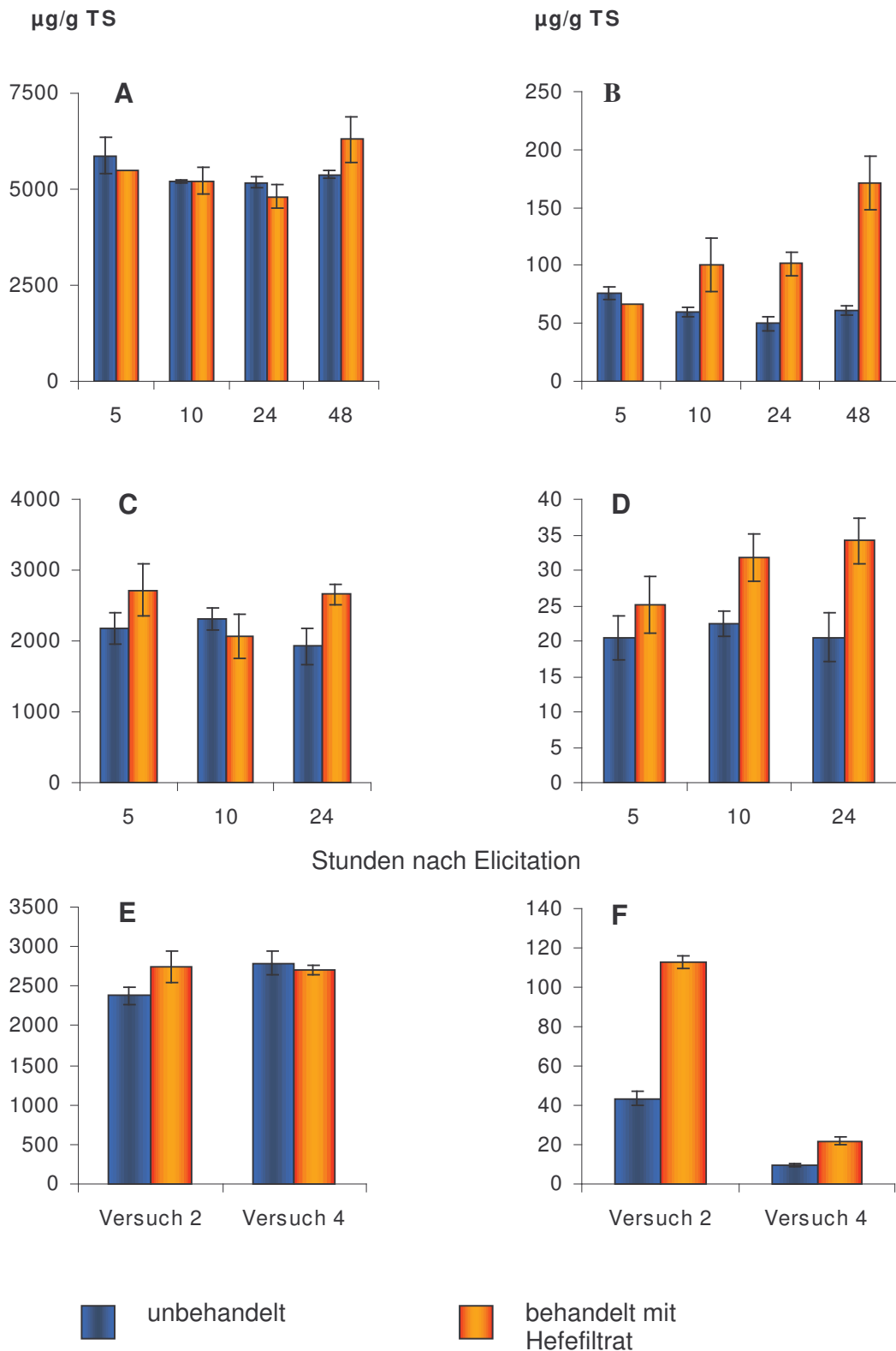


Abbildung 32: linke Spalte einfache Phenole(A,C,E), rechte Spalte (B,D,F) Verbindungen der Stoffgruppe Spektrum 2; **A,B Versuch 1**: unbehandelte und mit Hefefiltrat elicitierte Weinkalli („Regent“); Mittelwerte aus 4 Messwerten  $\pm 0,5 \times$  Standardabweichung **C,D Versuch 3** („Regent“) Mittelwerte aus 8 (unbehandelte Kalli) bzw. 6 (Hefe S4 behandelte) Kalli  $\pm 0,5 \times$  Standardabweichung **E,F: Versuch 2** („Regent“) Mittelwert aus 2 Messwerten und **Versuch 4** („Nero“) Mittelwert aus 6 Messwerten 48 Stunden nach Behandelungen mit Hefefiltrat

### 3.3.8 Benzoessäuren und Hydroxyzimtsäuren

Während der Gehalt der Benzoessäuren, die mengenmäßig von den Gallussäure-Derivat Peak B dominiert werden, in Versuch 1 (Abbildung 33 B) mit zunehmender Kulturdauer kontinuierlich abnahmen und kein Elicitations-Einfluss durch eine Behandlung der Kalli mit Hefefiltrat erkennbar war, induzierte diese Behandlung die Akkumulation der Hydroxyzimtsäuren schon 10 Stunden nach Elicitation. Der Gehalt dieser Verbindungen akkumulierte weiter bis 24 Stunden nach der Behandlung und stagnierte dann mit einer Tendenz der Abnahme. Eine fast identische Dynamik ergab sich auch für das p-Cumarsäure-Derivat (Peak L), welches der Hauptvertreter dieser Stoffgruppe war. Die unbehandelten Kalli wiesen relativ konstante Gehalte auf.

Auch in Versuch 3 war zehn Stunden nach Elicitation eine deutliche Akkumulation der Hydroxyzimtsäure-Derivate festzustellen, die dann stagnierte (Abbildung 33 C). Eine kontinuierliche Abnahme mit zunehmender Kulturdauer an Benzoessäuren der unbehandelten Kalli wie in Versuch 1 konnte hier jedoch nicht festgestellt werden. Es war aber auch in diesem Versuch ersichtlich, dass eine Elicitation keinen Einfluss auf den Gehalt an Benzoessäuren nahm (Abbildung 33 D).

In Versuch 2 war die Zunahme des Gehaltes an Hydroxyzimtsäuren (Abbildung 33 C) bei gleichbleibender Konzentration an Benzoessäuren (Abbildung 33 D) 48 Stunden nach einer Elicitation mit Hefefiltrat gegenüber den unbehandelten Varianten sehr deutlich zu erkennen. Die Gehalte an Hydroxyzimtsäuren und Benzoessäuren in der Weinsorte „Nero“ (Versuch 4) sind um ein vielfaches geringer als bei der Sorte „Regent“. Dennoch konnte auch in diesem Versuch eine deutliche Akkumulation der Hydroxyzimtsäuren 48 Stunden nach einer Elicitation ( $123.23 \mu\text{g/g TS} \pm 14.87 \mu\text{g/g TS}$  ( $0.5 \times$  Standardabweichung)) gegenüber den unbehandelten Kalli ( $75.5 \mu\text{g/g TS} \pm 7.58 \mu\text{g/g TS}$ ) festgestellt werden. Die Konzentrationen der Benzoessäuren waren in beiden Behandlungen nicht signifikant verschieden (unbehandelte Kalli:  $165.87 \mu\text{g/g TS} \pm 28.99 \mu\text{g/g TS}$ ; elicitierte Kalli:  $207.07 \mu\text{g/g TS} \pm 45.48 \mu\text{g/g TS}$ ).

### 3.3.9 Flavonole

Die Flavonole T2 und HH wiesen in Versuch 1 schon bei den unbehandelten Varianten große Schwankungen im Gehalt auf, so dass keine eindeutigen Reaktionen durch Elicitation festzustellen waren (Abbildung 34 und Tabelle 22). Auffällig waren die hohen Gehalte beider Verbindungen zum Entnahmeterrmin 5 Stunden nach der Behandlung im Vergleich zu den anderen Entnahmeterrminen. Ab 10 Stunden nach einer Hefefiltratbehandlung zeigte sich eine latente Gehaltsstimulation beider Flavonole gegenüber der unbehandelten Variante.

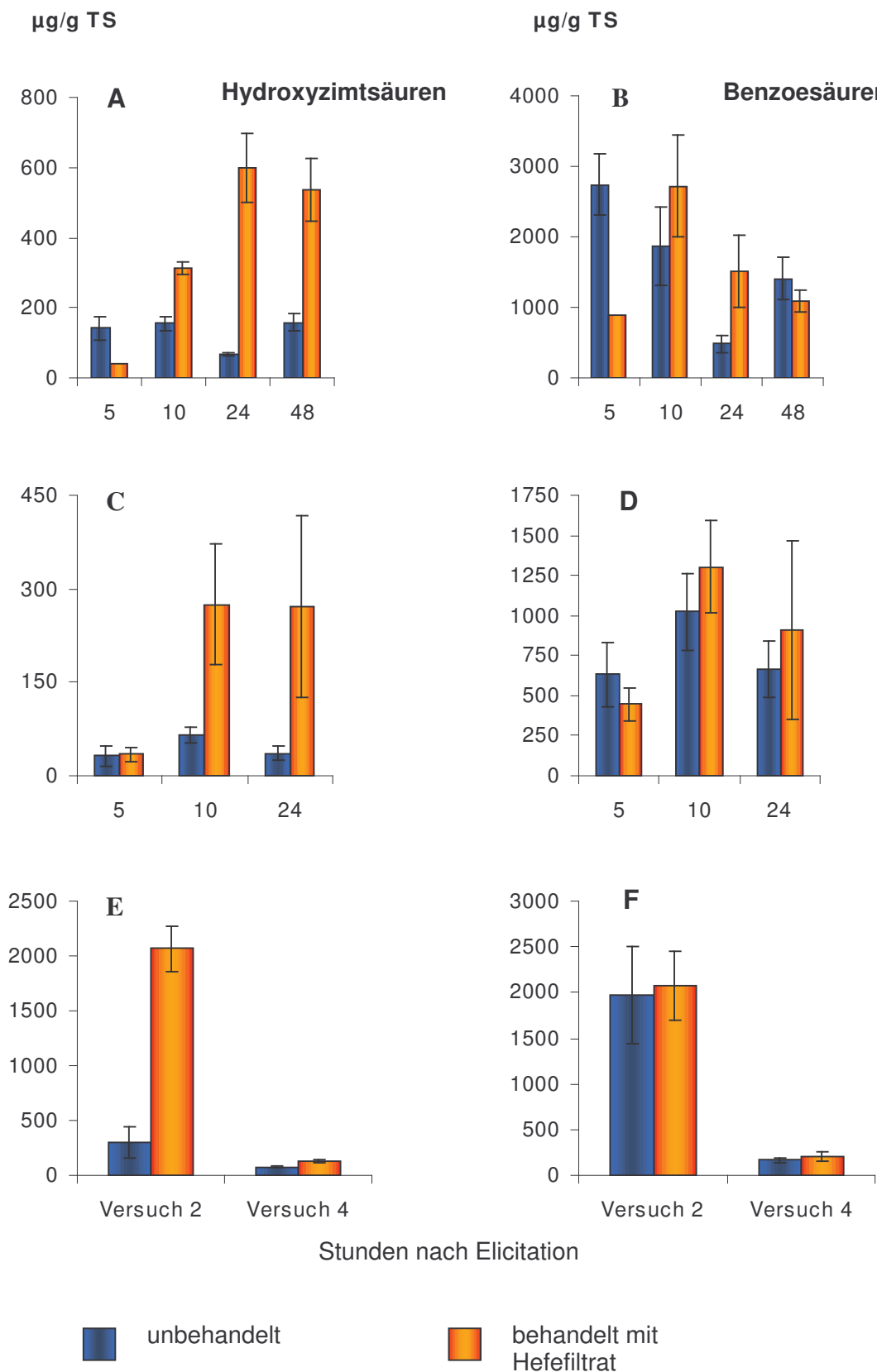


Abbildung 33: linke Spalte Hydroxycimtsäuren (A,C,E), rechte Spalte (B,D,E) Benzoessäuren **A,B Versuch 1:** unbehandelte und mit Hefefiltrat elicitierte Weinkalli („Regent“); Mittelwerte aus 4 Messwerten  $\pm 0,5 \times$  Standardabweichung **C,D Versuch 3** („Regent“) Mittelwerte aus 8 (unbehandelte Kalli) bzw. 6 (Hefe S4 behandelte) Kalli  $\pm 0,5 \times$  Standardabweichung **E,F: Versuch 2** („Regent“) Mittelwert aus 2 Messwerten und **Versuch 4** („Nero“) Mittelwert aus 6 Messwerten 48 Stunden nach Behandelungen mit Hefefiltrat

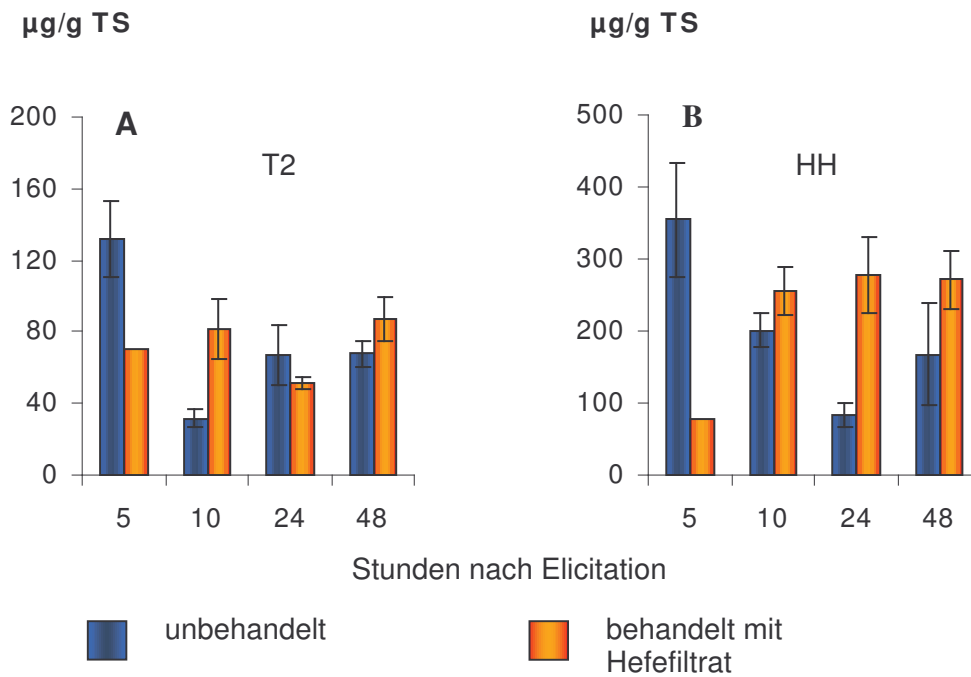


Abbildung 34: Flavonole von unbehandelten im Vergleich zu mit Hefefiltrat elicierten Weinkalli („Regent“) aus **Versuch 1**; Mittelwerte aus 4 Messwerten  $\pm 0,5 \times$  Standardabweichung

In Versuch 3 war der konstitutive Gehalt von T2 relativ konstant über die Entnahmetermine und die Akkumulation ab 10 Stunden nach der Elicitation deutlicher zu erkennen als in Versuch 1 (Abbildung 35 und Tabelle 22 ). In Versuch 2 zeigte sich innerhalb von 48 Stunden eine deutliche Stimulation des Flavonol Peak T2, bei unverändertem Gehalt von Peak HH. Die Flavonole in der Weinsorte „Nero“ erfuhren ebenfalls eine leichte Induktion durch Elicitation innerhalb von 48 Stunden. Allgemein waren die beiden Flavonole vergleichsweise starken Schwankungen ausgesetzt.

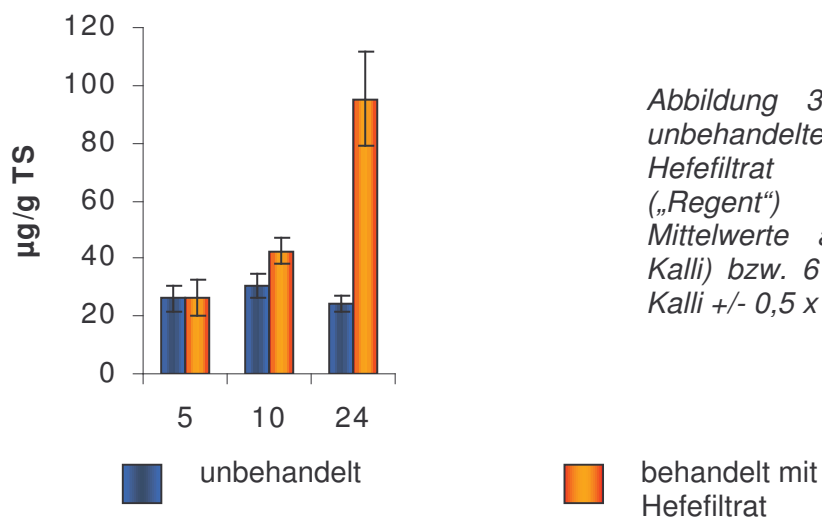


Abbildung 35: Flavonol T2 von unbehandelten im Vergleich zu mit Hefefiltrat elicierten Weinkalli („Regent“) aus **Versuch 3**: Mittelwerte aus 8 (unbehandelte Kalli) bzw. 6 (Hefe S4 behandelte Kalli)  $\pm 0,5 \times$  Stabw.

Tabelle 21: Flavonole von unbehandelten und mit Hefefiltrat elicitierten Weinkalli der Sorte „Regent“ (Versuch 1-3) und „Nero“ (Versuch 4)

	Stunden nach Elicitation	unbehandelte Kalli			elicitierte Kalli		
		Mittelwert [µg/g TS]	S.E.	n	Mittelwert [µg/g TS]	S.E.	n
<b>Versuch 1</b>							
T2	5	132.07	21.07	4	70.40		1
	10	31.58	4.77	3	81.61	16.38	4
	24	66.98	17.11	3	51.62	3.38	3
	48	67.61	7.43	3	87.35	12.59	4
HH	5	354.89	78.50	4	77.08		1
	10	200.53	23.83	3	255.65	32.94	4
	24	83.08	16.81	3	277.55	53.51	3
	48	167.02	70.97	3	270.94	41.21	4
<b>Versuch 3</b>					<b>Hefe- S4</b>		
T2	5	26.11	4.38	8	26.34	5.99	5
	10	30.50	4.47	8	42.65	4.21	5
	24	24.52	2.83	8	95.37	16.16	7
<b>Versuch 2</b>							
T2	48	295.52	141.49	2	2066.53	210.46	2
HH	48	1974.06	526.57		2067.82	375.80	
<b>Versuch 4</b>							
T2	48	75.50	7.58		123.23	14.87	
HH	48	165.87	28.99	2	207.01	45.48	2

S.E. : Standardabweichung

unbeh. : unbehandelt

n : Anzahl der Wiederholungen bei 5 Kalli pro Phenylpropanoid-Analyse

TS : Trockensubstanz

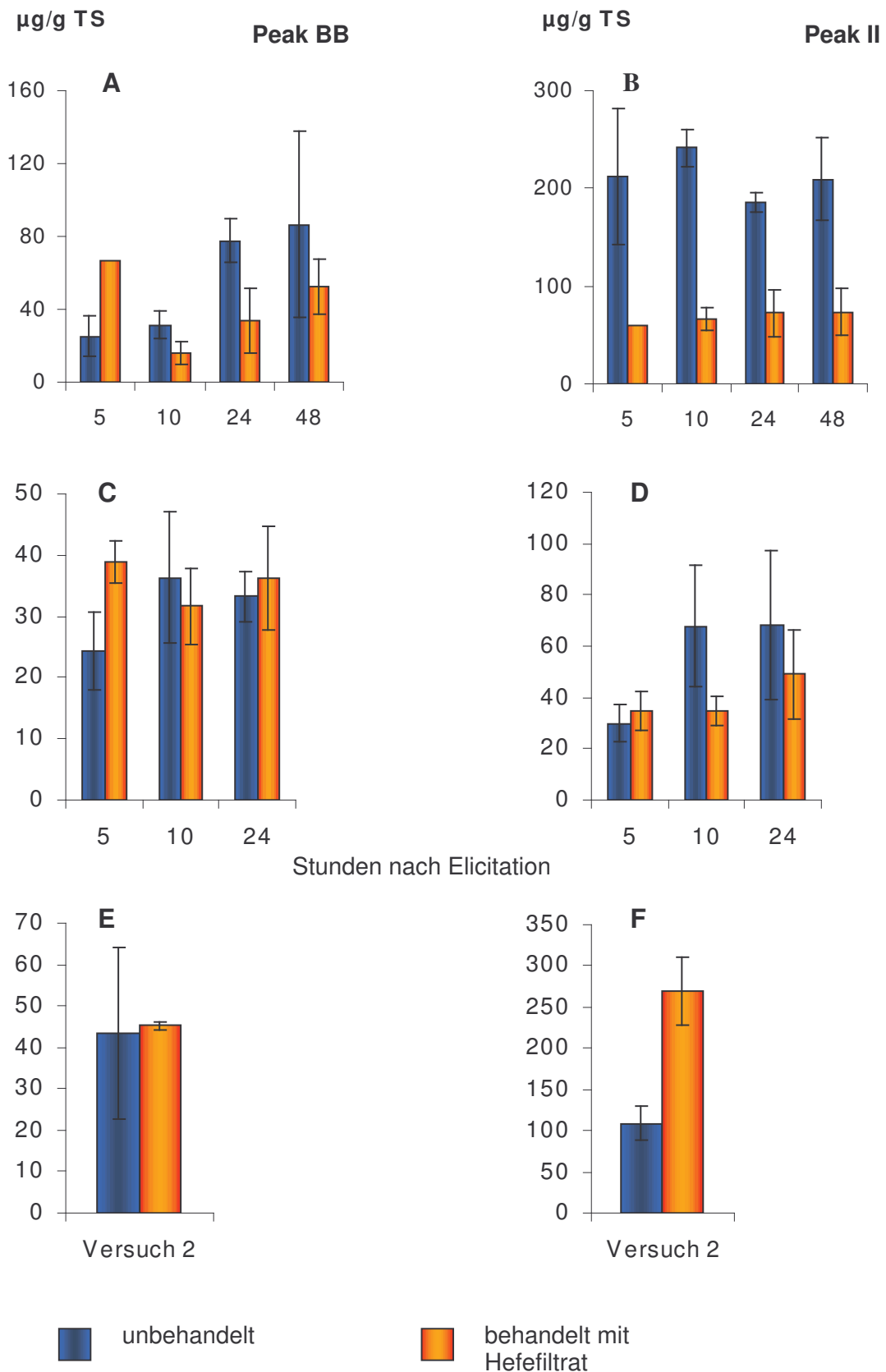


Abbildung 36: linke Spalte Anthocyan BB (A,C,E), rechte Spalte (B,D,E) Anthocyan II; **A,B Versuch 1:** unbehandelte und mit Hefefiltrat elicitierte Weinkalli („Regent“); Mittelwerte aus 4 Messwerten  $\pm 0,5 \times SE$  **C,D Versuch 3** („Regent“) Mittelwerte aus 8 (unbehandelte Kalli) bzw. 6 (Hefe S4 behandelte) Kalli  $\pm 0,5 \times SE$  **E,F: Versuch 2** („Regent“) Mittelwert aus 2 Messwerten 48 Stunden nach Behandelungen mit Hefefiltrat



### 3.3.10 Anthocyane

Der Gehalt von Anthocyanidin BB nahm in Versuch 1 mit fortschreitender Kulturdauer sowohl bei den unbehandelten als auch bei den mit Hefefiltrat elicierten Weinkalli gleichmäßig zu, wobei ab 10 Stunden nach der Behandlung ein Gehaltsrückgang durch die Elicitation gegenüber den unbehandelten Varianten zu beobachten war (Abbildung 36 A). In den Versuchen 3 und 2 konnte weder eine Auswirkung der Kulturdauer noch ein Elicitationseffekt auf den Gehalt von Verbindung BB beobachtet werden (Abbildung 36 C, E). In Versuch 3 könnte eine Überlagerung des Anthocyanidins mit dem Kaffeesäure-Derivat AA zu diesen Abweichungen geführt haben. Das Anthocyanidin II wies in Versuch 1 konstante Gehalte in den unbehandelten Varianten auf. Schon 5 Stunden nach der Elicitation mit Hefefiltrat verminderte sich der Gehalt deutlich und verblieb auf diesem Niveau (Abbildung 37 B). In Versuch 3 (Abbildung 36 D) ist diese Gehaltsreduktion zwar erkennbar, aber nicht so deutlich wie in Versuch 1. Hier schienen nicht die mit Hefe elicierten Varianten im Gehalt reduziert zu werden, sondern die mit einer Kontrollbehandlung (K2 + 5g/Liter Glucose) versehenen Kalli in ihrem Gehalt induzierten, was an der Konzentrationssteigerung zwischen 5 und 10 Stunden nach der Behandlung deutlich wurde (Abbildung 36 D). Eine 48 stündige Elicitation mit Hefefiltrat führte in Versuch 2 hingegen zu einer Akkumulation des Anthocyanidins II (Abbildung 36 F). Im Weinkallus der Sorte „Nero“ wurden im Versuch 4 keine Anthocyane festgestellt.

### 3.3.11 Resveratrol-Derivate

#### 3.3.11.1 monomere Resveratrol-Derivate

Die am stärksten auf eine Behandlung mit Hefefiltrat reagierende Stoffgruppe waren die Resveratrol-Derivate. Hier wurden monomere cis- und trans- Resveratrol-Derivate und deren Oligomere sowie das Aglykon selbst quantifiziert.

Trans-Resveratrol kam in allen Versuchen konstitutiv nur in sehr geringen Mengen vor (Abbildung 37 A,B,C) und wurde durch eine Behandlung mit Hefefiltrat auch nur in der trans-Konfiguration induziert. Die Akkumulation von trans-Resveratrol ist eine sehr schnelle Reaktion und konnte sowohl in Versuch 1 als auch in Versuch 3 schon zehn Stunden nach der Elicitation deutlich beobachtet werden. Der Gehalt von trans-Resveratrol erreichte nach 24 Stunden sein Maximum und nahm dann wieder ab. (Abbildung 37 A).

Versuch 2 zeigte 48 Stunden nach einer Elicitation (Abbildung 37 C) eine deutliche Akkumulation von trans-Resveratrol. Die Akkumulationsrate der Weinkallussorte „Nero“ (Versuch 4) lag 48 Stunden nach einer Hefefiltrat-Behandlung zwar deutlich niedriger als bei „Regent“, war aber signifikant. Piceid ist das Resveratrol-Glucosid, das den höchsten konstitutiven Gehalt im Weinkallus „Regent“ sowie auch „Nero“ aufwies und nur geringen Konzentrationsschwankungen unterlag.

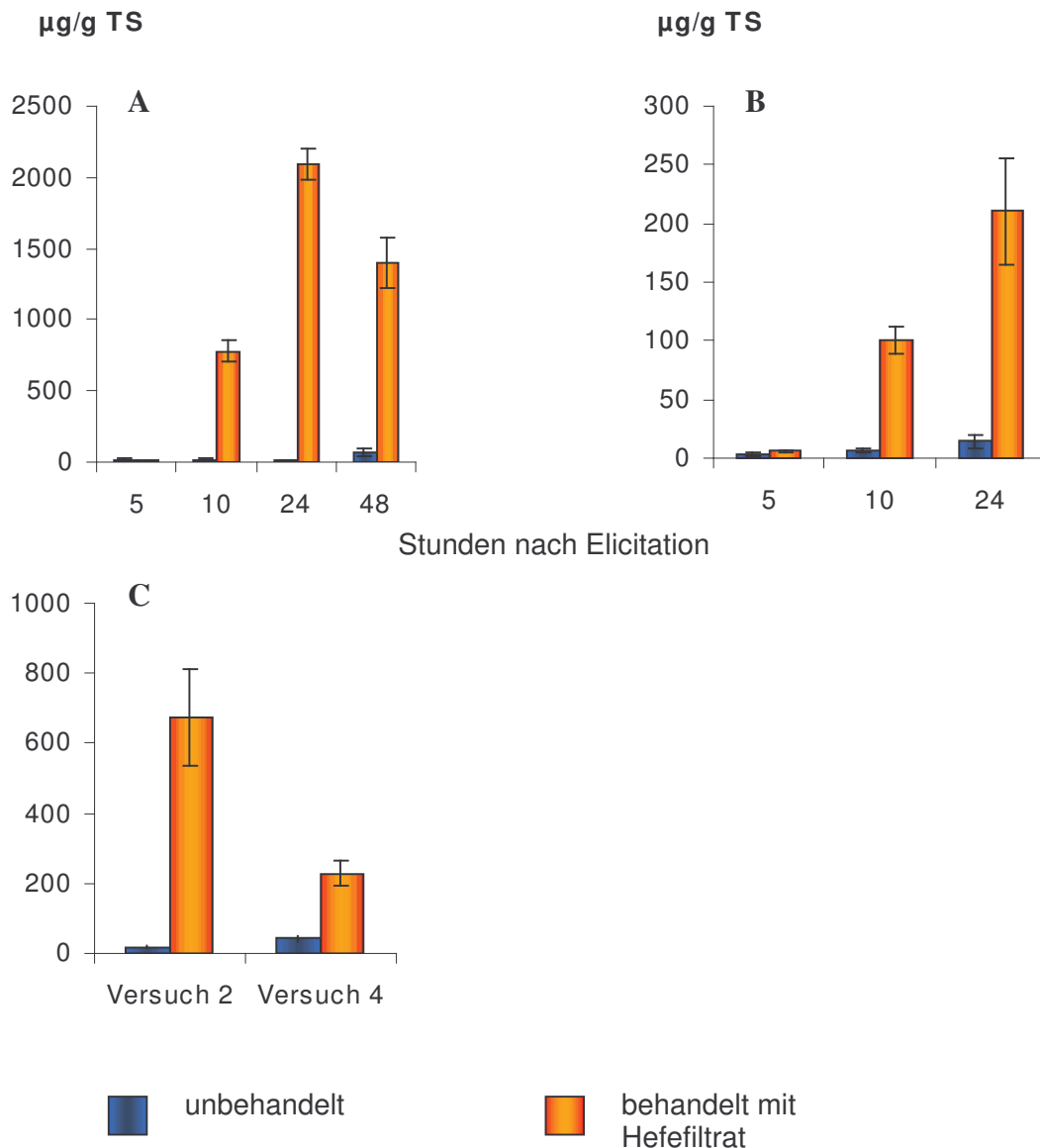


Abbildung 37: *trans*-Resveratrol-Gehalte von unbehandelten verglichen mit elicierten Weinkalli. **A: Versuch 1** („Regent“) Mittelwerte aus 4 Messwerten  $\pm 0,5 \times SE$  **B: Versuch 3** („Regent“) Mittelwerte aus 8 (unbehandelte Kalli) bzw. 6 (Hefe S4 behandelte) Kalli  $\pm 0,5 \times SE$  **C: Versuch 2** („Regent“) Mittelwert aus 2 Messwerten und **Versuch 4** („Nero“) Mittelwert aus 6 Messwerten beide 48 Stunden nach Behandlung mit Hefefiltrat

Beide Isomere zeigten im 1. Versuch 48 Stunden nach einer Behandlung mit Hefefiltrat die höchste Akkumulation, wobei die *cis*-Variante zeitlich verzögert akkumuliert wurde (Abbildung 38 A, B). Auch in Versuch 3 konnte eine Piceid-Akkumulation festgestellt werden, die allerdings erst 24 Stunden nach Elicitation deutlich zu erkennen war. Auch hier lag die Akkumulationsrate von *trans*-Piceid höher als die von *cis*-Piceid. Das Induktionsverhalten variierte zwischen den einzelnen Versuchen sehr (Tabelle 23). Obwohl der konstitutive Gehalt an *trans*-Piceid in Versuch 1 um ein vielfaches höher lag als in Versuch 3, konnten 24 Stunden nach einer Elicitation vergleichbare Akkumulationsraten festgestellt werden.

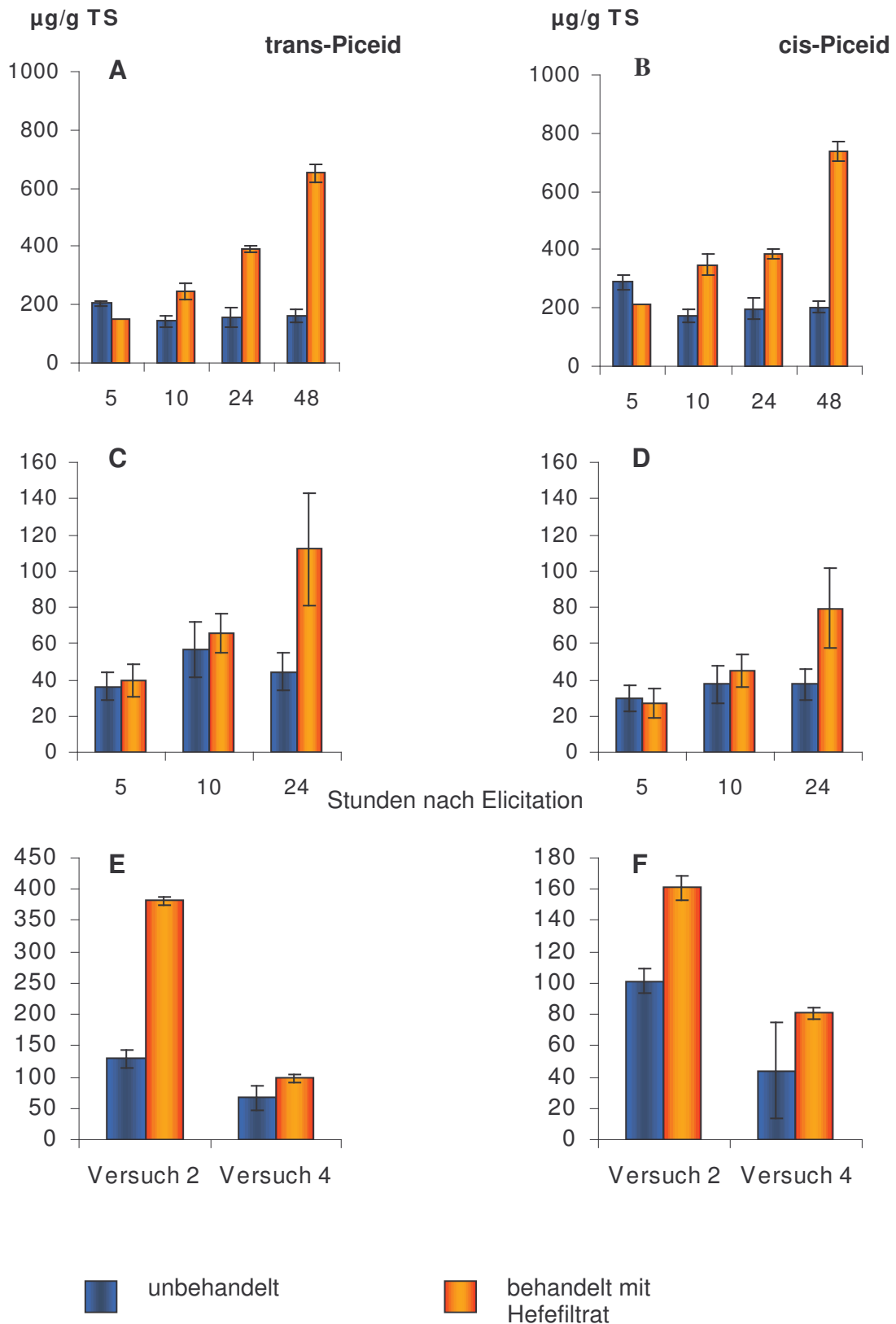


Abbildung 38: linke Spalte trans-Piceid (A,C,E), rechte Spalte (B,D,E) cis-Piceid **A, B: Versuch 1:** unbehandelte und mit Hefefiltrat elicitierte Weinkalli („Regent“); Mittelwerte aus 4 Messwerten  $\pm 0,5 \times$  Standardabweichung **C, D: Versuch 3** („Regent“) Mittelwerte aus 8 (unbehandelte Kalli) bzw. 6 (Hefe S4 behandelte) Kalli  $\pm 0,5 \times$  Standardabweichung **E, F: Versuch 2** („Regent“) Mittelwert aus 2 Messwerten und Versuch 4 („Nero“) Mittelwert aus 6 Messwerten 48 Stunden nach Behandelungen mit Hefefiltrat

Auch die Konzentration von cis-Piceid lag in Versuch 1 deutlich über dem von Versuch 3, die Induktionsrate nach 24 Stunden Elicitation war in Versuch 3 jedoch höher als in Versuch 1. In Versuch 2 war 48 Stunden nach Elicitation ebenfalls eine Akkumulation beider Verbindungen zu erkennen (Abbildung 38 E,F). Das Verhältnis der Induktionsraten beider Isomere in Versuch 2 war nach 48 Stunden Elicitation mit dem von Versuch 1 nach 24 Stunden vergleichbar.

Die Induktion von Piceid war im Weinkallussorte „Nero“ wesentlich geringer als in „Regent“. Nach Tabelle 23 war die Induktionsrate von cis-Piceid höher als die von trans-Piceid, was im Gegensatz zu dem Akkumulationsverhalten von „Regent“ stehen würde, aber die Streuung der Gehalte von cis-Piceid der unbehandelten Kalli verfälschte die Induktionsrate dieser Verbindung (Abbildung 38 F).

*Tabelle 22: Trans- und cis-Piceid-Induktion von unbehandelten und mit Hefefiltrat elicierten Weinkalli der Sorten „Regent“ (Versuch 1-3) und „Nero“ (Versuch 4) und das Verhältnis der Induktionsraten beider Isomere*

	<b>Versuch</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
	Stunden nach Elicitation	24	<b>48</b>	<b>48</b>	<b>24</b>	<b>48</b>
<b>trans-Piceid</b>	Gehalt unbehandelter Kalli (Mittelwert über alle Termine)	166.72	166.72	129.07	45.79	66.88
	Maximalgehalt nach Elicitation	390.86	652.02	382.03	111.91	97.94
	<b>% Induktion trans-Piceid</b>	<b>134</b>	<b>291</b>	<b>196</b>	<b>144</b>	<b>46</b>
<b>cis-Piceid</b>	Gehalt unbehandelte Kalli (Mittelwert über alle Termine)	215.53	215.53	101.41	34.95	44.10
	Maximalgehalt nach Elicitation	386.62	736.03	160.92	79.43	80.72
	<b>% Induktion cis-Piceid</b>	<b>79</b>	<b>241</b>	<b>59</b>	<b>127</b>	<b>83</b>
	<b>Verhältnis von cis : trans-Piceid</b>	<b>0.59</b>	<b>0.83</b>	<b>0.58</b>	<b>0.88</b>	<b>1.79</b>

Auch das trans-Resveratrol-Derivat Peak T und das wahrscheinlich entsprechende cis-Isomer Peak Y kamen konstitutiv in den Kalli vor, jedoch war der Gehalt in unbehandelten Kalli nur halb so hoch wie der von Piceid. In Versuch 1 zeigten beide Verbindungen bis 24 Stunden nach Elicitation mit Hefefiltrat einen mit der unbehandelten Variante vergleichbaren Gehalt (Abbildung 39). Nach 48-stündiger Elicitation akkumulierten beide Substanzen so, dass der Gehalt von Peak T um 137 und der von Peak Y um 161% zunahm. Die übereinstimmende Dynamik und die vergleichbaren Induktionsraten ließen, neben den

nicht weit auseinander liegenden Retentionszeiten dieser beiden Verbindungen, eine Isomerie vermuten.

Die Verbindungen X und Z0 kamen in unbehandelten Kalli nur in geringen Konzentrationen vor. Zehn Stunden nach einer Elicitation mit Hefefiltrat wurde eine Akkumulation dieser Verbindungen induziert, die sich dann bis 48 Stunden nach Behandlung weiter steigerte. Auch bei diesen beiden Verbindungen konnte man aufgrund der übereinstimmenden Dynamik auf eine Isomerie schließen.

Das Konzentrations-Verhältnis beider Isomerenpaare beträgt für die cis-Isomere rund  $\frac{1}{4}$  des Gehaltes der trans-Isomere

(T = 270  $\mu\text{g/g}$  TS; Y = 68  $\mu\text{g/g}$  TS), (X = 223  $\mu\text{g/g}$  TS; Z0 = 61  $\mu\text{g/g}$  TS).

Das monomere trans-Resveratrol-Derivat Peak J zeigte zwar auch eine kontinuierliche Steigerung des Gehaltes mit zunehmender Elicitationsdauer, wurde aber aufgrund seines geringen Gehaltes als nicht so bedeutend eingeschätzt. Die Verbindung Z2 zeigte keine eindeutigen Reaktionen auf eine Elicitation.

### 3.3.11.2 Pallidol-Derivate

Eine Stoffgruppe, die den Pallidol-Derivaten zugeordnet wurde, umfasste die sechs Verbindungen O, P, Q, R, DD und DD1, wobei DD und DD1 in manchen Versuchen zu einer Verbindung zusammengefasst wurden. Die Verbindungen Q und R wiesen sehr kleine Gehalte auf und zeigten kein eindeutiges Induktionsverhalten. Die anderen vier Verbindungen (Abbildung 41) und somit auch die Stoffgruppe (Abbildung 40) reagierten bei zunehmender Elicitationszeit mit einer kontinuierlichen Akkumulation. Diese Induktionsdynamik der Pallidol-Derivate wurde sowohl in Versuch 1 (Abbildung 40 A) als auch in Versuch 3 (Abbildung 40 B) beobachtet. Genauso konnte im 2. Versuch 48 Stunden nach Elicitation eine deutliche Akkumulation dieser Stoffgruppe beobachtet werden (Abbildung 40 C). Die Verbindungen P, DD und DD1 kamen in den Versuchen 1, 2 und 3 nicht konstitutiv vor, die Verbindungen O, Q und R wiesen konstitutive Gehalte auf (Abbildung 42).

Im Weinkallus der Sorte „Nero“ (Tabelle 25 Versuch 4) schien die Verbindung DD schon konstitutiv vorzukommen zu sein und durch eine Elicitation geringfügig zu akkumulieren. In diesem Versuch erfuhr nur das Pallidol-Derivat Peak O eine deutliche Induktion. In der Summe der vorhandenen Pallidol-Derivate konnte jedoch keine so deutliche Induzierbarkeit wie bei der Kallussorte „Regent“ festgestellt werden.

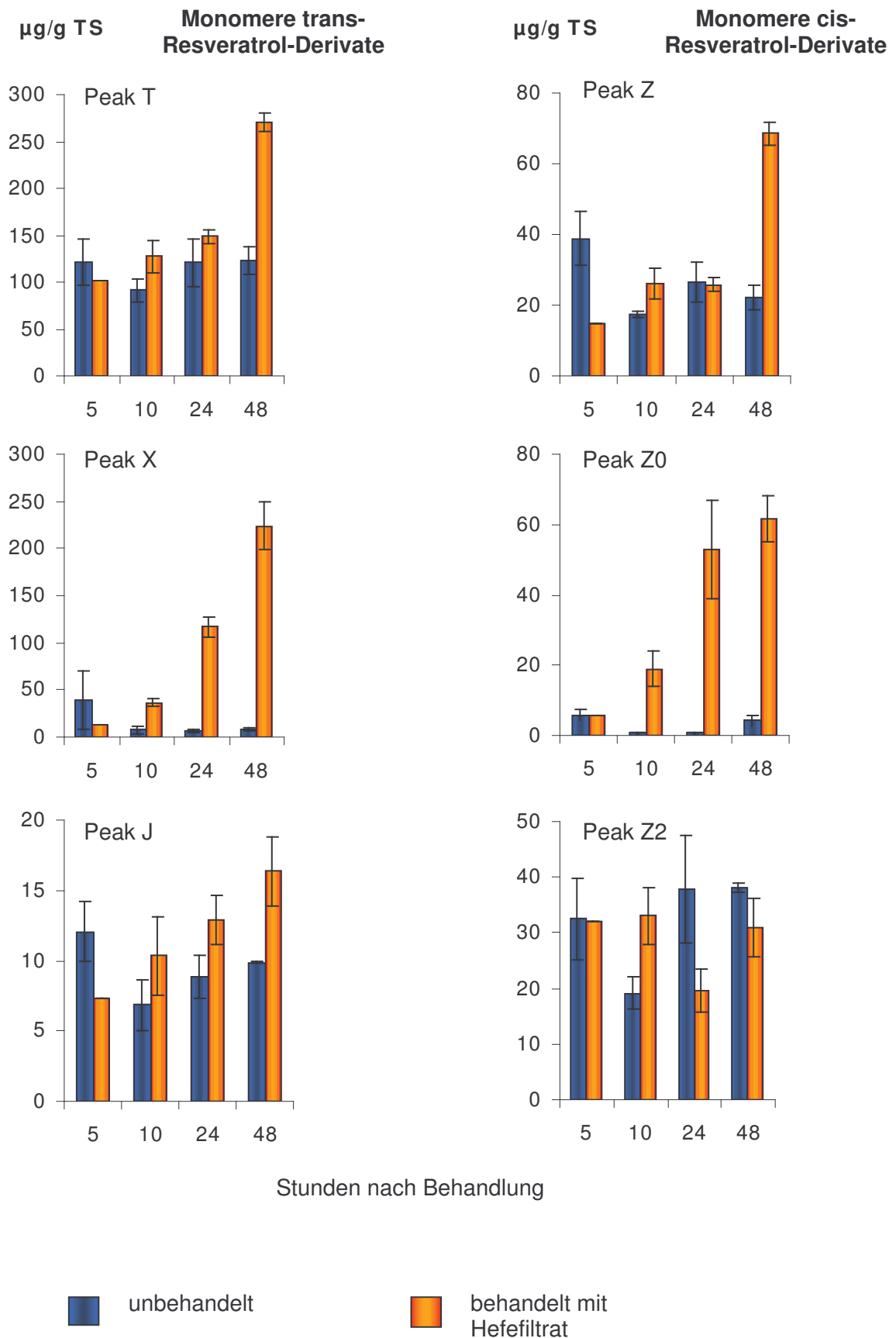


Abbildung 39: Monomere Resveratrol-Derivate (links: trans-Derivate; rechts: cis-Derivate) von unbehandelten im Vergleich zu mit Hefefiltrat elicitierten Weinkalli („Regent“) aus **Versuch 1**; Mittelwerte aus 4 Messwerten  $\pm 0,5 \times$  Standardabweichung.

Tabelle 23: Monomere trans- und cis-Resveratrol-Derivate von unbehandelten und mit Hefefiltrat elicitierten Weinkalli der Sorte „Regent“ (Versuch 2 und 3) und „Nero“ (Versuch 4); unbeh.: unbehandelt, n: Anzahl der Wiederholungen bei 5 Kalli pro Phenylpropanoid-Analyse, TS: Trockensubstanz

Peak	Stunden nach Elicitation	unbehandelte Kalli			elicitierte Kalli		
		Mittelwert [µg/g TS]	S.E.	n	Mittelwert [µg/g TS]	S.E.	n
<b>Versuch 3</b>							
T (trans)	5	23.29	4.43	8	31.73	7.78	5
	10	29.43	3.51	8	33.48	3.28	5
	24	19.73	3.64	8	43.07	8.04	7
X (trans)	5	2.02	0.88	8	5.86	2.46	5
	10	4.21	1.77	8	15.41	2.15	5
	24	4.36	1.73	8	38.79	4.05	7
J (trans)	5	3.83	1.13	8	4.69	1.13	5
	10	4.31	0.72	8	5.35	1.20	5
	24	4.34	0.62	8	5.35	1.56	7
Y (cis)	5	5.82	1.33	8	8.32	2.94	5
	10	6.52	1.87	8	7.65	1.69	5
	24	5.49	0.80	8	12.30	2.60	7
Z0 (cis)	5	1.85	0.36	8	2.62	0.70	5
	10	3.15	0.65	8	26.52	2.71	5
	24	2.23	0.70	8	41.54	10.15	7
Z2 (cis)	5	2.54	0.37	8	4.10	1.19	5
	10	2.74	0.65	8	4.44	0.60	5
	24	2.42	0.30	8	7.38	2.47	7
<b>Versuch 2</b>							
T (trans)	48	49.27	6.45	2	79.11	2.63	2
X (trans)	48	18.75	2.32	2	134.23	11.11	2
J (trans)	48	11.84	2.82	2	28.13	1.12	2
Y (trans)	48	3.93	0.56	2	8.54	0.63	2
Z0 (cis)	48	2.41	0.85	2	26.58	0.73	2
Z2 (cis)	48						
<b>Versuch 4</b>							
T (trans)	48	25.27	1.99	6	34.84	1.96	6
X (trans)	48	10.40	3.09	6	34.86	2.55	6
J (trans)	48	3.96	0.67	6	5.25	1.00	6
Y (trans)	48	19.85	2.42	6	24.28	4.34	6
Z0 (cis)	48	4.39	0.91	6	5.26	0.76	6
Z2 (cis)	48	5.57	0.97	6	9.24	1.95	6

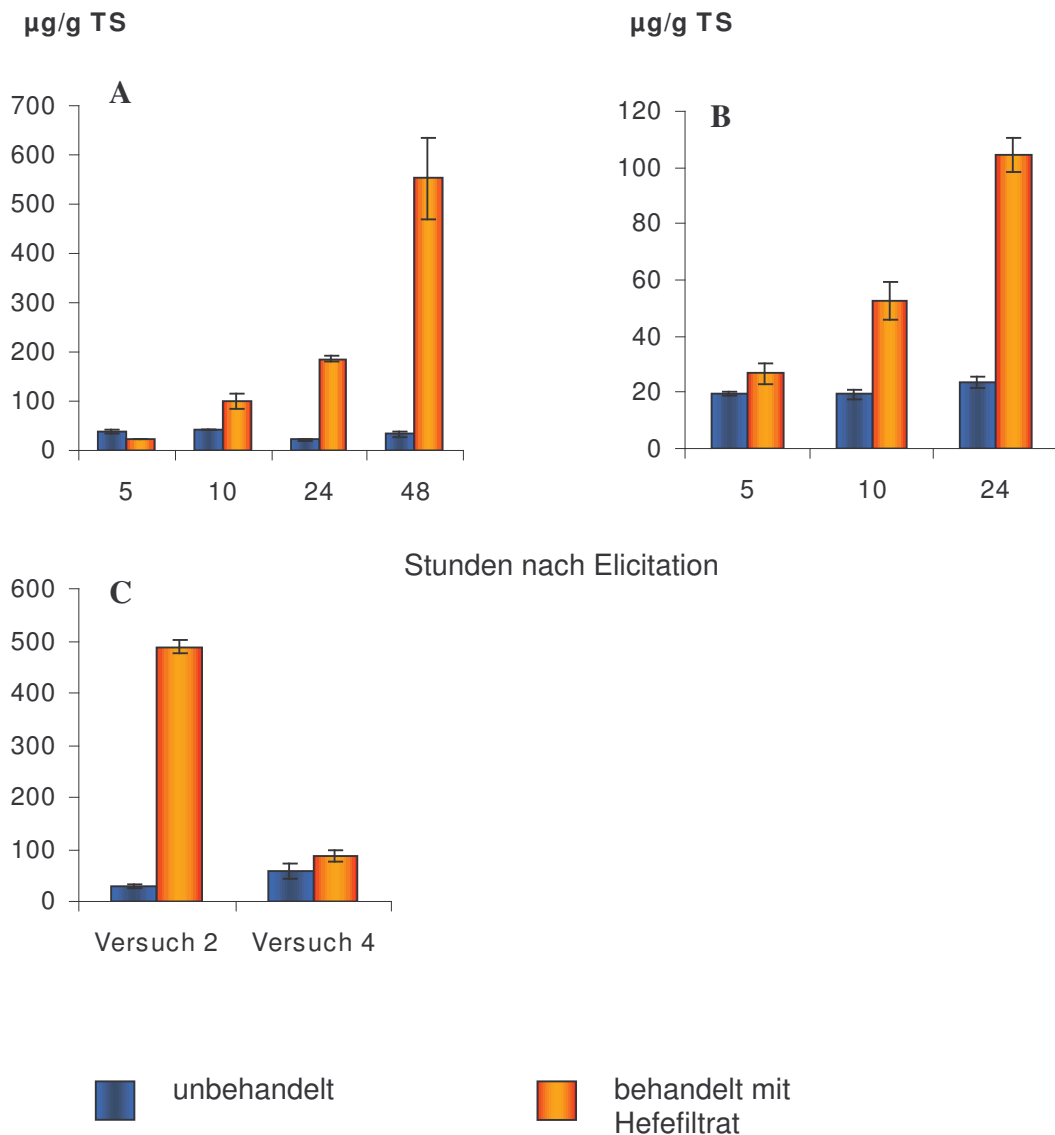


Abbildung 40: Summe der Pallidol-Derivate von unbehandelten im Vergleich zu mit Hefefiltrat elicitierten Weinkalli. **A: Versuch 1** („Regent“) Mittelwerte aus 4 Messwerten  $\pm 0,5 \times$  Standardabweichung **B: Versuch 3** („Regent“) Mittelwerte aus 8 (unbehandelte Kalli) bzw. 6 (Hefe S4 behandelte) Kalli  $\pm 0,5 \times$  Standardabweichung **C: Versuch 2** („Regent“) Mittelwert aus 2 Messwerten und **Versuch 4** („Nero“) Mittelwert aus 6 Messwerten beide 48 Stunden nach Behandlung mit Hefefiltrat



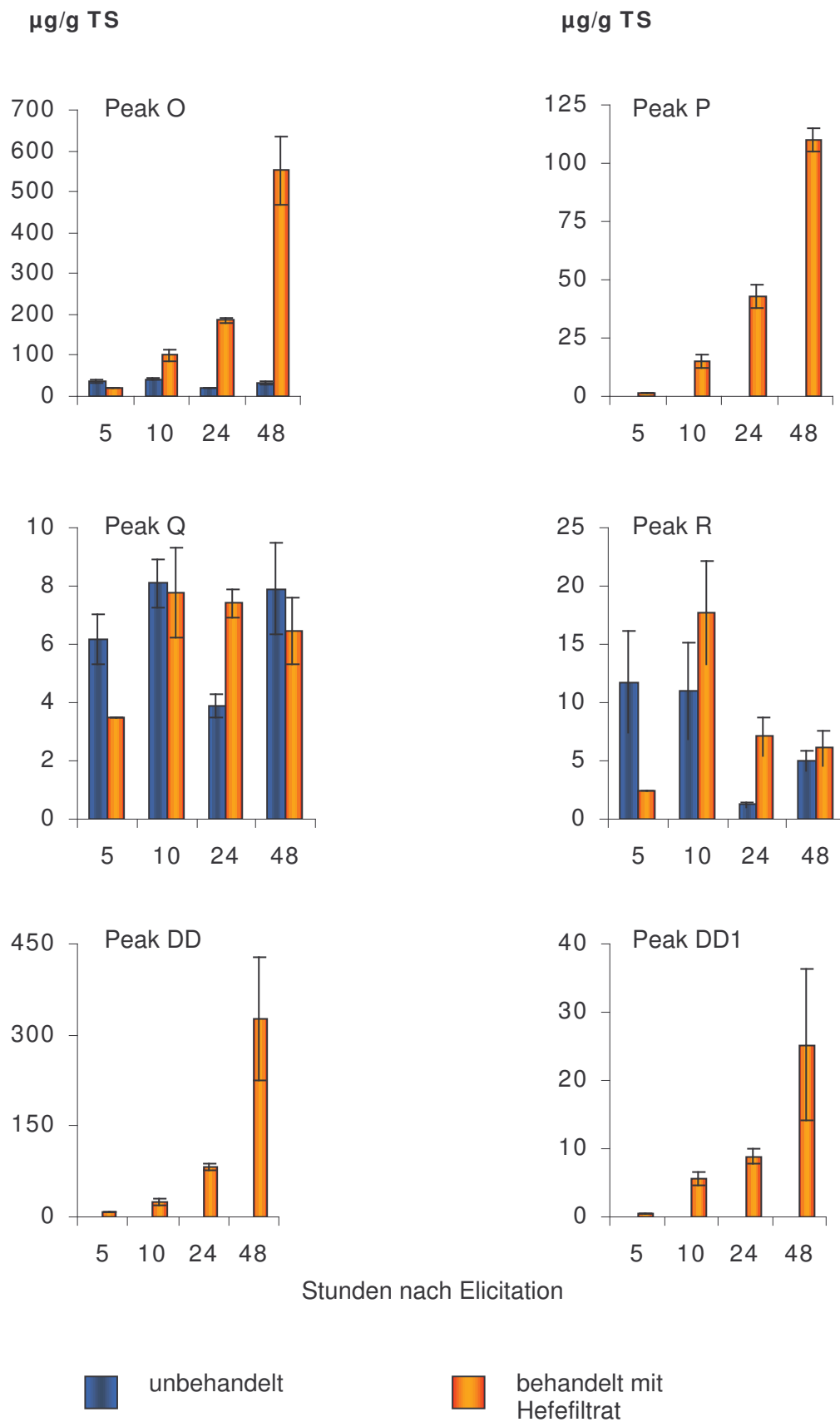


Abbildung 41: Pallidol-Derivate von unbehandelten im Vergleich zu mit Hefefiltrat elicitierten Weinkalli („Regent“) aus **Versuch 1**; Mittelwerte aus 4 Messwerten  $\pm 0,5 \times$  Standardabweichung.

Tabelle 24: Pallidol-Derivate von unbehandelten und mit Hefefiltrat elicitierten Weinkalli der Sorte „Regent“ (Versuch 2 und 3) und „Nero“ (Versuch 4)

Peak	Stunden nach Elicitation	unbehandelte Kalli			elicitierte Kalli		
		Mittelwert [µg/g TS]	S.E.	n	Mittelwert [µg/g TS]	S.E.	n
<b>Versuch 3</b>							
O+O1	5	11.24	1.19	8	10.97	1.63	5
	10	11.31	0.97	8	14.02	1.52	5
	24	12.46	3.48	8	26.06	3.26	7
P	5			8	2.77	1.12	5
	10			8	13.67	2.44	5
	24			8	21.12	4.18	7
Q	5	3.39	0.69	8	3.28	0.46	5
	10	3.74	0.61	8	2.99	0.49	5
	24	2.84	0.49	8	1.91	0.40	7
R	5	8.82	0.92	8	8.91	1.49	5
	10	9.16	1.44	8	10.58	2.76	5
	24	12.10	1.12	8	8.52	1.69	7
DD	5			8	0.74	0.29	5
	10			8	11.29	1.22	5
	24			8	46.80	4.50	7
<b>Versuch 2</b>							
O	48	15.09	0.08	2	47.26	0.23	2
P	48			2	77.68		2
Q	48	4.56	3.16	2	8.40	1.75	2
DD	48			2	355.11	10.21	2
<b>Versuch 4</b>							
O	48	2.39	0.44	6	14.11	2.91	6
P	48			6			6
Q	48			6			6
DD	48	50.04	14.03	6	68.65	12.53	6

S.E. : Standardabweichung

unbeh. : unbehandelt

n : Anzahl der Wiederholungen bei 5 Kalli pro Phenylpropanoid-Analyse

TS : Trockensubstanz

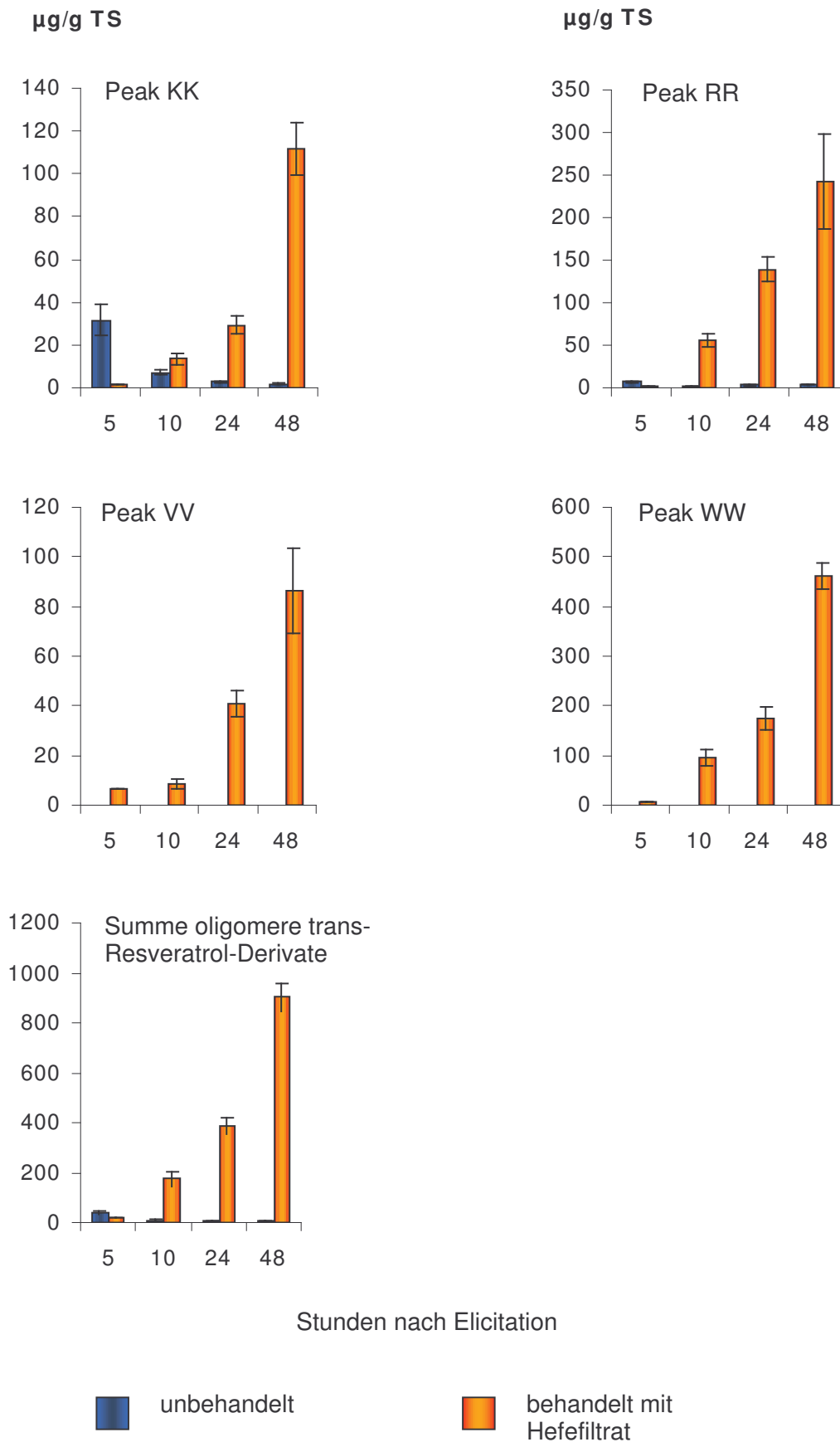


Abbildung 42: oligomere-trans-Resveratrol-Derivate von unbehandelten im Vergleich zu mit Hefefiltrat elicitierten Weinkalli („Regent“) aus **Versuch 1**; Mittelwerte aus 4 Messwerten  $\pm$  0,5 x Standardabweichung.

Tabelle 25: Oligomere trans-Resveratrole von unbehandelten und mit Hefefiltrat elicierten Weinkalli der Sorte „Regent“ (Versuch 3)

Peak	Stunden nach Elicitation	unbehandelte Kalli			elicitierte Kalli		
		Mittelwert [µg/g TS]	S.E.	n	Mittelwert [µg/g TS]	S.E.	n
<b>Versuch 3</b>							
KK	5	1.82	0.94	8	3.64	2.77	5
	10	4.55	1.27	8	8.18	0.83	5
	24	1.72	1.13	8	21.73	1.38	7
RR	5			8			5
	10			8	46.33	9.15	5
	24			8	153.29	23.16	7
VV	5			8	7.09	2.92	5
	10			8	19.51	1.89	5
	24			8	52.98	6.16	7
WW	5	14.39	3.47	8	36.53	13.30	5
	10	13.40	3.43	8	72.01	3.12	5
	24	19.06	5.59	8	188.70	22.58	7
Gesamt	5	16.21	2.99	8	47.26	17.39	5
	10	17.95	3.81	8	146.03	11.24	5
	24	20.78	6.22	8	416.69	46.66	7
<b>Versuch 2</b>							
KK	48			2			2
RR	48	5.74	3.48	2	454.03	37.87	2
VV	48			2			2
WW	48	13.75	1.12	2	748.90	44.48	2
Summe	48	19.49	4.60		1202.93	6.61	
<b>Versuch 4</b>							
KK	48			6	11.88	2.01	6
RR	48	17.14	3.61	6	217.16	25.90	6
VV	48			6			6
WW	48	9.57	1.17	6	199.82	35.38	6
Summe	48	26.71	2.64		428.86	62.43	

S.E. : Standardabweichung

unbeh. : unbehandelt

n : Anzahl der Wiederholungen bei 5 Kalli pro Phenylpropanoid-Analyse

TS : Trockensubstanz

### 3.3.11.3 Oligomere Resveratrol-Derivate

Bei den oligomeren trans-Resveratrol-Derivaten (KK, RR, VV, WW) war eine mit der Elicitationszeit zunehmende Akkumulation der Verbindungen und somit auch der ganzen Stoffgruppe festzustellen (siehe Abbildung 42). Die Verbindung KK kam sowohl in Versuch 1 (Abbildung 42) als auch in Versuch 3 (Tabelle 26) in geringen Mengen konstitutiv im Kallus vor, wurde jedoch durch eine Elicitation von 24 und 48 Stunden deutlich akkumuliert. In Versuch 2 und 4 konnte diese Substanz in unbehandelten Kalli jedoch nicht gefunden werden. Die Verbindungen RR und WW erfuhren eine Induktion schon zehn Stunden nach der Behandlung mit Hefefiltrat, die sich bis 48 Stunden weiter verstärkte.

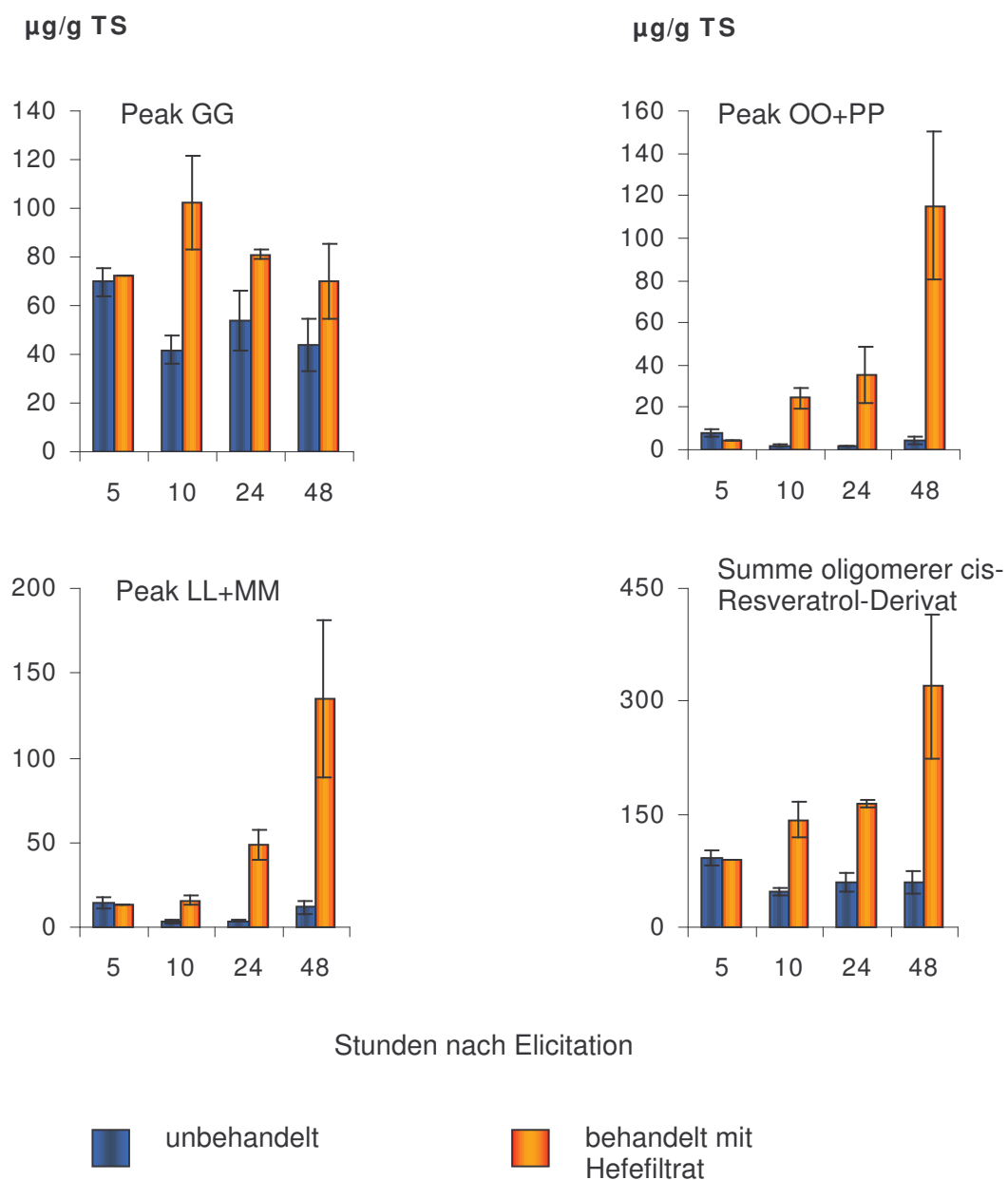


Abbildung 43: Oligomere-cis-Resveratrol-Derivate von unbehandelten im Vergleich zu mit Hefefiltrat elicitierten Weinkalli („Regent“) aus **Versuch 1**; Mittelwerte aus 4 Messwerten  $\pm$  0,5 x Standardabweichung.

Die Induktion von Verbindung VV setzte erst nach 24 Stunden ein und akkumulierte dann weiter bis 48 Stunden. Peak VV und WW kamen in unbehandelten Kalli nicht vor.

Die Dynamik der Verbindungen nach einer Elicitation mit Hefefiltrat, wie sie in Versuch 1 festgestellt wurde, stimmte mit den Ergebnissen der anderen Versuche überein. Dabei reagierte Weinkallus der Sorte „Nero“ ähnlich wie der von „Regent“, nur lag der maximale Gehalt der Verbindungen und somit auch dieser Stoffgruppe deutlich unter dem von „Regent“.

Tabelle 26 :Oligomere cis-Resveratrole von unbehandelten und mit Hefefiltrat elicitierten Weinkalli der Sorte „Regent“ (Versuch 2 und 3) und „Nero“ (Versuch 4)

Peak	Stunden nach Elicitation	unbehandelte Kalli			elicitierte Kalli		
		Mittelwert [µg/g TS]	S.E.	n	Mittelwert [µg/g TS]	S.E.	n
<b>Versuch 3</b>							
GG+HH	5	17.38	2.48	8	23.04	6.38	5
	10	26.56	2.07	8	26.05	4.33	5
	24	17.67	4.29	8	14.39	3.50	7
OO+PP	5			8			5
	10			8	9.66	2.73	5
	24			8	40.35	7.36	7
Gesamt	5	17.38	2.48	8	23.04	6.38	5
	10	26.56	2.07	8	35.71	5.89	5
	24	17.67	4.29	8	54.74	9.77	7
<b>Versuch 2</b>							
GG+HH	48	33.25	1.89	2	63.49	0.59	2
OO+PP	48	3.26	1.09	2	40.55	5.87	2
MM+NN	48			2	58.19	2.71	2
Summe	48	36.51	2.98		162.23	7.98	
<b>Versuch 4</b>							
Versuch 4	48	8.88	2.52	6	33.51	4.88	6
GG+HH	48	6.05	0.50	6	34.21	3.07	6
OO+PP	48	4.97	0.50	6	14.29	0.99	6
MM+NN	48	19.90	2.75	6	82.00	7.53	6

S.E. : Standardabweichung

unbeh. : unbehandelt

n : Anzahl der Wiederholungen bei 5 Kalli pro Phenylpropanoid-Analyse

TS : Trockensubstanz

Das Induktionsverhalten der oligomeren cis-Resveratrol-Derivate GG, LL, MM, OO und PP war dem der oligomeren trans-Resveratrol-Derivate sehr ähnlich (Abbildung 43). Auch bei dieser Stoffgruppe konnte eine mit der Elicitationsdauer zunehmende Akkumulation festgestellt werden.

Nur die Verbindung GG, die konstitutiv über die Entnahmetermine stabile Gehalte aufwies, wurde durch eine Behandlung mit Hefefiltrat geringfügig induziert. Ausschließlich in Versuch 2 („Regent“) und Versuch 4 („Nero“) führte eine 48-stündige Behandlung mit Hefefiltrat zu einer Induktion des Gehaltes der vereinten Verbindung GG+HH, (Tabelle 27) wobei nicht festzustellen war, ob die Reaktion auf das Flavonol HH oder das oligomere cis-Resveratrol-Derivat GG zurückzuführen war. Die Induktionsdynamik aller anderen Verbindungen dieser Stoffgruppe stimmten mit denen von Versuch 1 und 3 überein.

Verbindungen, die den oligomeren Resveratrol-Derivaten zugeordnet wurden, aber nicht zwischen cis- und trans-Konfiguration unterschieden werden konnten, sind in Abbildung 44 und Tabelle 28 dargestellt. Diese Verbindungen kamen in Versuch 1 konstitutiv nur in sehr geringen Konzentrationen vor und wurden wie die übrigen Resveratrol-Derivate durch eine Elicitation mit Hefefiltrat induziert. Auffallend war ihre im Vergleich zu anderen Resveratrol-Derivaten erst später einsetzende Akkumulation zwischen 24 und 48 Stunden nach Behandlung. Eine Ausnahme stellten Peak XX und Peak YY dar, die beide schon konstitutiv im Weinkallus vorkamen und beide nur geringfügig durch eine Elicitation induziert wurden.

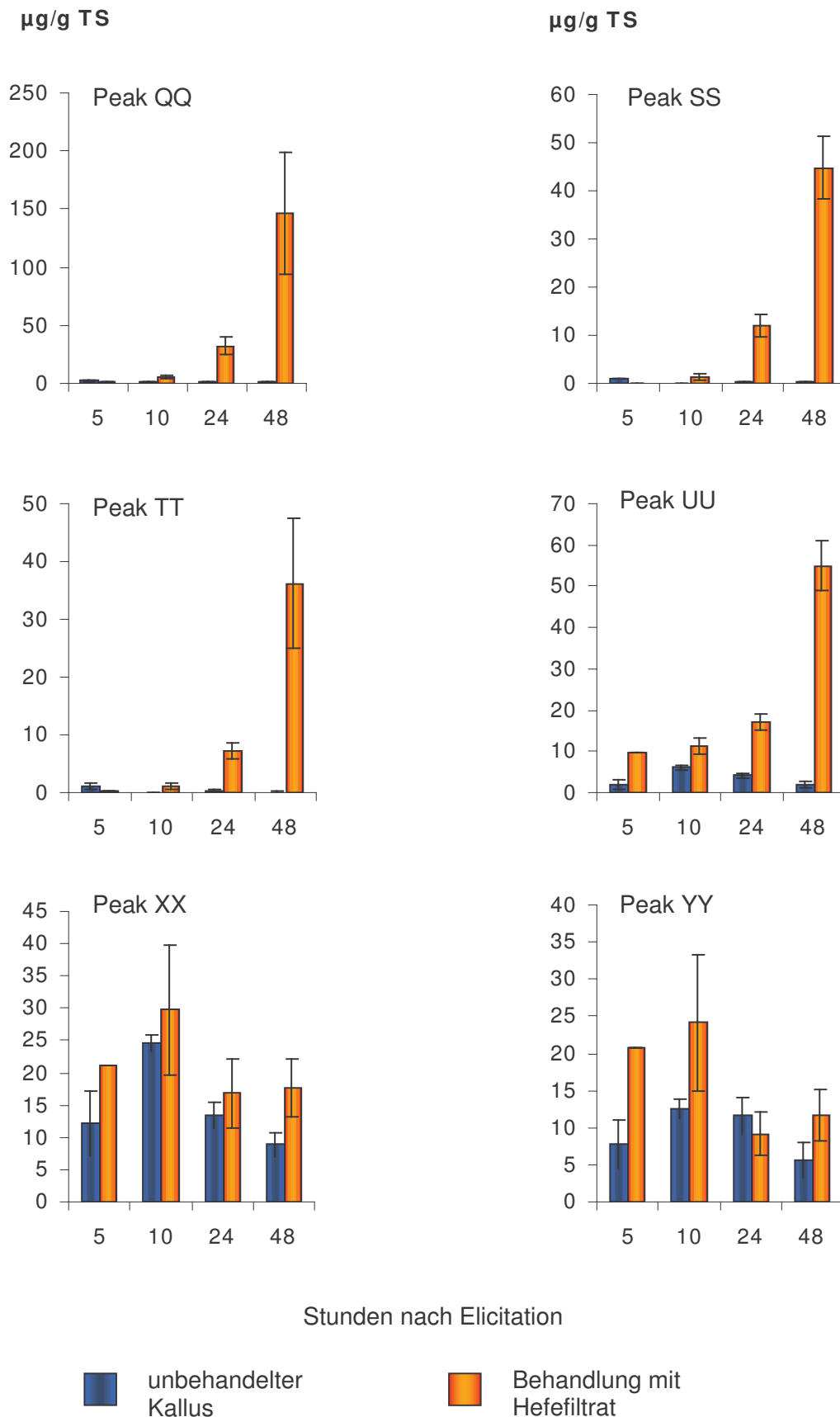


Abbildung 44: Oligomere *trans/cis*-Resveratrol-Derivate von unbehandelten im Vergleich zu mit Hefefiltrat elicitierten Weinkalli („Regent“) aus **Versuch 1**; Mittelwerte aus 4 Messwerten  $\pm 0,5 \times$  Standardabweichung.



Tabelle 27: Oligomere cis-Resveratrol-Derivate von unbehandelten und mit Hefefiltrat elicitierten Weinkalli der Sorte „Regent“ (Versuch 2 und 3) und „Nero“ (Versuch 4)

Peak	Stunden nach Elicitation	unbehandelte Kalli			elicitierte Kalli		
		Mittelwert [µg/g TS]	S.E.	n	Mittelwert [µg/g TS]	S.E.	n
<b>Versuch 3</b>							
LL	5			8			5
	10			8			5
	24			8	6.73	0.99	7
QQ	5			8			5
	10			8	7.02	1.42	5
	24			8	17.82	4.99	7
TT	5			8	0.00	0.00	5
	10			8	1.76	0.13	5
	24			8	7.35	0.74	7
UU	5			8			5
	10			8	2.68	0.98	5
	24			8	8.65	1.26	7
XX	5	8.64	2.48	8	22.89	10.12	5
	10	5.22	1.74	8	15.85	4.89	5
	24	9.25	4.61	8	13.21	4.74	7
Gesamt	5	8.64	2.48	8	22.89	10.12	5
	10	5.22	1.74	8	27.30	4.94	5
	24	9.25	4.61	8	53.76	8.24	7
<b>Versuch 2</b>							
QQ	48			2	100.59	34.08	2
TT	48			2	99.41	8.12	2
UU	48	15.00	0.40	2	221.67	80.30	2
XX	48	58.47	5.35	2	56.57	10.91	2
YY	48	48.38	7.44	2	62.70	8.07	2
Gesamt	48	121.85	12.39	2	540.93	74.94	2
<b>Versuch 4</b>							
LL	48			6	4.47	0.60	6
QQ	48			6	5.50	7.52	6
SS	48	1.35	0.39	6	74.58	15.20	6
XX	48	5.09	2.67	6	8.65	2.70	6
YY	48			6			6
Gesamt	48	6.45	2.61	6	121.78	21.15	6

unbeh. : unbehandelt

n : Anzahl der Wiederholungen bei 5 Kalli pro Phenylpropanoid-Analyse

TS : Trockensubstanz

### **3.3.12 Einfluss der Elicitorkonzentration auf die Akkumulation von Polyphenolen**

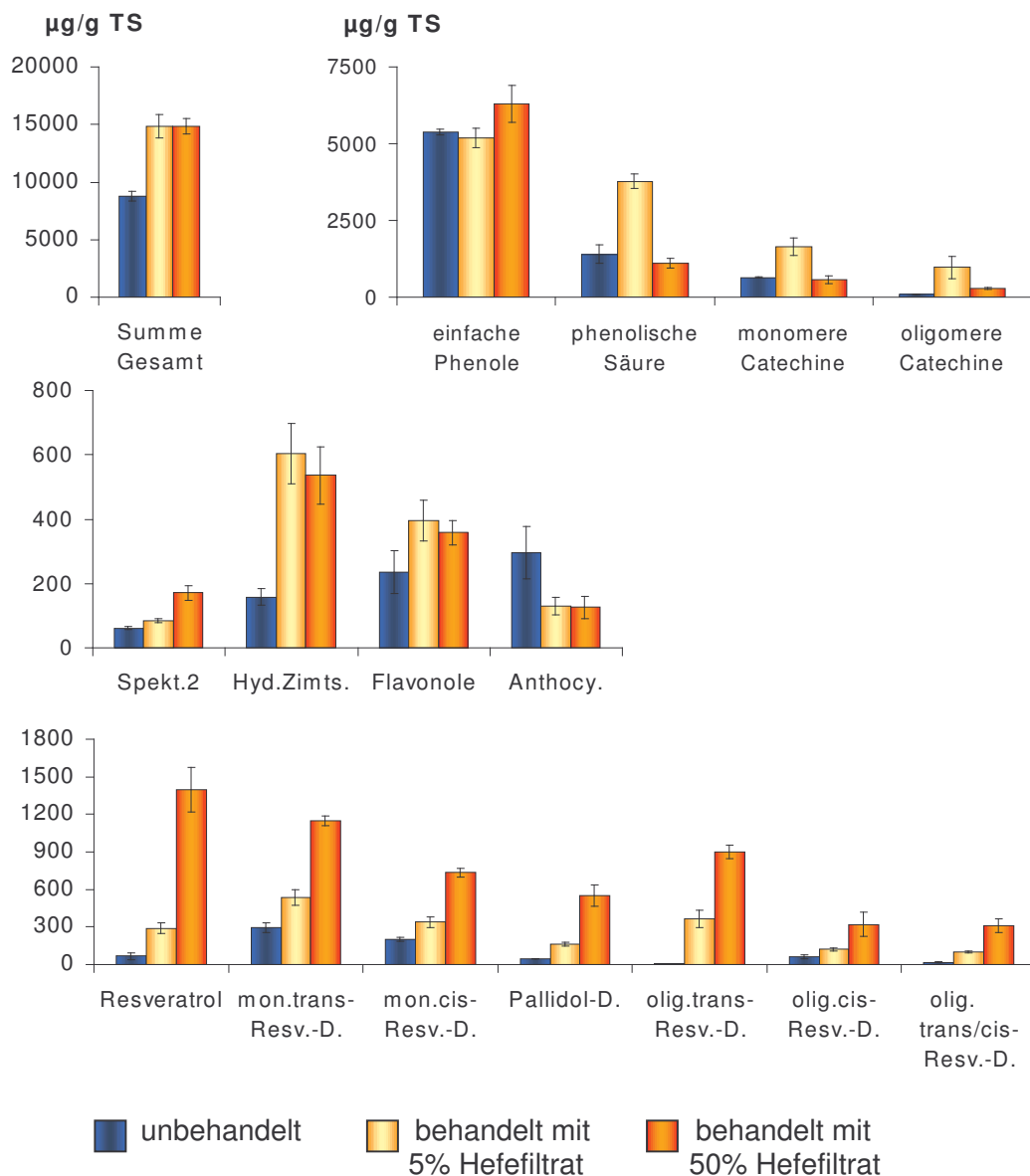
#### **3.3.12.1 Summen verschiedener Stoffklassen**

Die Synthese der Polyphenole wird aber nicht nur durch die Elicitationszeit, sondern auch durch die Elicitorkonzentration beeinflusst. Die Induktion der gesamten phenolischen Inhaltstoffe wurde in Versuch 1 deutlich nach 48-stündiger Elicitation induziert. Dabei schien die Konzentration des Hefefiltrates keinen Einfluss auf die Akkumulation zu nehmen (Abbildung 45). Die einfachen Phenole wurden bei einer Konzentration von 50% Hefefiltrat induziert, bei 5% Hefefiltrat wurde der Gehalt nicht verändert. Während die einfachen Phenole, wie auch die Verbindungen mit Spektrum 2, eine Induktion nur bei den höheren Elicitorkonzentrationen erfuhren, reagierten die Benzoesäuren sowie monomere und oligomere Catechine nur bei der Behandlung mit 5% Hefefiltrat mit einer Akkumulation. Eine Behandlung mit der höheren Elicitorkonzentration bewirkte hingegen bei diesen Stoffgruppen keine deutlichen Reaktionen.

Die Elicitationen der Hydroxyzimtsäuren, Flavonole und Anthocyane schienen unabhängig von der Elicitorkonzentration zu sein, wobei die Hydroxyzimtsäuren und die Flavonole durch die Hefefiltrat-Behandlungen eine Induktion erfuhren und sich die Gehalte der Anthocyane gegenüber der unbehandelten Variante sogar verminderten.

Das Aglykon trans-Resveratrol sowie auch alle seine Derivate erfuhren durch eine gesteigerte Elicitorkonzentration auch eine vermehrte Synthese. Dabei reagierten die oligomeren trans-Resveratrol-Derivate neben dem trans-Resveratrol am deutlichsten auf eine Elicitation.

In Abbildung 47 wurde deutlich, dass sowohl die Summe aller Polyphenole mit und ohne Catechine durch eine Elicitation mit Hefefiltrat schon ab 10 Stunden nach einer Elicitation induziert wurden. Aufgrund der Tatsache, dass 24 Stunden nach einer Elicitation eine geringe Elicitorkonzentration eine stärkere Akkumulation an Catechinen induzierte als eine höhere Konzentration (Abbildung 46), hoben sich die Effekte der Catechine und die der restlichen Phenylpropanoide auf und die Gesamtsumme schien unabhängig von der Elicitorkonzentration induziert zu werden. Die Resveratrol-Derivate machten einen Großteil der akkumulierten Stoffe aus. Dabei reagierten alle Stoffgruppen sehr ähnlich. Die Induktion des trans-Resveratrols erfolgte unabhängig von der Elicitorkonzentration schon zwischen 5 und 10 Stunden nach der Behandlung. Eine höhere Elicitorkonzentration führte zu einer länger anhaltenden und stärkeren Akkumulation als eine niedrigere Konzentration. Eine Akkumulation der Derivate erfolgte gegenüber dem Aglykon Resveratrol verzögert. Konzentrations-abhängige Stoffakkumulationen wurden auch bei den Resveratrol-Derivaten erst 24 Stunden nach den Behandlungen deutlich.



*TS* = Trockensubstanz  
*Spekt. 2* = Verbindungen der Stoffgruppe Spektrum 2  
*Hyd. Zimts.* = Hydroxyzimtsäuren  
*Anthocy.* = Anthocyane  
*mon. trans-Resv.-D.* = monomere trans-Resveratrol-Derivate  
*mon. cis-Resv.-D.* = monomere cis-Resveratrol-Derivate  
*oligo. trans-Resv.-D.* = oligomere trans-Resveratrol-Derivate  
*oligo. cis-Resv.-D.* = oligomere cis-Resveratrol-Derivate  
*oligo. trans/cis-Resv.-D.* = oligomere trans/cis-Resveratrol-Derivate

Abbildung 45: Summen verschiedener Stoffgruppen von unbehandelten und mit zwei verschiedenen Konzentrationen Hefefiltrat (5% und 50%) elicierten Weinkalli der Sorte „Regent“ 48 Stunden nach der Behandlung (**Versuch 1**). Mittelwerte aus 4 Messwerten  $\pm 0,5$  x Standardabweichung

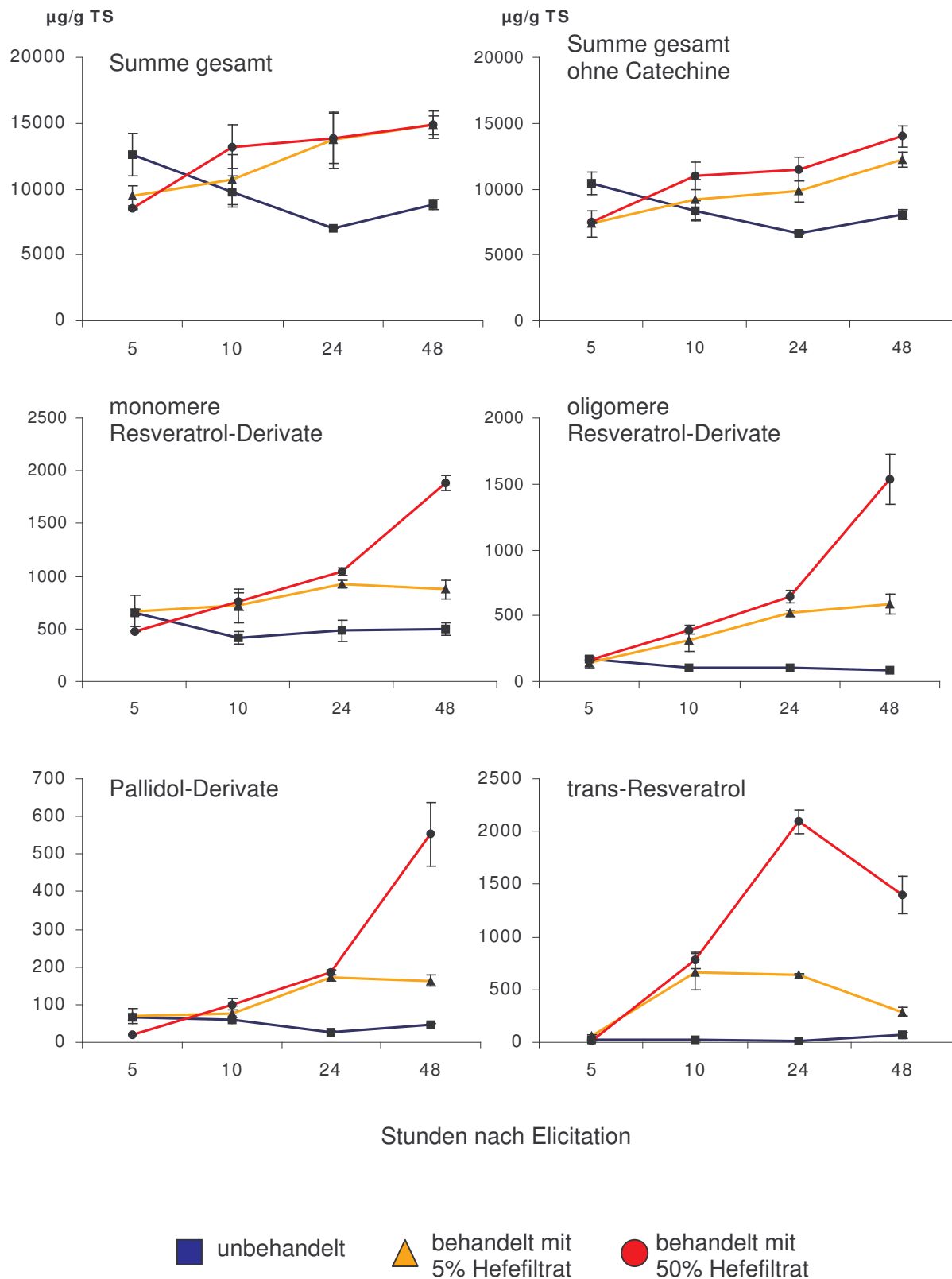


Abbildung 46: Gesamtgehalte der Polyphenole und Summen verschiedener Stoffgruppen von unbehandelten und mit zwei verschiedenen Konzentrationen Hefefiltrat (5% und 50%) elicitierten Weinkalli der Sorte „Regent“ zu verschiedenen Entnahmetermi-**n**en (**Versuch 1**). Mittelwerte aus 4 Messwerten  $\pm 0,5 \times$  Standardabweichung.

### 3.3.12.2 Catechine

Hinsichtlich der Akkumulation nach einer Elicitation mit unterschiedlichen Konzentrationen an Hefefiltrat reagierten alle monomeren Catechine sehr ähnlich (Abbildung 47). Ab 10 Stunden nach der Elicitation sanken die Gehalte der unbehandelten Kalli ab, die Konzentrationen der mit 50% Hefefiltrat elicitierten Kalli blieb bis 24 Stunden nach Behandlung konstant, um dann ebenfalls abzusinken. Catechin, Epicatechin und Epicatechingallat erfuhren nach einer 5%igen Elicitorbehandlung hingegen eine Akkumulation der Konzentrationen, die dann nach 24 Stunden, analog zu den beiden anderen Behandlungen, langsam absank.

Die Dynamik der Konzentrationen bei den verschiedenen Behandlungen war bei den oligomeren Catechine mit denen der Monomeren vergleichbar.

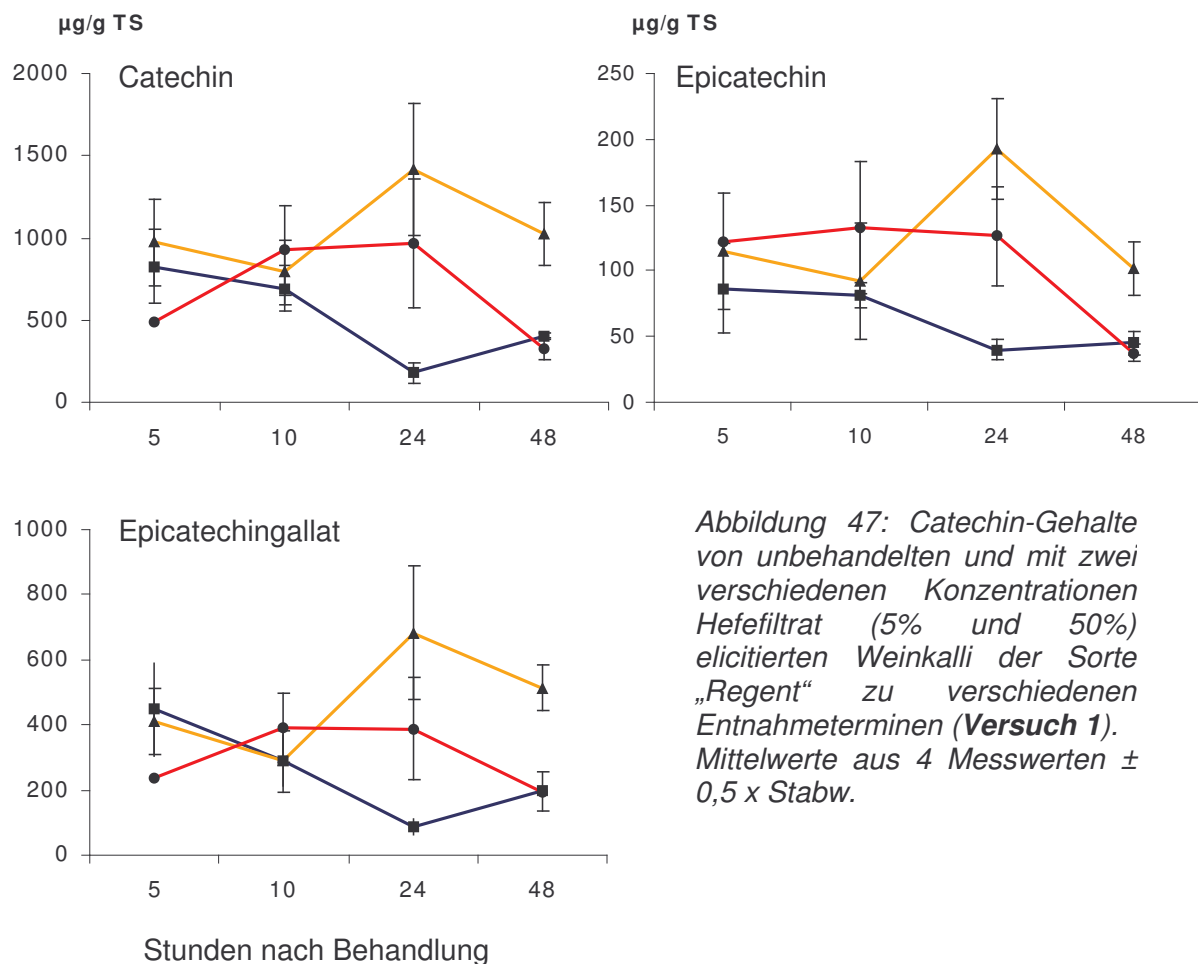


Abbildung 47: Catechin-Gehalte von unbehandelten und mit zwei verschiedenen Konzentrationen Hefefiltrat (5% und 50%) elicitierten Weinkalli der Sorte „Regent“ zu verschiedenen Entnahmetermen (Versuch 1). Mittelwerte aus 4 Messwerten  $\pm 0,5 \times$  Stabw.

unbehandelt
  behandelt mit 5% Hefefiltrat
  behandelt mit 50% Hefefiltrat

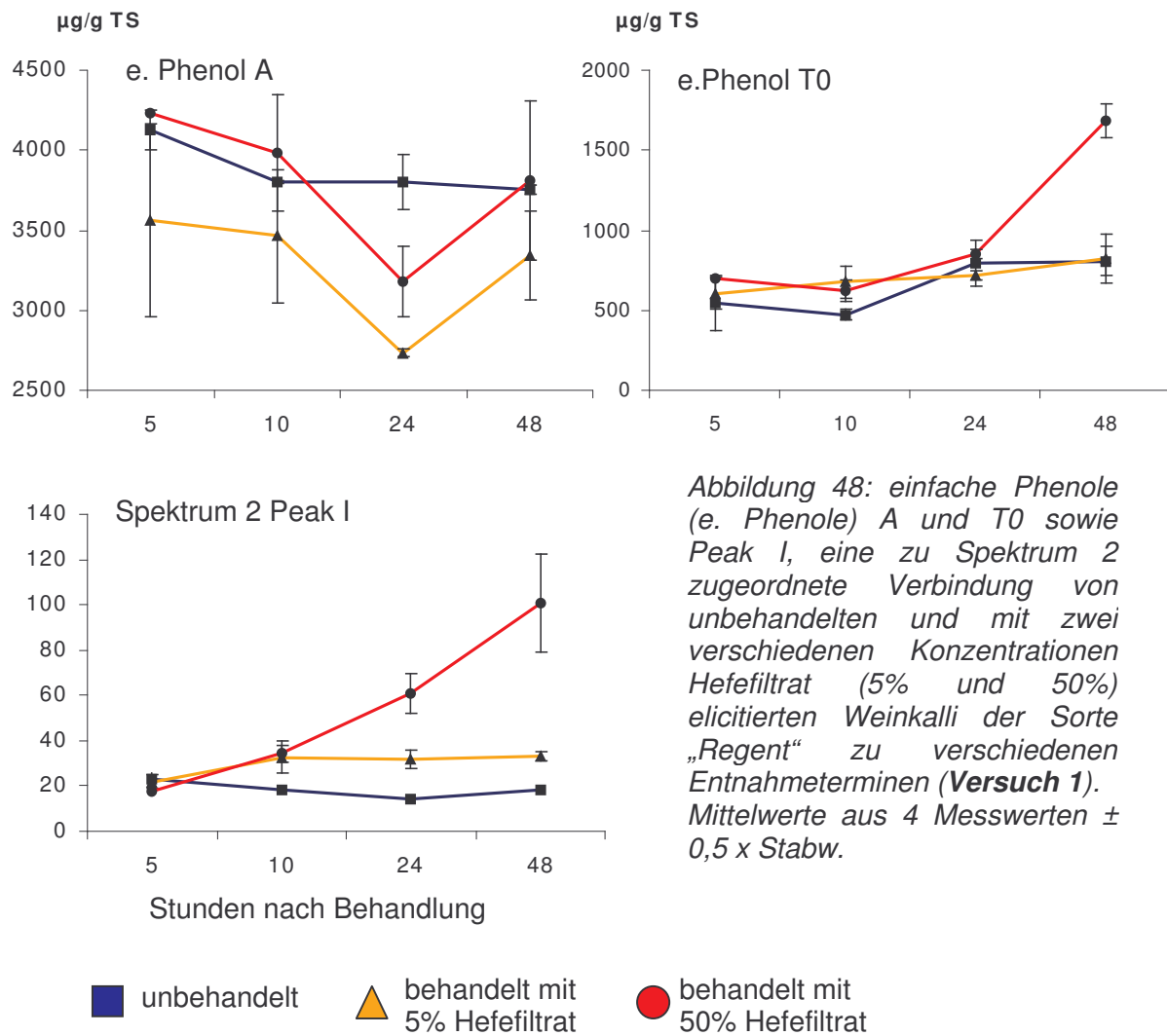


Abbildung 48: einfache Phenole (e. Phenole) A und T0 sowie Peak I, eine zu Spektrum 2 zugeordnete Verbindung von ungetriebenen und mit zwei verschiedenen Konzentrationen Hefefiltrat (5% und 50%) elicitierten Weinkalli der Sorte „Regent“ zu verschiedenen Entnahmetermen (Versuch 1). Mittelwerte aus 4 Messwerten  $\pm 0,5 \times$  Stabw.

### 3.3.12.3 Einfache Phenole

Das einfache Phenol Peak A wies bei den ungetriebenen Kalli über die Entnahmetermine relativ konstante Werte auf (Abbildung 48). Sowohl durch eine Elicitation mit 5% als auch mit 50% Hefefiltrat sank der Gehalt zwischen 10 und 24 Stunden nach den Behandlungen deutlich ab, um dann erneut zu akkumulieren. Dabei lagen die Konzentrationen in den mit niedrigerer Elicitorkonzentration behandelten Kalli zu jedem Entnahmetermin unter denen der mit hoher Elicitorkonzentration induzierten. Peak A wies allgemein große Konzentrationsschwankungen auf. 24 Stunden lang unterschieden sich die Gehalte von T0, einem einfachen Phenol, in den ungetriebenen Kalli nicht von den mit Hefefiltrat elicitierten Varianten. Eine deutliche Akkumulation dieser Verbindung erfolgte erst 48 Stunden nach Elicitation und dann auch nur mit einer Hefefiltrat-Konzentration von 50%.

Die Verbindung Peak I zählt zu der Gruppe von Spektrum 2 und erfuhr durch eine Behandlung mit hoher Elicitorkonzentration eine Induktion, die bereits 24 Stunden nach der Behandlung deutlich zu sehen war und mit steigender Elicitationsdauer weiter anstieg. Eine

Behandlung mit niedriger Elicitorkonzentration führte im Vergleich zur unbehandelten Variante nur zu einem geringfügigen Konzentrationsanstieg mit anschließender Stagnation.

### 3.3.12.4 Benzoessäuren

Die Konzentrationsentwicklung des Gallussäure-Derivates B der unbehandelten Kalli war mit der Stoffgruppe der monomeren und oligomeren Catechine vergleichbar (Abbildung 49). Sowohl die Konzentration der Catechine als auch die von Peak B sank mit zunehmender Kulturdauer stetig ab, um dann nach 24 Stunden wieder leicht anzusteigen.

Das Gallussäure-Derivat B wies gegenläufige Akkumulationsverhalten bei unterschiedlichen Elicitorkonzentrationen auf. Während eine 50%ige Hefekonzentration zu einer Reduktion des Gehaltes führte, induzierte eine 5%ige Kulturfiltratkonzentration die Synthese (Abbildung 49). Bei den Catechinen zeigte sich nach einer Elicitation mit 50% Hefefiltrat schon fünf Stunden nach Behandlung ein verminderter Gehalt. Eine 5% Filtratkonzentration hatte hingegen keinen Einfluss auf die Catechin-Konzentration. Diese Gehaltsreduktion wurde bei dem Gallussäure-Derivat nach beiden Elicitorkonzentrationen beobachtet.

Die mit Hefefiltrat behandelten Kalli erfuhren im Gegensatz zu den unbehandelten Kalli eine tendenzielle Akkumulation durch die Behandlungen, wobei eine geringere Elicitorkonzentration sowohl bei den Catechinen als auch bei Peak B diesen Effekt verstärkte.

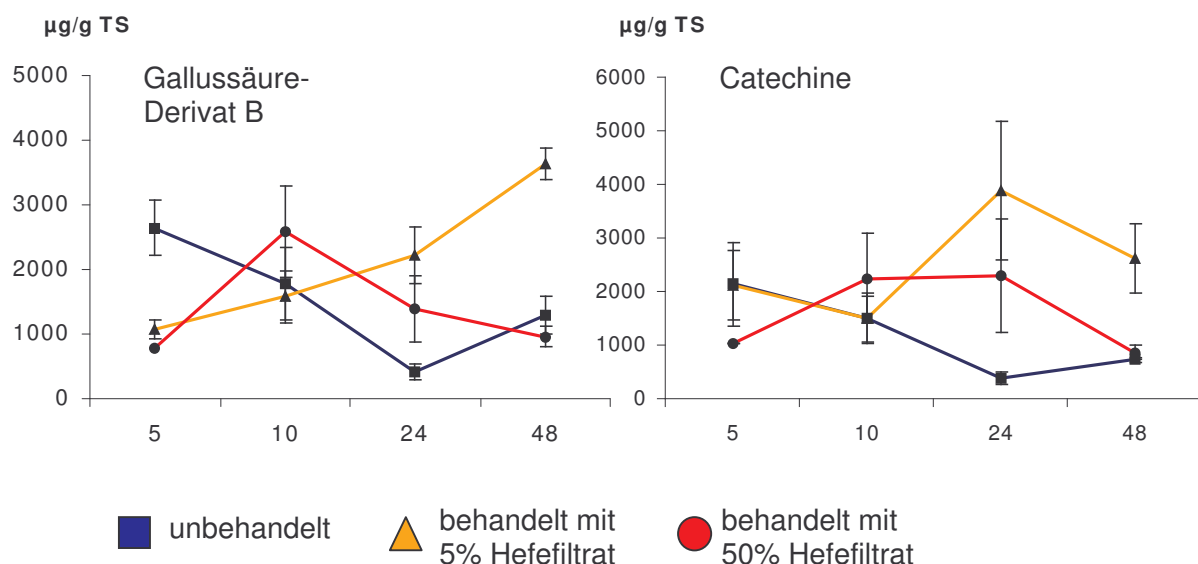


Abbildung 49: Gallussäure-Derivat Peak B und die Summe aller Catechine von unbehandelten und mit zwei verschiedenen Konzentrationen Hefefiltrat (5% und 50%) elicierten Weinkalli der Sorte „Regent“ zu verschiedenen Entnahmetermine (**Versuch 1**). Mittelwerte aus 4 Messwerten  $\pm 0,5 \times$  Standardabweichung.

Das p-Cumarsäure-Derivat Peak L erfuhr bei einer 50%igen Hefefiltrat-Behandlung nach 24 Stunden seine maximale Konzentration, die dann wieder absank (Abbildung 50). Eine Die maximale Induktion wurde bei den Catechinen 24 Stunden nach der 5% Hefefiltratbehandlung erzielt, der Gehalt des Gallussäure-Derivates stieg hingegen bis 48 Stunden nach Behandlung an. Eine Behandlung mit der höheren Elicitorkonzentration führte auch bei Peak B zu einem Absinken der Konzentration ab 10 Stunden nach Behandlung.

Elicitation mit einem 5%igen Filtrat führte zu einer verzögerten Akkumulation, die bis 48 Stunden nach Behandlung anstieg und zu diesem Entnahmeterrin das gleiche Niveau erreichte, wie eine Elicitation mit 50%iger Filtratlösung 24 Stunden nach der Behandlung. Das Kaffeesäure-Derivat Peak AA schien hingegen nicht von einer Elicitation mit Hefefiltrat induziert worden zu sein. Der Konzentrationsanstieg 48 Stunden nach einer 50%igen Hefefiltratbehandlung wies große Konzentrationsschwankungen auf, sodass eine Induktion nicht deutlich war.

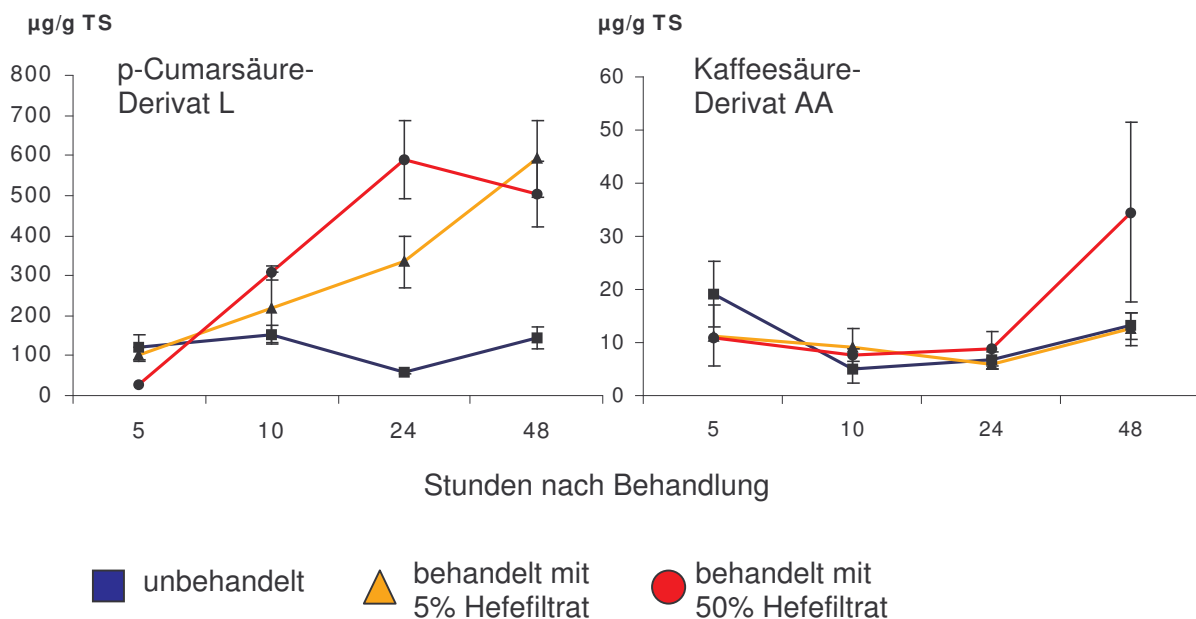


Abbildung 50: Peak L,, ein p-Cumarsäure-Derivat und das Kaffeesäure-Derivat AA von unbehandelten und mit zwei verschiedenen Konzentrationen Hefefiltrat (5% und 50%) elicierten Weinkalli der Sorte „Regent“ zu verschiedenen Entnahmeterrinen (**Versuch 1**). Mittelwerte aus 4 Messwerten  $\pm 0,5 \times$  Standardabweichung.

Die Protocatechusäure Peak C (Abbildung 51) wurde in ihrem Gehalt durch eine Elicitation nur leicht induziert. Dabei schien die Elicitorkonzentration keinen deutlichen Einfluss auf die Akkumulationsstärke zu nehmen, wobei die Gehalte, die durch eine geringere Elicitorkonzentration induziert wurden, tendenziell über denen lagen, die durch eine höhere Hefefiltratkonzentration induziert wurden. Die Vanillinsäure Peak M kam nur in geringen



Konzentrationen im Weinkallus "Regent" vor. Die Elicitorkonzentration hatte bei dieser Verbindung keinen eindeutigen Einfluss auf den Gehalt.

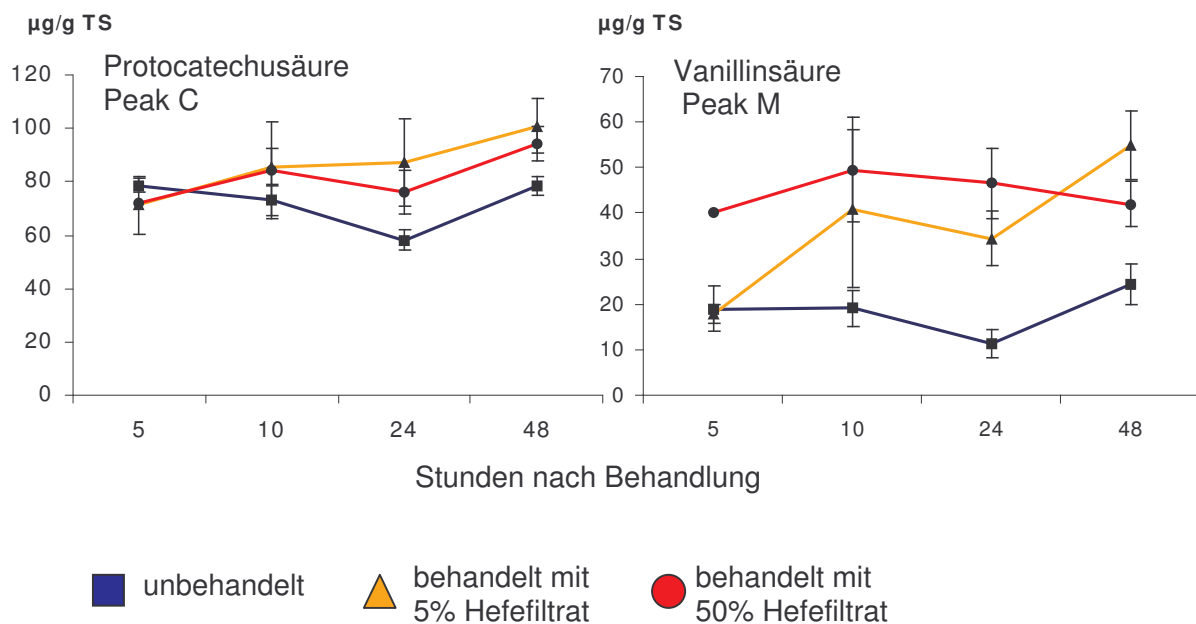


Abbildung 51: Protocatechusäure Peak C und Vanillinsäure Peak M von unbehandelten und mit zwei verschiedenen Konzentrationen Hefefiltrat (5% und 50%) elicitierten Weinkalli der Sorte „Regent“ zu verschiedenen Entnahmetermen (Versuch 1). Mittelwerte aus 4 Messwerten  $\pm 0,5 \times$  Standardabweichung.

### 3.3.12.5 Flavonole

Der Gehalt der Flavonole T2 und HH reduzierte sich in der unbehandelten Variante deutlich mit fortschreitender Kulturdauer. Dabei verminderte sich die T2-Konzentration zwischen den Entnahmetermen von fünf und zehn Stunden nach der Behandlung, die von Peak HH verminderte sich sogar bis 24 Stunden nach der Kontrollbehandlung. Die Dynamik von Peak HH ist mit der der Catechine und des Gallussäure-Derivats Peak B vergleichbar (Abbildung 52). Auch lagen die Konzentrationen fünf Stunden nach einer Elicitation mit Hefefiltrat wie bei Peak B deutlich unter denen der unbehandelten Variante. Behandlungen mit Hefefiltrat schienen bei dem Flavonol T2 keinen Einfluss auf den Gehalt zu nehmen, bei HH stieg der Gehalt 24 Stunden lang an und stagnierte dann. Dabei schien die Akkumulationsintensität unabhängig von der Elicitorkonzentration zu sein.

### 3.3.12.6 Anthocyane

Das Anthocyan Peak BB wies in Behandlungen mit Hefefiltrat geringere Gehalte auf als in der unbehandelten Variante, wobei tendenziell eine Erhöhung der Elicitorkonzentration eine Gehaltsverminderung mit sich führte (Abbildung 52). Aufgrund der niedrigen Konzentrationen und den starken Standardabweichungen, sollten diese Reaktionen nicht zu viel Bedeutung

finden. Deutlicher waren die Gehalte des Anthocyan Peak II, die in den unbehandelten Kalli deutlich über den mit Hefefiltrat behandelten Varianten lagen. Dabei wies die Variante mit der höheren Elicitorkonzentration die geringsten Gehalte an Verbindung II auf.

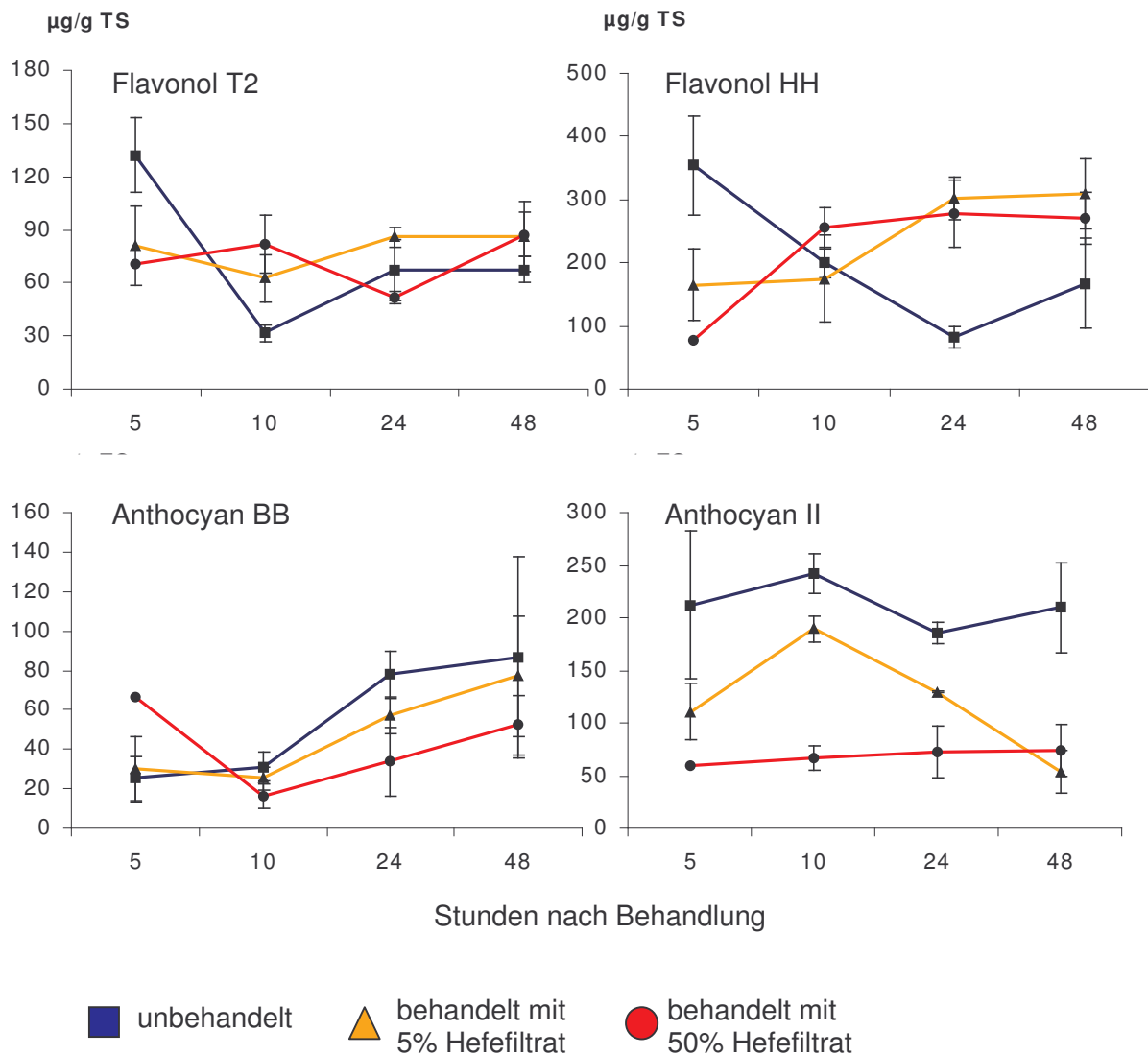


Abbildung 52: Flavonole T2 und HH und Anthocyane BB und II von unbehandelten und mit zwei verschiedenen Konzentrationen Hefefiltrat (5% und 50%) elicitierten Weinkalli der Sorte „Regent“ zu verschiedenen Entnahmetermiinen (**Versuch 1**). Mittelwerte aus 4 Messwerten  $\pm 0,5 \times$  Standardabweichung.

### 3.3.12.7 Monomere Resveratrol-Derivate

Das trans-Resveratrol akkumulierte schon zwischen 5 und 10 Stunden nach einer Behandlung mit Hefefiltrat (Abbildung 53). Dabei war die Reaktionsgeschwindigkeit, im Gegensatz zu der Akkumulationsdauer, nicht von der Elicitorreaktion abhängig. Ein 50%iges Hefefiltrat induzierte eine Akkumulation, die bis 24 Stunden nach Behandlung andauerte,

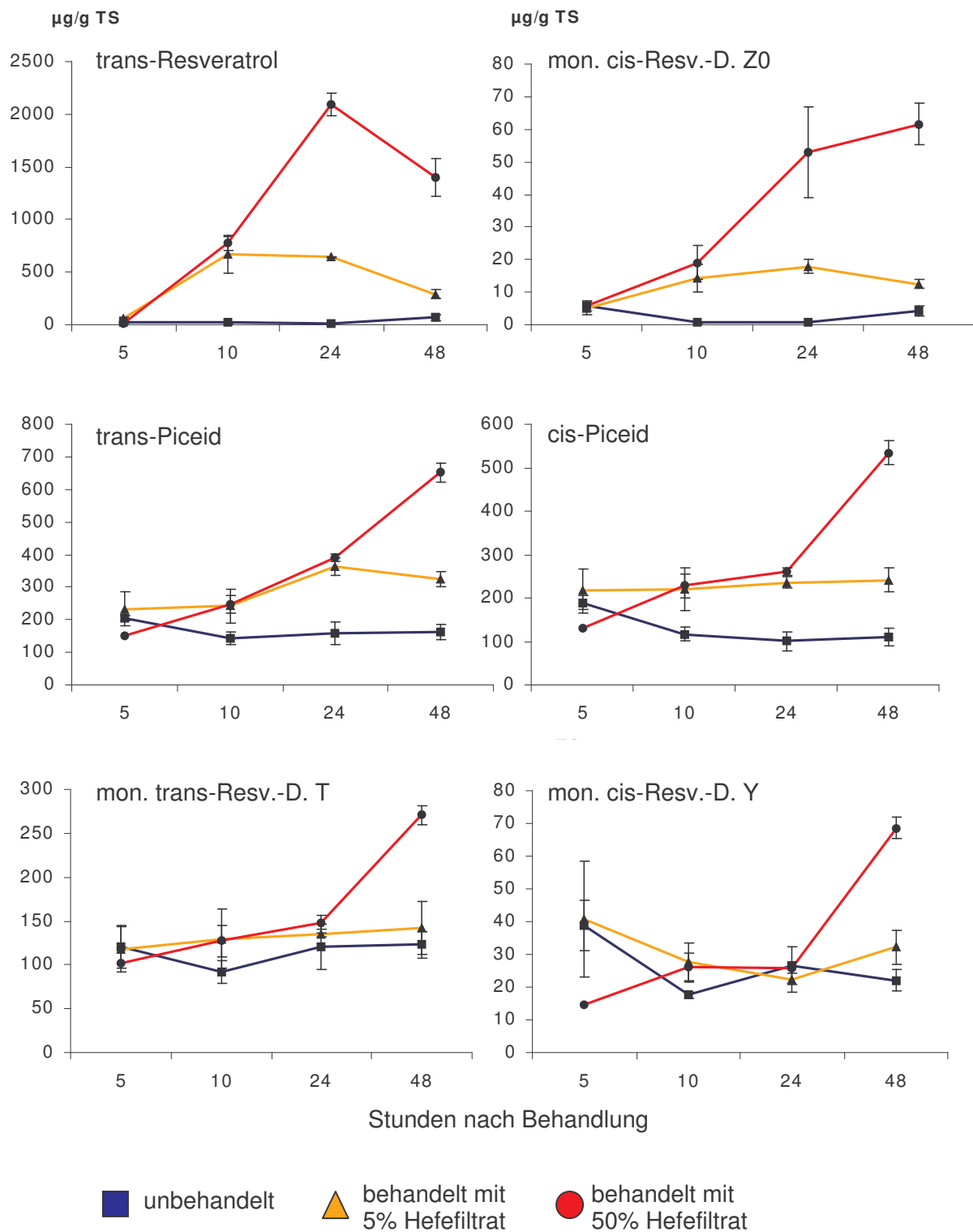


Abbildung 53: Verschiedenen monomere Resveratrol-Derivate von unbehandelten und mit zwei verschiedenen Konzentrationen Hefefiltrat (5% und 50%) elicitierten Weinkalli der Sorte „Regent“ zu verschiedenen Entnahmetermine (**Versuch 1**). Mittelwerte aus 4 Messwerten  $\pm 0,5 \times$  Standardabweichung.

eine Behandlung mit verminderter Elicitorkonzentration stagnierte hingegen auf dem Stand. Bei der geringen Elicitorkonzentration stagnierte der Gehalt, eine Elicitation mit 50% Hefefiltrat führte jedoch zu einer fortschreitenden Akkumulation. Das trans-Piceid wurde dabei schneller angereichert als sein cis-Isomer.

Die Induktion des monomeren trans-Resveratrol-Derivates T und einer entsprechenden cis-Variante Y durch Behandlungen mit Hefefiltrat erfolgte innerhalb der ersten 24 Stunden nur in geringem Maß. Eine Behandlung mit 50%igem Hefefiltrat induzierte eine Akkumulation beider Verbindungen zwischen 24 und 48 Stunden nach der Behandlung, eine 5%ige Elicitorkonzentration zeigte keinen Einfluss auf die Konzentration.

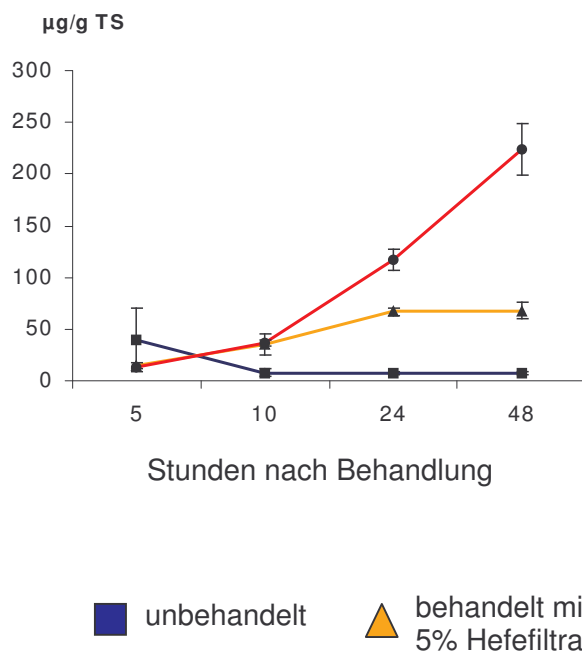


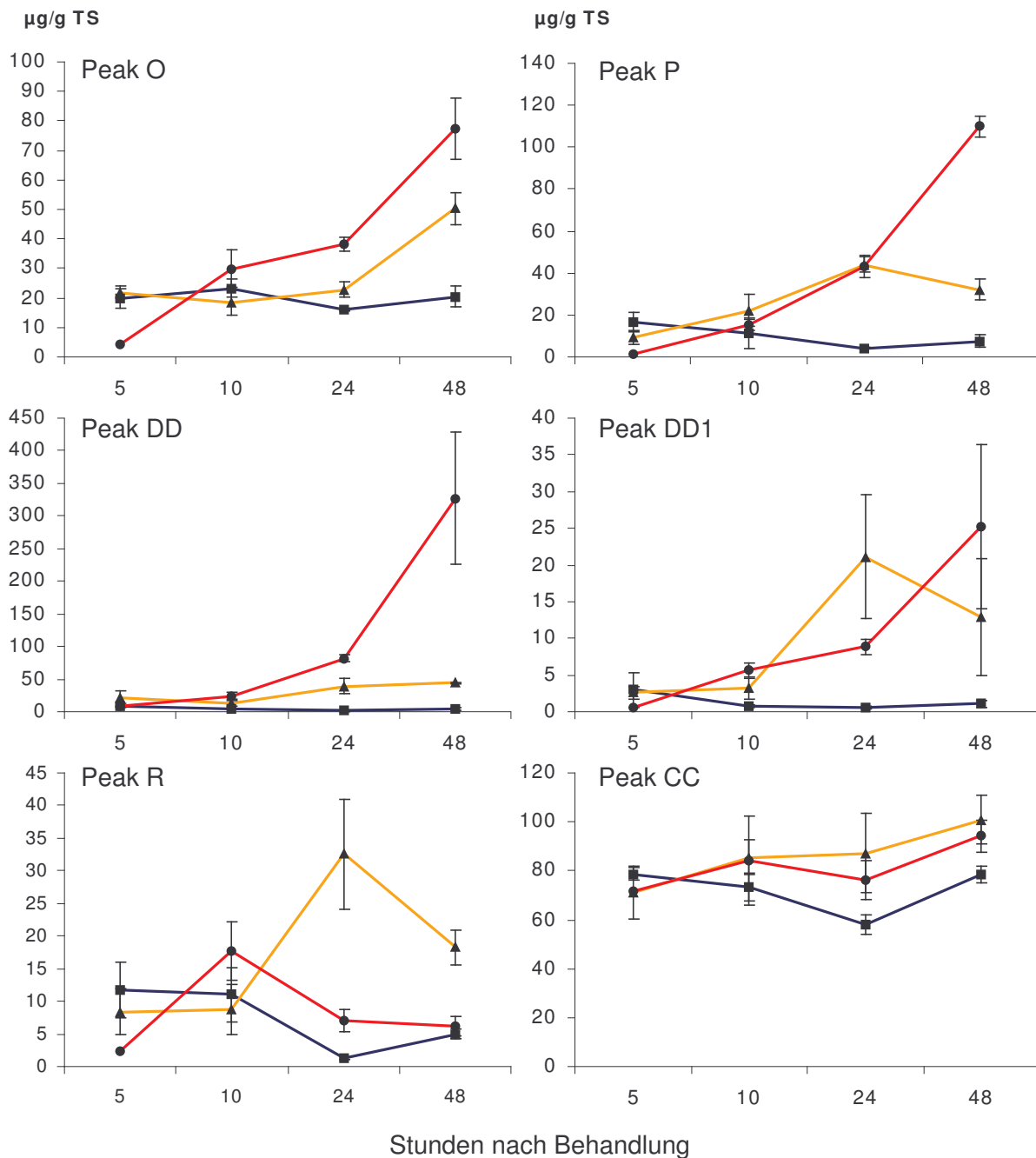
Abbildung 54: Monomeres trans-Resveratrol-Derivate X von unbehandelten und mit zwei verschiedenen Konzentrationen Hefefiltrat (5% und 50%) elicitierten Weinkalli der Sorte „Regent“ zu verschiedenen Entnahmetermen (Versuch 1). Mittelwerte aus 4 Messwerten  $\pm 0,5 \times$  Stabw.

Die Dynamik des monomeren trans-Resveratrol-Derivat X erinnerte zum einen an die von trans-Piceid, in dem eine Elicitation mit 50% Hefefiltrat einen starken Konzentrationsanstieg induzierte, der bis 48 Stunden nach der Behandlung anhielt (Abbildung 54). Die verminderte Induktion durch eine geringere Hefekonzentration, die sich schon 10 Stunden nach der Behandlung abzeichnete, entspricht allerdings eher der Dynamik des trans-Resveratrols.

### 3.3.12.8 Pallidol-Derivat

Eine geringere Elicitorkonzentration führte bei dem Pallidol-Derivates O an allen Entnahmetermen zu einer verminderten Akkumulation im Vergleich zu einer höheren Elicitorkonzentration (Abbildung 55). Das Pallidol-Derivat P akkumulierte bis 24 Stunden nach der Behandlung unabhängig von der Elicitorkonzentration. Bei der 5%igen

Hefefiltratbehandlung stagnierte der Gehalt dann, während die Konzentration bei einer Behandlung mit 50% Filtrat weiter anstieg.



■ unbehandelt    ▲ behandelt mit 5% Hefefiltrat    ● behandelt mit 50% Hefefiltrat

Abbildung 55: Pallidol-Derivat O, P, DD, DD1, R sowie CC von unbehandelten und mit zwei verschiedenen Konzentrationen Hefefiltrat (5% und 50%) elicierten Weinkalli der Sorte „Regent“ zu verschiedenen Entnahmetermiinen (**Versuch 1**). Mittelwerte aus 4 Messwerten  $\pm 0,5 \times$  Standardabweichung.

Das Induktionsverhalten des Pallidol-Derivates DD war mit dem von Piceid vergleichbar. Eine hohe Elicitorkonzentration induzierte eine stärkere Akkumulation, die 24 Stunden nach Behandlung deutlich sichtbar war. Eine verminderte Elicitorkonzentration induzierte einen vergleichsweise geringen Anstieg der Konzentration. Die Verbindung DD1 zeigte eine ähnliche Dynamik mit einer geringeren von der Elicitorkonzentration abhängigen Akkumulation wie bei DD.

Das Pallidol-Derivat R erfuhr durch eine Elicitation mit 5% Hefefiltrat eine deutlich stärkere Akkumulation als mit 50% Filtrat. Der maximale Gehalt wurde bei der erhöhten Konzentration zehn Stunden nach der Behandlung, bei der geringeren Filtratkonzentration etwas verzögert erst 14 Stunden später, erfasst. Die Gehalte sanken nach den Akkumulationsmaxima bei beiden Elicitorkonzentrationen wieder ab.

### **3.3.12.9 Oligomere Resveratrol-Derivate**

Die oligomeren trans-Resveratrol-Derivate RR, VV und WW (Abbildung 56) reagierten auf eine Elicitation mit 50% Hefefiltrat sehr ähnlich. Eine Elicitation mit 5% Hefefiltrat führte bei RR und WW bis 24 Stunden nach Behandlung zu vergleichbaren Akkumulationen. Zwischen 24 und 48 Stunden nach Behandlung führte eine Behandlung mit hoher Elicitorkonzentration zu einem verstärkten Gehaltsanstieg ein Peak WW, eine verminderte Elicitorkonzentration schwächte diese Induktion hingegen ab. Während der Gehalt von Peak VV nach Behandlung mit hoher Elicitorkonzentration wie bei RR weiter anstieg, stagnierte er bei VV nach Behandlung mit verminderter Elicitorkonzentration und nahm bei RR sogar ab.

Die Summe der oligomeren cis-Resveratrol-Derivat Peaks LL und MM, die in diesem Versuch bei der HPLC-Analyse nicht optimal getrennt wurden, wiesen die gleichen Verläufe auf wie Peak RR, was auf eine Isomerie zwischen RR und MM (oder LL) schließen lässt. Weitere oligomere trans- und cis-Resveratrol-Derivate reagierten, wie die schon aufgeführten, mit einer Akkumulation, die durch eine höhere Elicitorkonzentration verstärkt wurde. Die Verbindungen XX und YY wiesen nur geringe Gehalte auf und konnten bezüglich ihres Induktionsverhaltens nicht eindeutig bestimmt werden. Die oligomeren Resveratrol-Derivate sind in Tabelle 29 aufgeführt.

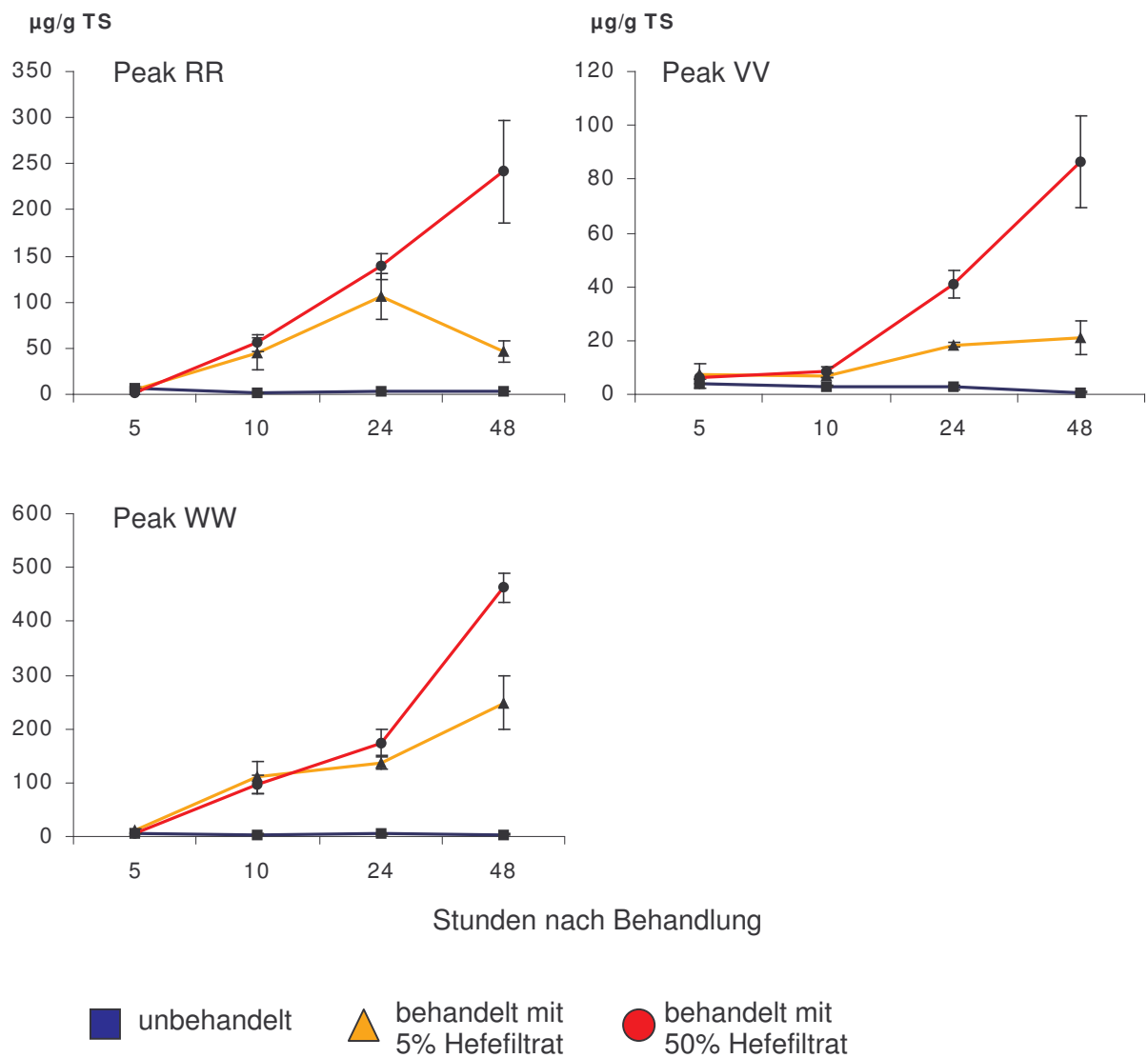


Abbildung 56: Oligomere trans-Resveratrol-Derivate Peak RR, VV und WW von unbehandelten und mit zwei verschiedenen Konzentrationen Hefefiltrat (5% und 50%) elizitierten Weinkalli der Sorte „Regent“ zu verschiedenen Entnahmetermen (Versuch 1). Mittelwerte aus 4 Messwerten  $\pm 0,5 \times$  Standardabweichung.

Tabelle 28: Oligomere Resveratrol-Derivate von unbehandelten und mit zwei verschiedenen Konzentrationen Hefefiltrat (5% und 50%) elicierten Weinkalli der Sorte „Regent“ zu verschiedenen Entnahmetermen (Versuch 1). Mittelwerte aus 4 Messwerten

Peak	Behandlung	Gehalte [µg/g Trockensubstanz]				S.E. (n=4) [µg/g Trockensubstanz]			
		5 h	10 h	24 h	48 h	5 h	10 h	24 h	48 h
GG	Kontrolle	69.67	41.59	54.09	44.05	11.62	11.46	24.51	21.72
	Hefe 5%	56.72	64.55	94.49	59.64	26.25	28.37	17.52	11.73
	Hefe 50%	72.56	102.6	81.01	69.95		38.18	3.59	30.76
OO+PP	Kontrolle	8.02	1.94	1.72	4.34	4.00	0.72	0.48	3.03
	Hefe 5%	6.63	18.36	5.03	24.49	5.03	11.81	0.82	4.59
	Hefe 50%	4.39	24.33	35.43	115.3		9.00	26.69	70.20
LL + MM	Kontrolle	14.10	3.39	3.82	11.67	6.40	2.39	1.12	8.35
	Hefe 5%	13.55	11.88	59.54	37.74	10.55	4.28	16.67	10.86
	Hefe 50%	13.16	15.84	48.43	134.3		4.90	17.73	92.79
QQ	Kontrolle	2.20	1.33	1.43	1.03	1.07	0.12	0.35	0.33
	Hefe 5%	2.67	3.95	18.13	19.01	2.37	2.42	3.10	7.66
	Hefe 50%	1.11	5.27	32.32	146.3		3.42	14.36	105.4
SS	Kontrolle	0.98	0.01	0.34	0.31	0.26	0.00	0.15	0.23
	Hefe 5%	0.37	0.89	5.28	10.21	0.20	0.66	0.76	3.10
	Hefe 50%	0.07	1.46	11.96	44.76		1.34	4.79	12.99
TT	Kontrolle	1.05	0.07	0.42	0.13	1.05	0.06	0.14	0.08
	Hefe 5%	0.46	1.79	5.16	8.60	0.44	1.23	0.26	6.10
	Hefe 50%	0.22	1.14	7.27	36.22		1.03	2.87	22.67
UU	Kontrolle	1.99	6.13	4.15	1.92	2.55	1.21	0.98	1.56
	Hefe 5%	9.68	8.75	11.83	30.97	7.85	5.59	1.13	10.44
	Hefe 50%	9.83	11.24	17.26	54.98		3.76	3.93	12.17
XX	Kontrolle	12.14	24.54	13.48	8.90	10.02	2.59	4.08	3.70
	Hefe 5%	12.98	17.77	20.81	20.50	9.54	16.83	5.14	4.65
	Hefe 50%	21.08	29.76	16.85	17.74		20.27	10.63	9.00
YY	Kontrolle	7.80	12.53	11.60	5.68	6.51	2.46	5.10	4.70
	Hefe 5%	8.43	11.75	13.92	10.82	6.71	11.11	0.25	0.95
	Hefe 50%	20.70	24.19	9.13	11.64		18.35	5.77	6.94

*h:* Stunden nach Behandlung

*S.E.:* Standardabweichung

*n:* Anzahl an Messwerten



### 3.3.13 Einfluss unterschiedlicher Hefestämme von *Aureobasidium pullulans* auf das Induktionsverhalten von Phenylpropanoiden

#### 3.3.13.1 Gesamtgehalt an Phenylpropanoiden und Catechine

Für die Elicitationsversuche wurde weitgehend ein Gemisch aus 4 Hefestämmen verwendet, die aber wie in Versuch 3 leichte individuelle Induktionsverhalten beim Weinkallus der Sorte „Regent“ zeigten.

Der Gesamtgehalt aller Polyphenole ohne die Catechine (Abbildung 57) wurde innerhalb von 24 Stunden durch alle Hefeisolate induziert, wobei durch eine Applikation des Hefefiltrates von Isolat S 3.2 die deutlichste Gehaltszunahme hervorgerufen wurde. Auffallend war bei diesem Isolat, dass eine Akkumulation erst zwischen zehn und 24 Stunden nach der Behandlung festzustellen war, wohingegen die anderen Isolate schon zehn Stunden nach der Elicitation Gehaltserhöhungen induzierten, die sich dann weiter steigerten.

Das Hefeisolat 10/8 schien zu keinem Zeitpunkt Einfluss auf den Gehalt an Catechinen zu nehmen (Abbildung 57). Die stärkste Wirkung bezüglich dieser Stoffgruppe zeigte das Isolat S 3.2. Dieses Isolat induzierte eine deutliche Dynamik in der Synthese der Catechine, dessen Gehalt 5 und 10 Stunden nach der Behandlung deutlich über dem der unbehandelten Variante lag und dann bis 24 Stunden unter dessen Niveau absank. Auch in diesem Versuch wurde eine starke Streuung der Catechine festgestellt.

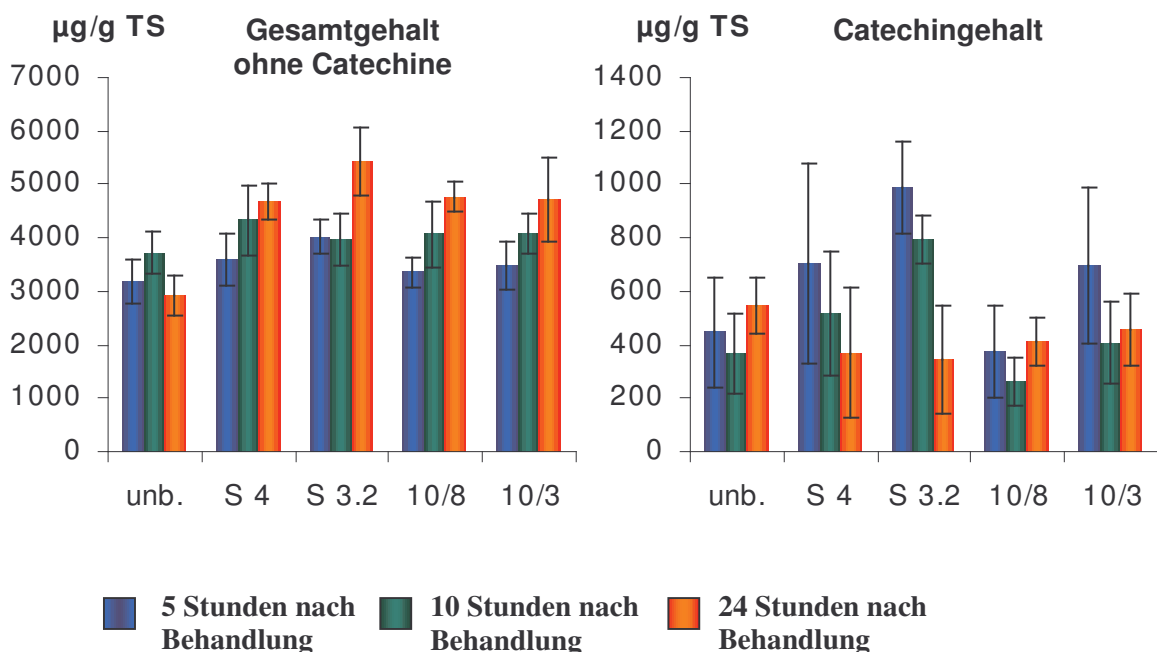


Abbildung 57 Gesamtgehalte an Phenylpropanoiden ohne Catechine und die Catechingehalte von unbehandelten und mit verschiedenen Hefeisolaten (S4, S 3.2, 10/8, 10/3) elicitierten Weinkalli der Sorte „Regent“ zu verschiedenen Entnahmetermi-  
 nen (**Versuch 3**). Mittelwerte aus Messwerten: ((Behandlung)/5/10/24 Stunden nach  
 Behandlung: (K)/8/8/8; (S4)/6/6/9; (S 3.2)/7/5/7; (10/8)/8/5/7; (10/3)/8/11/7)  $\pm$  0,5 x  
 Standardabweichung.

### 3.3.13.2 Einfache Phenole und Spektrum 2

Die einfachen Phenole wurden im Gegensatz zu den unbehandelten Kalli durch alle Hefeisolate induziert, wobei das Isolat S 3.2 am effektivsten zu sein schien (Tabelle 30). Ein ähnliches Bild ergab sich bei den Verbindungen der Gruppe Spektrum 2.

*Tabelle 29: Einfache Phenole und Verbindungen, die der Gruppe Spektrum 2 zugeordnet wurden, von unbehandelten und mit verschiedenen Hefeisolaten (S4, S 3.2, 10/8, 10/3) elicierten Weinkalli der Sorte „Regent“ zu verschiedenen Entnahmetermeninen (**Versuch 3**). Mittelwerte aus Messwerten: ((Behandlung)/5/10/24 Stunden nach Behandlung: (K)/8/8/8; (S4)/6/6/9; (S 3.2)/7/5/7; (10/8)/8/5/7; (10/3)/8/11/7)*

Stoffgruppe	Behandlung	Gehalte			S.E.		
		[µg/g Trockensubstanz]			[µg/g Trockensubstanz]		
		5 HNB	10 HNB	24 HNB	5 HNB	10 HNB	24 HNB
Einfach Phenole	keine	2179.79	2314.32	1930.11	454.82	306.92	505.84
	S 4	2720.74	2063.95	2661.49	727.06	615.46	283.7
	S 3.2	2531.78	2340.40	3018.81	230.12	372.98	590.32
	10/8	2310.96	2143.95	2903.33	317.04	649.62	350.6
	10/3	2342.95	2311.70	2546.09	650.24	559.62	932.44
Spektrum 2	keine	20.43	22.51	20.50	6.28	3.48	6.88
	S 4	25.10	31.70	34.14	8.18	6.74	6.46
	S 3.2	28.81	29.81	36.18	12.08	6.26	15.04
	10/8	23.12	30.65	25.01	4.84	9.58	6.98
	10/3	24.46	27.77	29.39	8.34	4.92	10.1

### 3.3.13.3 Phenolische Säuren

Das Gallussäure-Derivat B schien schon in der unbehandelten Variante einer Dynamik ausgesetzt zu sein, die sich in den Varianten S4 und 10/8 wiederholte (Abbildung 58). Die Konzentrationsschwankungen zwischen 5 und 24 Stunden nach der Elicitation waren bei dem Isolat S4 am deutlichsten zu erkennen. Die Gehalte von Peak B waren nach der Elicitation mit Isolat S 3.2 konstanter und befanden sich auf vergleichbaren Niveau wie bei Kalli, die mit Isolat 10/3 behandelt worden waren.

Durch Elicitationen mit den Kulturfiltraten der verschiedenen Hefeisolaten wurde das p-Cumarsäure-Derivat L innerhalb von zehn Stunden deutlich akkumuliert. Die Isolate S 3.2 und 10/8 zeigten schon fünf Stunden nach ihrer Anwendung ein leichtes Induktionsverhalten, das sich dann bis 24 Stunden nach Behandlung weiter steigerte. Das Isolat 10/3 führte zu einem Konzentrationsanstieg der Säure, der bis zehn Stunden nach Behandlung erfolgte, dann aber stagnierte.

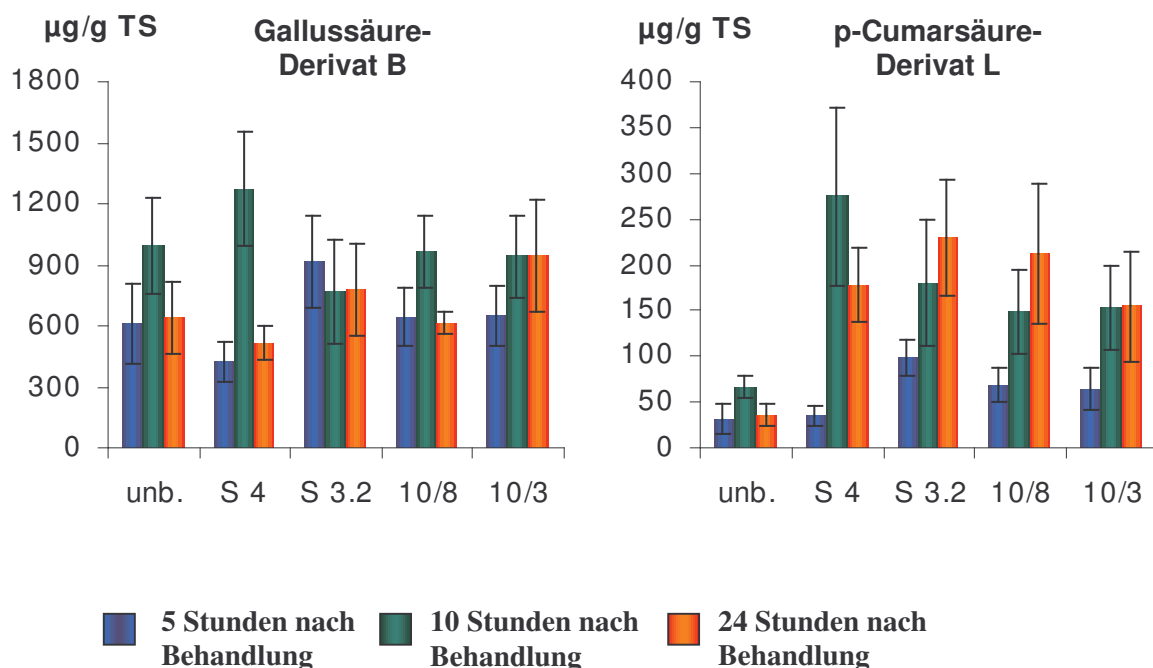


Abbildung 58: Gesamtgehalte an Gallussäurederivat Peak B und p-Cumarsäure-Derivat Peak L von unbehandelten und mit verschiedenen Hefeisolaten (S4, S 3.2, 10/8, 10/3) elicitierten Weinkalli der Sorte „Regent“ zu verschiedenen Entnahmetermen (Versuch 3). Mittelwerte aus Messwerten: ((Behandlung)/5/10/24 Stunden nach Behandlung: (K)/8/8/8; (S4)/6/6/9; (S 3.2)/7/5/7; (10/8)/8/5/7; (10/3)/8/11/7)  $\pm 0,5 \times$  Standardabweichung.

Bei Isolat S4 war innerhalb von 5 Stunden kein elicitierender Effekt erkennbar. Dieser trat dann allerdings bis 10 Stunden nach der Behandlung auf und führte zu einer deutlichen Konzentrationssteigerung. Nach dieser Elicitationszeit fiel der Gehalt an p-Cumarsäure-Derivat, nur bei der Anwendung mit diesem Isolat, wieder ab.

### 3.3.13.4 Flavonole

Die Gehalte an dem Flavonol T2 unterschieden sich fünf Stunden nach der Behandlung bei allen Isolaten nicht von denen der unbehandelten Variante (Abbildung 59). 24 Stunden nach den Behandlungen wiesen die Kalli, die mit den Isolate S4 und S 3.2 elicitiert worden waren, höhere Gehalte auf als die mit den Isolaten 10/8 und 10/3 behandelten, wobei auch letztere deutlich höhere Gehalte aufwiesen als die unbehandelten Varianten.

### 3.3.13.5 Anthocyane

Die Isolate S 3.2, 10/8 und auch tendenziell 10/3 schienen eine Dynamik in der Anthocyanidin-Synthese zu induzieren, die in der unbehandelten Variante und auch nach der Anwendung von Isolat S4 nicht festzustellen war (Abbildung 59). Dabei fiel der Gehalt 10 Stunden nach der Elicitation ab, um dann bis 24 Stunden nach der Behandlung wieder anzusteigen.

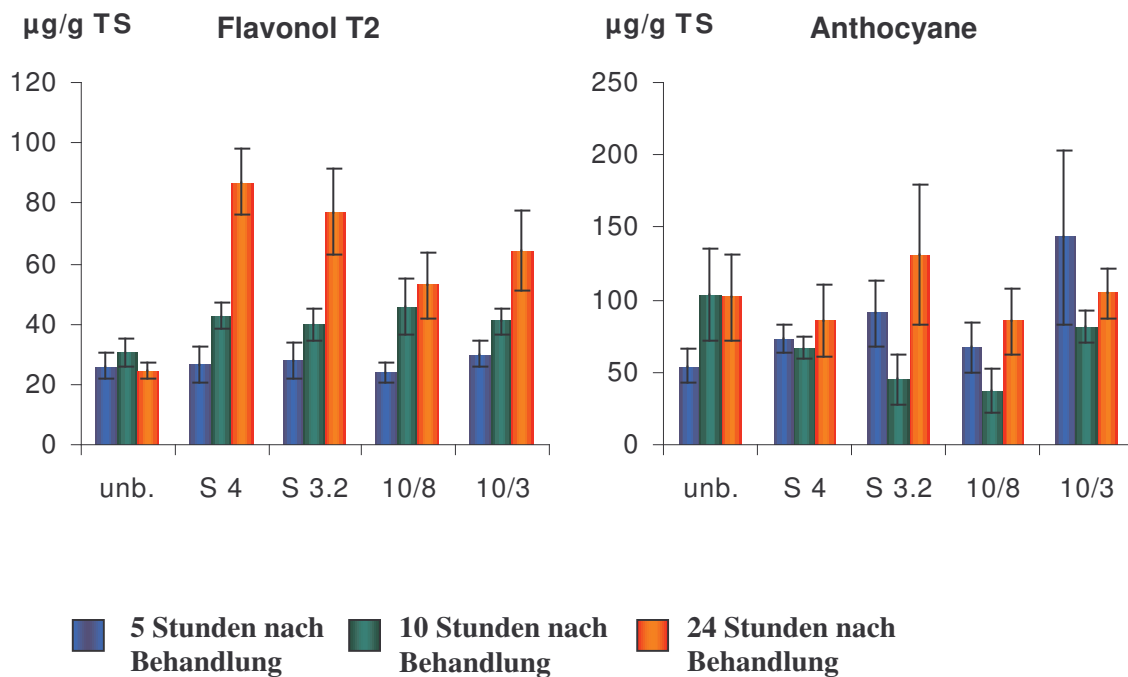


Abbildung 59: Gehalte an dem Flavonol T2 und der Anthocyane (BB+II) von unbehandelten und mit verschiedenen Hefeisolaten (S4, S 3.2, 10/8, 10/3) elicitierten Weinkalli der Sorte „Regent“ zu verschiedenen Entnahmetermi- nenen (**Versuch 3**). Mittelwerte aus Messwerten: ((Behandlung)/5/10/24 Stunden nach Behandlung: (K)/8/8/8; (S4)/6/6/9; (S 3.2)/7/5/7; (10/8)/8/5/7; (10/3)/8/11/7)  $\pm 0,5 \times$  Standardabweichung.

### 3.3.13.6 Resveratrol-Derivate

Alle Hefeisolate induzierten eine deutliche Gehaltszunahme an trans-Resveratrol (Abbildung 60). Dabei wiesen die Kalli, die mit den Isolaten S4 und S 3.2 elicitiert worden waren, 24 Stunden nach der Behandlung höhere Gehalte auf als die mit den Isolaten 10/8 und 10/3 behandelten. Das Isolat 10/8 zeigte als einziges Isolat sein Induktionsmaximum 10 Stunden nach der Behandlung, was im Vergleich mit den anderen Hefeisolaten für eine schnellere Induktion sprechen würde.

Auch die Summe der übrigen Resveratrol-Derivate erfuhr durch die Behandlungen mit allen vier Isolaten eine deutliche Induktion verglichen mit den unbehandelten Varianten (Abbildung 60). Während die Konzentrationsunterschiede zwischen den einzelnen Isolaten zehn Stunden nach den Behandlungen noch gering waren, stellten sich 24 Stunden nach der Elicitation die Isolate S4 und S 3.2 als geringfügig wirksamere Elicitoren der Resveratrol-Derivate heraus als die Isolate 10/8 und 10/3.

Auch bei der Summe der monomeren Resveratrol-Derivaten zeigte sich eine abweichende Induktionsdynamik durch das Isolat 10/8 im Vergleich zu den Isolaten S4 und S3.2 (Abbildung 61).

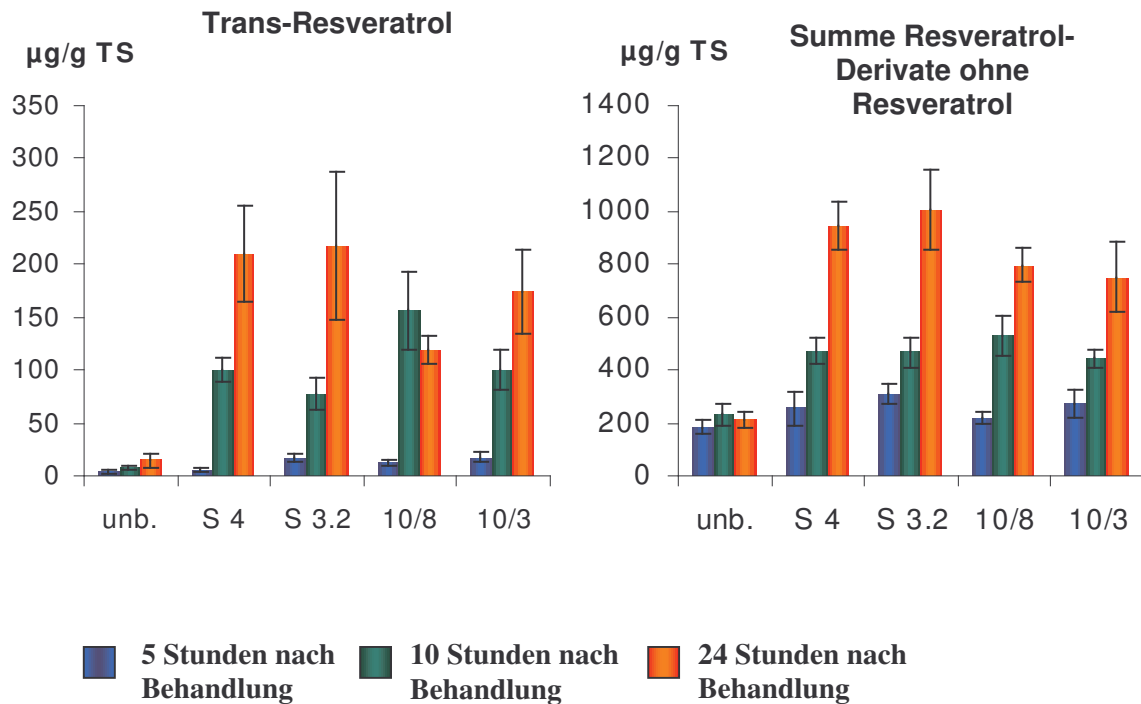


Abbildung 60: Gehalte an monomeren *trans*- und *cis*-Resveratrol-Derivaten von unbehandelten und mit verschiedenen Hefeisolaten (S4, S 3.2, 10/8, 10/3) elicitierten Weinkalli der Sorte „Regent“ zu verschiedenen Entnahmetermen (Versuch 3). Mittelwerte aus Messwerten: ((Behandlung)/5/10/24 Stunden nach Behandlung: (K)/8/8/8; (S4)/6/6/9; (S 3.2)/7/5/7; (10/8)/8/5/7; (10/3)/8/11/7)  $\pm 0,5 \times$  Standardabweichung.

Während die letzteren zwischen 10 und 24 Stunden die deutlichste Gehaltszunahme in den Kalli induzierten, akkumulierten die Kalli, die mit dem Isolat 10/8 elicitiert worden waren zwischen 5 und 10 Stunden nach der Behandlung die meisten monomeren Resveratrol-Derivate. In dieser Zeitspanne schien das Isolat S4 noch keine Akkumulation induziert zu haben. Das Isolat 10/3 nahm dabei eine Zwischenstellung ein. Die Induktionsfähigkeit der Isolate S4 und S 3.2 lag deutlich über der von 10/8 und 10/3. Ein ähnliches Bild zeichnete sich bei den monomeren *cis*-Resveratrol-Derivaten ab.

### 3.3.13.7 Pallidol-Derivate

Die Pallidol-Derivate zeigten ein ähnliches Induktionsmuster wie die monomeren Resveratrol-Derivate (Abbildung 62). Eine Verbindung, die als Pallidol-ähnliche Verbindung beschrieben wurde (Peak CC), akkumulierte sehr schnell nach einer Induktion mit den Hefefiltraten außer mit Isolat 10/8. Dieses Hefeisolat induzierte zu keinem Entnahmetermen den Gehalte von Peak CC. Bei den andern drei Isolaten war eine Zunahme des Gehaltes innerhalb von fünf Stunden nach der Behandlung festzustellen, der dann aber bis 24 Stunden nach Behandlung auf das Niveau der unbehandelten Variante zurückfiel.

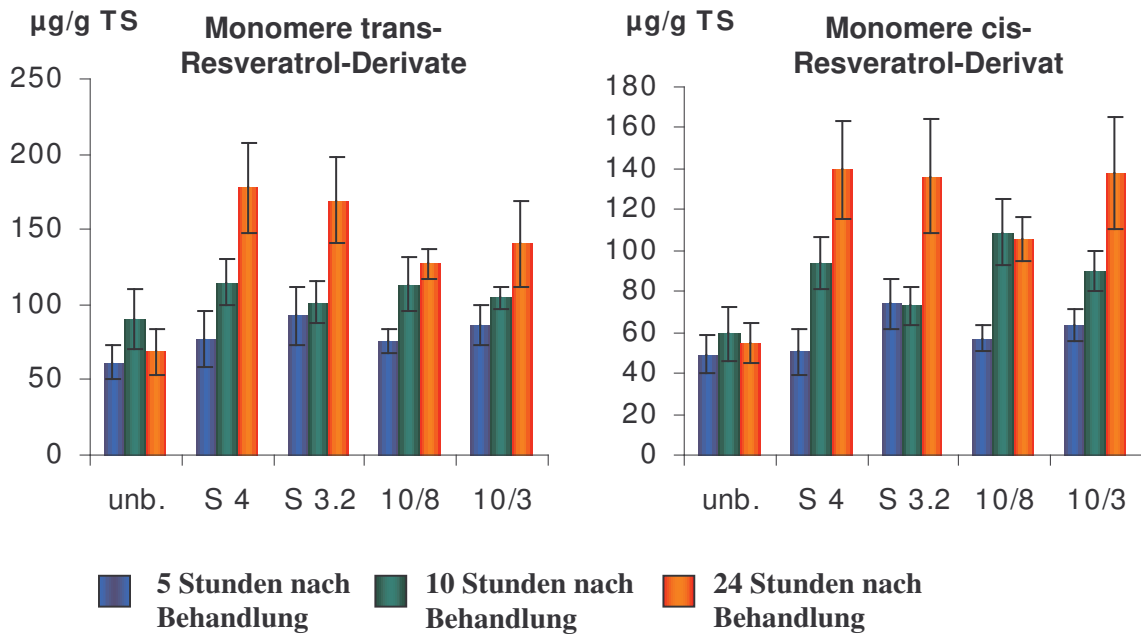


Abbildung 61: Gehalte an monomeren trans- und cis-Resveratrol-Derivaten von unbehandelten und mit verschiedenen Hefeisolaten (S4, S 3.2, 10/8, 10/3) elicitierten Weinkalli der Sorte „Regent“ zu verschiedenen Entnahmetermi- nen (**Versuch 3**). Mittelwerte aus Messwerten: ((Behandlung)/5/10/24 Stunden nach Behandlung: (K)/8/8/8; (S4)/6/6/9; (S 3.2)/7/5/7; (10/8)/8/5/7; (10/3)/8/11/7)  $\pm 0,5 \times$  Standardabweichung.

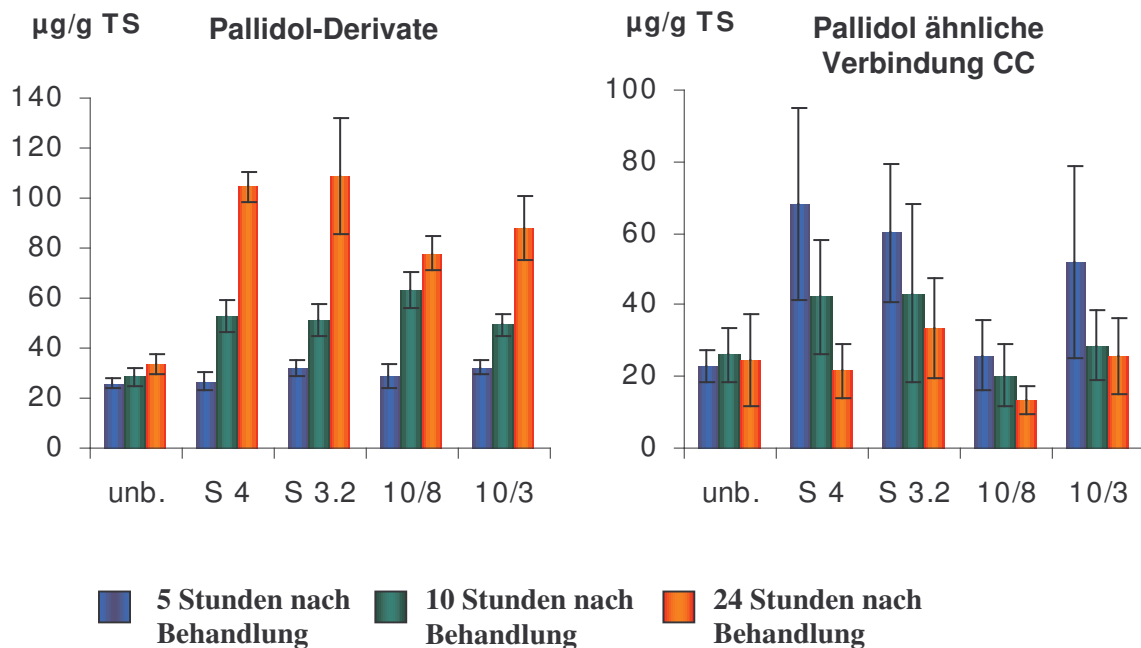


Abbildung 62: Gehalte an Pallidol-Derivaten und der Pallidol-ähnlichen Verbindung CC von unbehandelten und mit verschiedenen Hefeisolaten (S4, S 3.2, 10/8, 10/3) elicitierten Weinkalli der Sorte „Regent“ zu verschiedenen Entnahmetermi- nen (**Versuch 3**). Mittelwerte aus Messwerten: ((Behandlung)/5/10/24 Stunden nach Behandlung: (K)/8/8/8; (S4)/6/6/9; (S 3.2)/7/5/7; (10/8)/8/5/7; (10/3)/8/11/7)  $\pm 0,5 \times$  Standardabweichung.

Eine Tendenz zur Gehaltsreduktion mit steigender Elicitationszeit, war auch bei Isolat 10/8 festzustellen, jedoch blieb die vorherige Akkumulation aus. Bei dieser Verbindung wurde starke Streuungen festgestellt, die in einer, die Flächen- und somit auch die Konzentrations-Auswertung negativ beeinflussenden, chromatographischen Nähe zu Peak DD begründet liegen könnten.

### **3.3.13.8 Oligomere Resveratrol-Derivate**

Alle Hefe-Isolate führten zu einer deutlichen Akkumulation der oligomeren trans-Resveratrol-Derivate. Dabei scheinen die Isolate S 3.2 und S4 die höchste Akkumulation, das Isolat 10/3 eine geringere Gehaltserhöhung zu induzieren (Abbildung 63). Das Isolat 10/8 nahm dabei eine Zwischenstellung ein. Unterschiede in der Dynamik durch die verschiedenen Isolate konnten in dieser Stoffgruppe nicht festgestellt werden.

Bei den oligomeren cis-Resveratrol-Derivaten ergab sich ein etwas anderes Bild. Bei dieser Stoffgruppe zeigte das Isolat S4 eine stärkere Induktionsfähigkeit als das Isolat S 3.2, obwohl dieses den höheren Gehalt an oligomeren trans-Derivaten aufwies. Auffallend war hierbei die verminderte Gehaltszunahme der mit Isolat S 3.2 behandelten Kalli zwischen 10 und 24 Stunden nach der Elicitation.

Die Gehalte der oligomeren trans-/cis-Resveratrol-Derivate wurden von den Isolaten S3.2, S4 und 10/8 etwa gleich stark induziert, während das Isolat 10/3 etwas abgeschwächt induzierte.

### **3.3.14 Stoffgruppenverteilung gegenüber dem Gesamtgehalt**

Da die Gesamtgehalte der Phenylpropanoide durch Elicitation mit Hefefiltrat erhöht waren, die Kalli also vermehrt Sekundärverbindungen synthetisierten, war es wichtig zu erfahren, in wie weit sich die Stoffzusammensetzung in den Zellen durch eine Elicitation verändert. Die anteilmäßigen Stoffgruppengehalte gegenüber dem Gesamtgehalt der Phenylpropanoide veränderten sich durch die Behandlungen mit den Hefeisolaten gegenüber den unbehandelten Kalli, variierten jedoch nur wenig innerhalb der Behandlungen mit den verschiedenen Hefeisolaten. Dazu sind in Abbildung 64 bis 66 die Stoffverteilungen von unbehandelten und mit den Kulturfiltraten der verschiedenen Hefestämmen elicitierten Kalli zu den Entnahmetermen 5, 10 und 24 Stunden nach den Behandlungen dargestellt.

5 Stunden nach einer Behandlung mit den Hefefiltraten sahen die Stoffverteilungen von elicitierten und unbehandelten Kalli sehr ähnlich aus (Abbildung 64). Bei der unbehandelten Varianten machten 4% des Gesamtgehaltes die Resveratrol-Derivate aus, bei den Hefe behandelten Varianten 5%. Der Anteil an einfachen Phenolen lag sowohl bei der unbehandelten Variante als auch bei den mit den Isolaten S4 und 10/8 elicitierten Kalli zwischen 60 und 61%, der von 10/3 bei 55% und der von S 3.2 bei 49%. Die unbehandelten

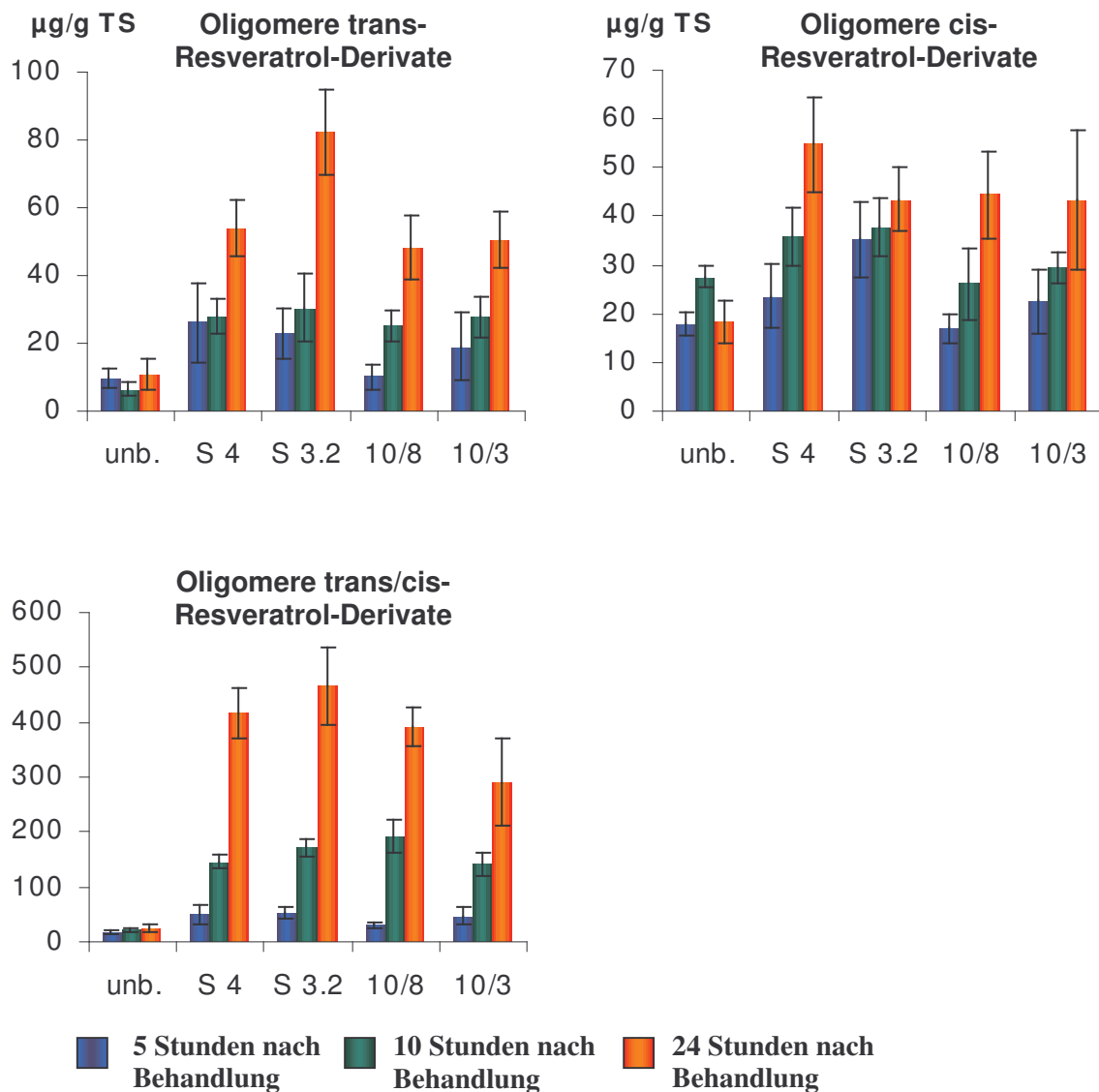


Abbildung 63: Gehalte oligomerer trans- und cis- sowie nicht zu trennende Mischvarianten beider isomeren Resveratrol-Derivate von unbehandelten und mit verschiedenen Hefeisolaten (S4, S 3.2, 10/8, 10/3) elicierten Weinkalli der Sorte „Regent“ zu verschiedenen Entnahmetermen (Versuch 3). Mittelwerte aus Messwerten: ((Behandlung)/5/10/24 Stunden nach Behandlung: (K)/8/8/8; (S4)/6/6/9; (S 3.2)/7/5/7; (10/8)/8/5/7; (10/3)/8/11/7)  $\pm 0,5 \times$  Standardabweichung.

Kalli investierten 12% in die Catechin-Synthese, die Isolate S4 und 10/3 lagen mit 16% nahe an der Kontrolle. Das Isolate S 3.2 induzierte 20% des Gesamtgehaltes in Catechine, das Isolat 10/8 führte zu einer Reduktion des Catechingehaltes auf 10%. Die Erhöhung des Catechingehaltes durch Isolat S4 ist mit einer anteilmäßigen Reduktion der Benzoesäuren, deren Hauptvertreter das Gallussäure-Derivat B ist, verbunden. Die vermehrte Synthese der Catechine durch Isolat S 3.2, schien durch einen verminderten Gehalt an einfachen Phenolen ausgeglichen zu werden. Der Gehalt an phenolischen Säuren blieb anteilmäßig mit der Kontrolle identisch. Isolat 10/3 schien ähnliche Umverteilungen auszulösen.



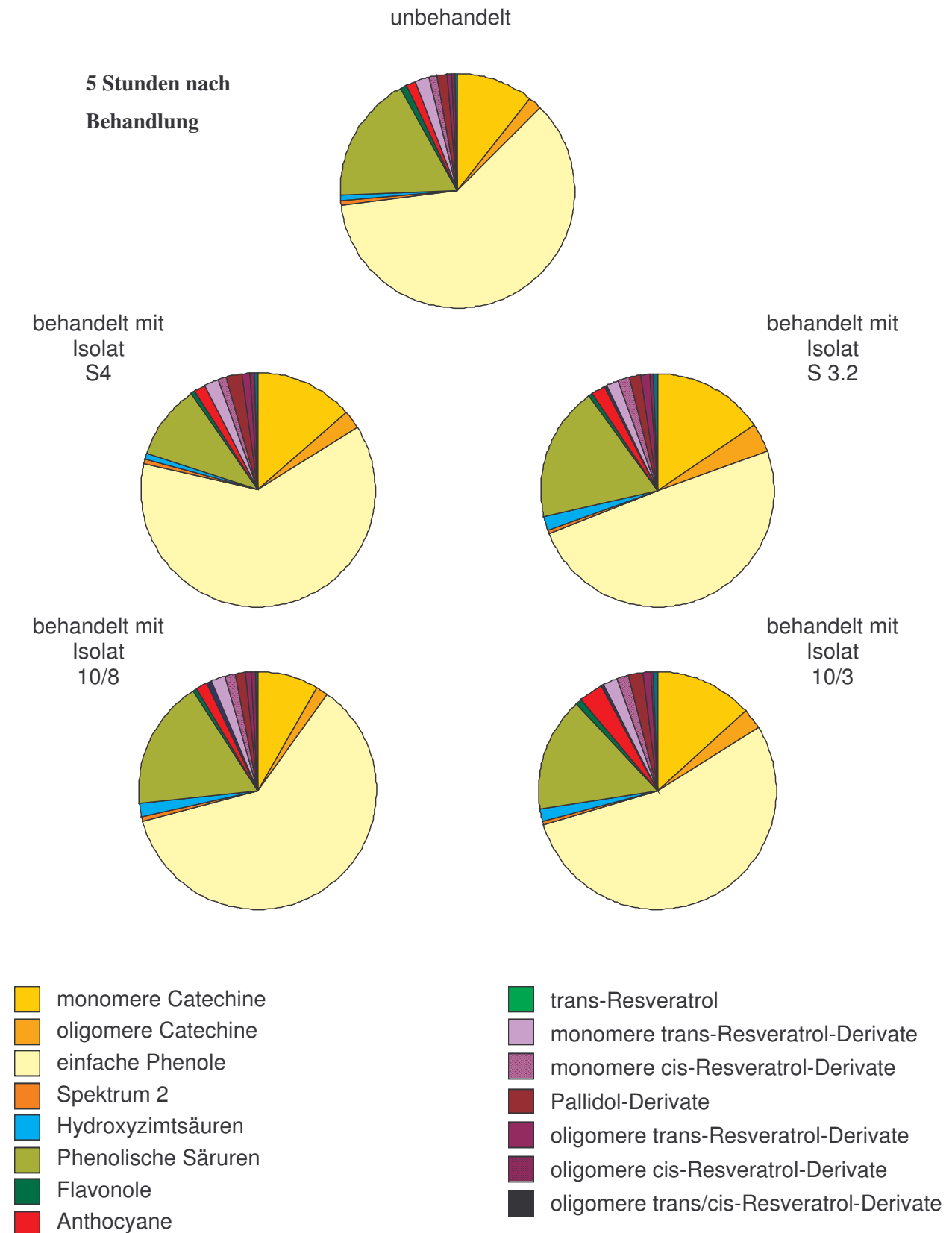


Abbildung 64: Stoffgruppenverteilung 5 Stunden nach der Behandlung von unbehandelten und mit verschiedenen Hefeisolaten (S4, S 3.2, 10/8, 10/3) elicierten Weinkalli der Sorte „Regent“ (**Versuch 3**). Mittelwerte aus Messwerten: (Behandlung/ Anzahl der Messwerte): (unbehandelt) / 8; (S4) / 6; (S 3.2) / 7; (10/8) / 8; (10/3) / 8.

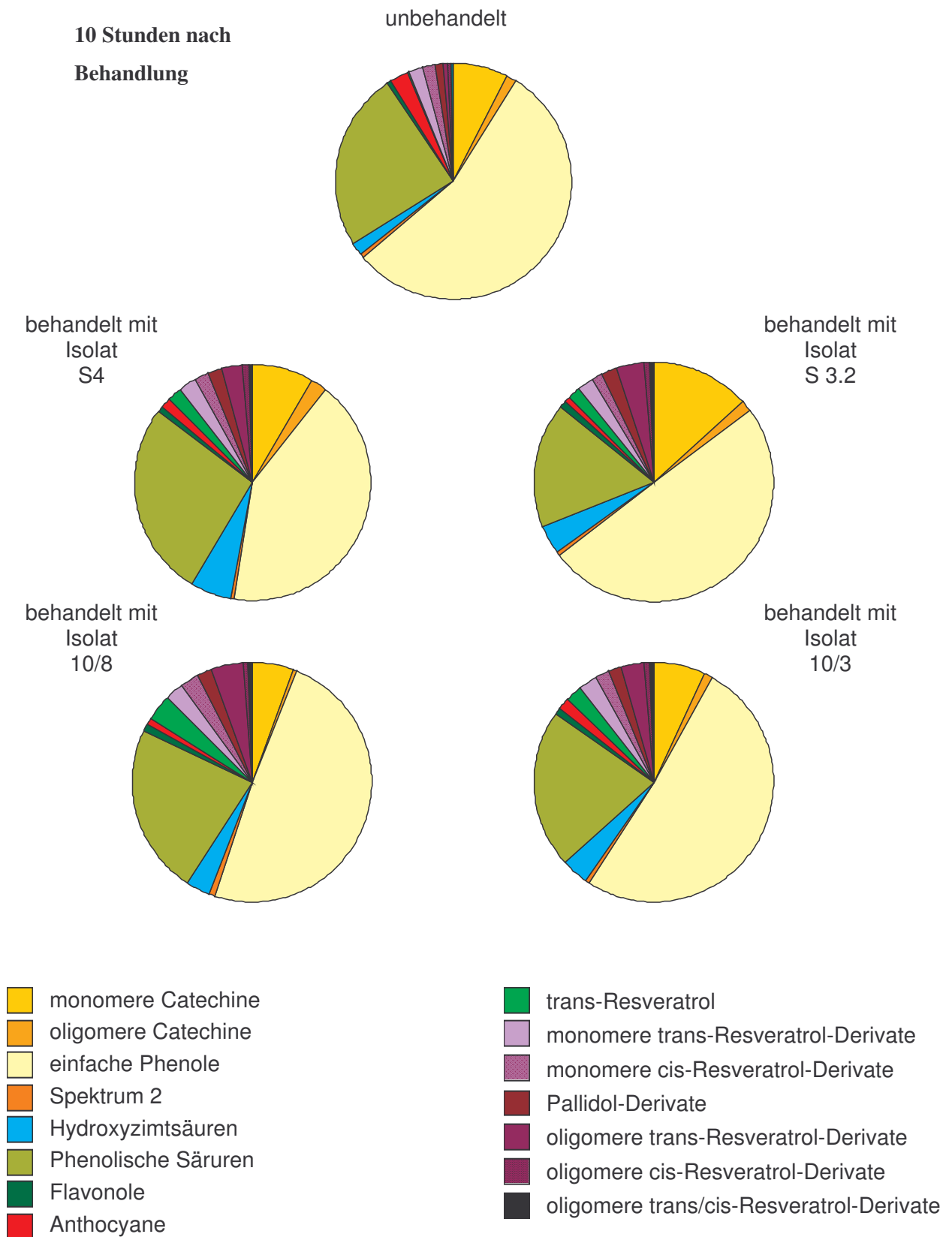


Abbildung 65: Stoffgruppenverteilung 10 Stunden nach der Behandlung von unbehandelten und mit verschiedenen Hefeisolaten (S4, S 3.2, 10/8, 10/3) elicitierten Weinkalli der Sorte „Regent“ (Versuch 3). Mittelwerte aus Messwerten: (Behandlung/ Anzahl der Messwerte): (unbehandelt) /8; (S4) / 6; (S 3.2) / 5; (10/8) / 5; (10/3) / 11.

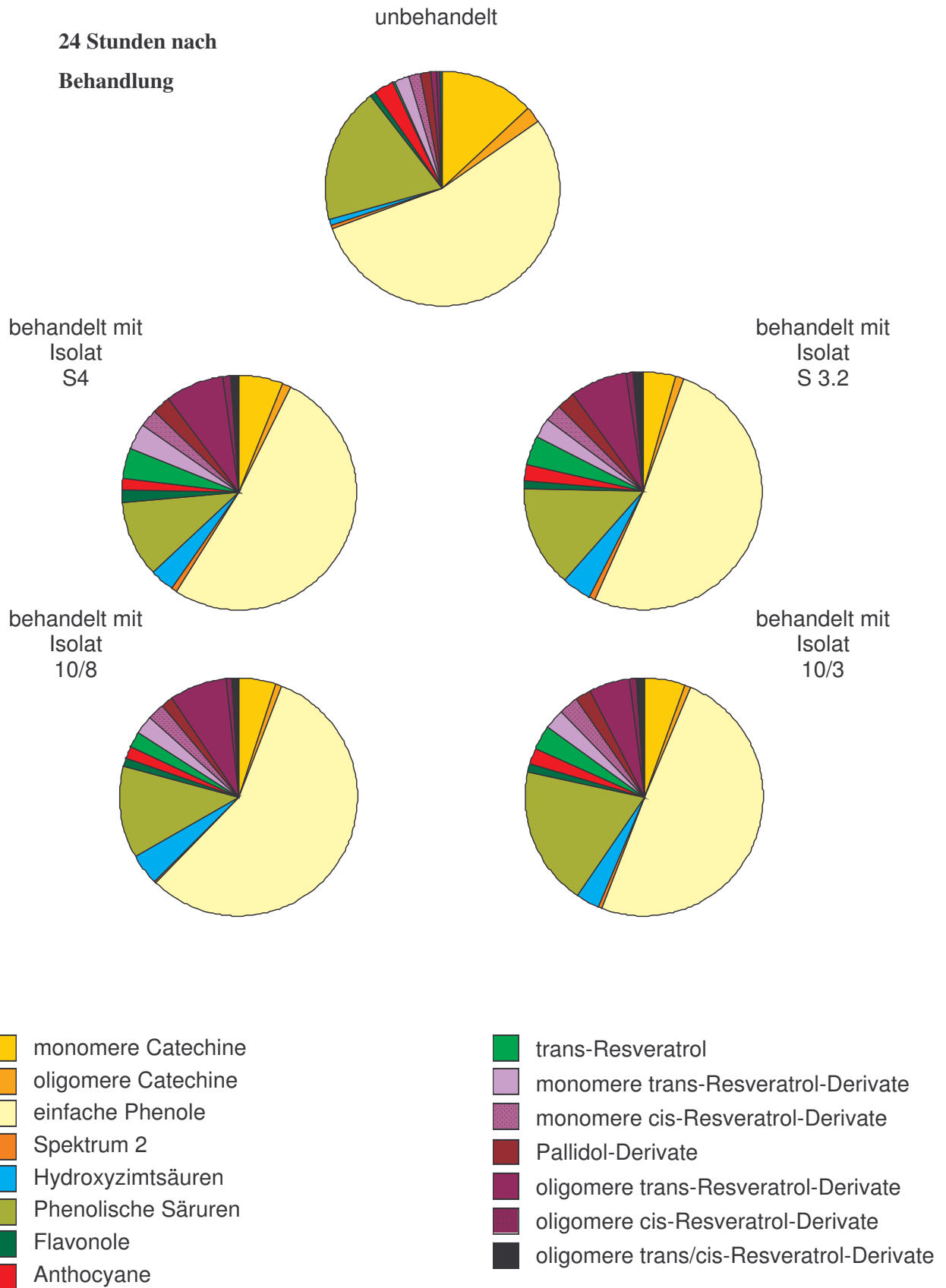


Abbildung 66: Stoffgruppenverteilung 10 Stunden nach der Behandlung von unbehandelten und mit verschiedenen Hefeisolaten (S4, S 3.2, 10/8, 10/3) elicitierten Weinkalli der Sorte „Regent“ (**Versuch 3**). Mittelwerte aus Messwerten: (Behandlung/ Anzahl der Messwerte): (unbehandelt) /8; (S4) / 9; (S 3.2) / 7; (10/8) / 7; (10/3) / 7.

10 Stunden nach der Elicitation wurde in den Kalli die anteilige Zunahme der Hydroxyzimtsäuren, sprich des p-Cumarsäure-Derivates L, durch die Elicitation mit den Kulturfiltraten der verschiedenen Hefestämmen deutlich induziert (Abbildung 65). Auch konnte ein erhöhter Anteil an trans-Resveratrol festgestellt werden, der bei den Isolaten S4, S3.2 und 10/3 bei 2% des Gesamtgehaltes lagen. Das Isolat 10/8 hatte zu diesem Zeitpunkt schon 4% trans-Resveratrol induziert.

Anteilmäßig investierten die elicitierten Kalli bei allen Hefeisolate ähnlich viel in Resveratrol-Derivate (10/8: 16%, S4, S 3.2 je 13% und 10/3 12%). Dabei wiesen, die mit S4, S 3.2 und 10/3 induzierten Kalli, Anteile an trans-Resveratrol, monomeren trans-Resveratrolen, monomeren cis-Resveratrolen und Pallidol-Derivate von jeweils bis zu 2% am Gesamtgehalt auf. Durch eine Behandlung mit Isolat 10/8 erhöhten sich die Anteile auf 4%, 3%, 3% respektive 2%.

Die mit den Isolaten S4 und 10/8 elicitierten Kalli wiesen, bei gleichzeitigem Anstieg an Resveratrol-Derivaten, einen reduzierten Anteil an einfachen Phenolen auf. Die Anteile an einfachen Phenolen in den mit den Isolaten S 3.2 und 10/3 elicitierten Kalli blieben weitgehend unverändert. Die Anwendung von Isolat S 3.2 führte 10 Stunden nach der Behandlung zu einer anteilmäßigen Reduktion an phenolischen Säuren. Bei allen Isolaten ist eine Reduktion der Anthocyane festzustellen.

24 Stunden nach Elicitation der Weinkalli mit den Kulturfiltraten der verschiedenen Hefeisolaten konnte ein weiterer anteiliger Anstieg an Resveratrol-Derivate festgestellt werden (Abbildung 66). Während bei der unbehandelten Variante fast kein trans-Resveratrol in den Kalli zu finden war, lagen die trans-Resveratrol-Anteile der Kalli, die mit dem Isolat 10/8 elicitiert worden waren, bei 2%, sowie bei den mit Isolat 10/3 behandelten bei 3% sowie mit den Isolaten S4 und S 3.2 bei 4%.. Alle Isolate induzierten bei gleichbleibenden Anteilen an monomeren und dimeren Resveratrol-Derivaten die Synthese von oligomeren trans-Resveratrol-Derivaten, die durch die Isolate S4, 10/8 und S 3.2 auf jeweils 8% und durch Isolat 10/3 auf 6% angehoben wurden. Die unbehandelten Kalli wiesen hingegen nur 1% oligomere trans-Resveratrol-Derivate auf. Auffallend war auch der parallel zur Elicitation mit den Hefefiltraten einhergehende, abnehmende Anteil an Catechinen. Während der Catechinanteil in der unbehandelten Variante rund 15% des Gesamtgehalts betrug, verminderte sich der Anteil durch eine Elicitation mit Hefeisolat S4 auf 7%, mit S 3.2 auf 5% sowie mit 10/8 und 10/3 auf je 6%.

Auch der Anteil an phenolischen Säuren wird, anders als in der unbehandelten Variante, zu Gunsten der Resveratrol-Derivate durch Isolat S4 von ursprünglich 18% auf 11, durch Isolat S 3.2 auf 14 und durch Isolat 10/8 auf 13% reduziert.

Da sich der Anteil an phenolischen Säuren bei der mit dem Isolat 10/3 elicitierten Variante mit 19% nahe an der unbehandelten Variante bewegte, diese Kalli aber gleichzeitig auch den

geringsten Anteil an oligomeren trans-Resveratrol-Derivaten synthetisierten, schienen sie ihre vermehrte Stilben-Synthese durch einen verminderten Gehalt an einfachen Phenolen und Catechinen abzudecken.

### 3.3.15 Einfluss der Stickstoffverfügbarkeit auf die Biomassenproduktion von Weinkalli

Die Stickstoffverfügbarkeit hat direkte Auswirkungen auf den Primär- und Sekundärstoffwechsel der Pflanzen. Die Wechselwirkungen zwischen dem Stickstoff und dem Primärstoffwechsel im Versuchssystem der Weinkallus-Kultur konnte in Versuch 1 durch die Darstellung der unterschiedlichen Biomassen in Abhängigkeit vom Stickstoffangebot im Medium aufgezeigt werden (Abbildung 67).

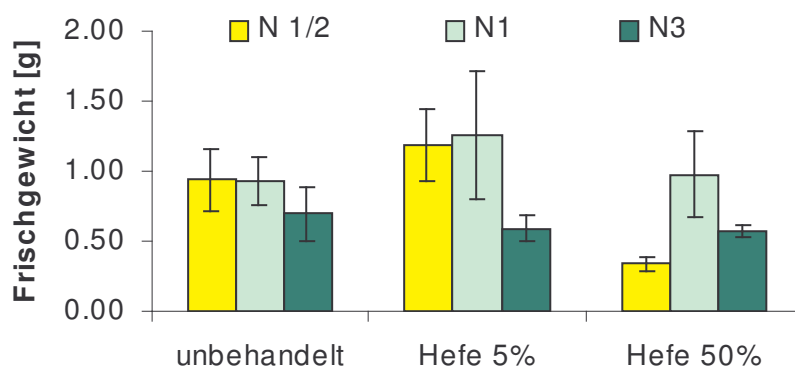


Abbildung 67: Frischgewichtsverteilung von unbehandelten und mit zwei verschiedenen Konzentrationen Hefefiltrat (5% und 50%) elicitierten Weinkalli der Sorte „Regent“ (**Versuch 1**). Mittelwerte aus Messwerten  $\pm 0,5 \times$  Standardabweichung.: Bei den unbehandelte Varianten sind alle Entnahmetermine vereint (N $\frac{1}{2}$ : 35; N1: 31; N3: 30); bei den mit Hefefiltrat behandelten Varianten wurde jeweils die 48 Stunden Variante verwendet (Hefe 5%: (N $\frac{1}{2}$ : 10; N1: 9; N3: 6); Hefe 50%: (N $\frac{1}{2}$ : 8; N1: 6; N3: 7). Jeder Messwert beinhaltet 5 Kalli.

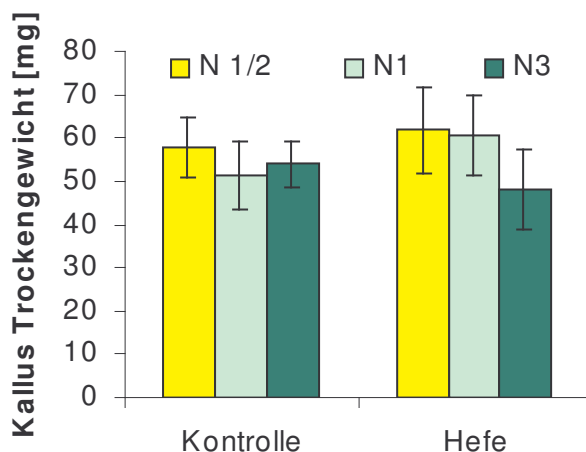


Abbildung 68: Kallus Trockengewicht von unbehandelten und mit Hefefiltrat elicitierten Weinkalli der Sorte „Regent“ (**Versuch 2**). Mittelwerte aus Kalli: unbehandelt (N $\frac{1}{2}$ : 6; N1: 8; N3: 8); mit Hefefiltrat elicitiert (N $\frac{1}{2}$ : 8; N1: 6; N3: 8);  $\pm 0,5 \times$  Standardabweichung.

Dabei wird im weiteren, die N1-Variante als normal-, die N $\frac{1}{2}$ -Variante als minder- und die N3-Variante als Stickstoff überversorgte Variante bezeichnet.

Der negative Einfluss der verminderten Stickstoffverfügbarkeit im Medium der N $\frac{1}{2}$ -Variante auf die Biomassenproduktion der Kalli war im Vergleich zu der optimal versorgten N1-Variante nur sehr gering. Diese gleich große Biomassenproduktion bei beiden N-Varianten in Versuch 1 (Abbildung 67) konnte auch bei den mit 5% Hefefiltrat elicitierten Kalli beobachtet werden. Die Biomassenproduktion der Weinkalli, die auf dem N1-Medium kultiviert wurden, blieb durch die Behandlungen mit Hefefiltrat unbeeinflusst. Bei den auf N $\frac{1}{2}$ -Medium gewachsenen Kalli, die mit 50% Hefefiltrat behandelt worden waren, war 48 Stunden nach der Behandlung, ein deutlich geringeres Frischgewicht zu verzeichnen als bei den N1- versorgten Kalli. Die 5% Filtratbehandlung zeigte diesen Effekt jedoch nicht.

Ein erhöhtes Stickstoffangebot mit einer Konzentration, wie sie die N3-Variante beinhaltet, bewirkte im Vergleich zur N1-Variante eine Reduktion der Biomassenproduktion. Dieser reduzierende Einfluss wird auch bei den mit Hefefiltrat elicitierten Kalli deutlich. Auch in Versuch 2 (Abbildung 68) zeigten die N3-versorgten Kalli 48 Stunden nach einer Elicitation mit Hefefiltrat ein vermindertes Trockengewicht, wohingegen die unbehandelten Kalli hinsichtlich Biomassenproduktion nur geringfügig auf unterschiedliche Stickstoffangebote reagierten.

### **3.3.16 Einfluss der Stickstoffverfügbarkeit auf den Phenylpropanoid-Stoffwechsel von Weinkalli**

#### **3.3.16.1 Gesamtgehalt der Phenylpropanoide**

Die Stickstoffverfügbarkeit im Medium hatte aber nicht nur Einfluss auf den Primärstoffwechsel der Weinkalli, sondern auch auf den Sekundärwechsel und somit auf die Konzentrationen der löslichen Phenylpropanoide. Der Einfluss der Stickstoffverfügbarkeit auf die Akkumulation der verschiedenen Verbindungen kann sehr unterschiedlich sein. Sowohl ein vermindertes Stickstoffangebot (N $\frac{1}{2}$ ) als auch ein übermäßiges Angebot (N3) induzierten in den unbehandelten Kalli von Versuch 1 (Abbildung 69A) eine Gehaltszunahme an Phenylpropanoiden. Eine Behandlung mit einer geringen Elicitorkonzentration führte 48 Stunden nach der Behandlung mit steigendem Stickstoffangebot zu einer stetigen Akkumulation der Gesamtphenole. Nach einer Erhöhung der Elicitorkonzentration auf 50%, schwächte sich dieser Effekt ab, die Akkumulationssprünge zwischen den einzelnen N-Stufen wurden geringer, aber die Tendenz blieb erhalten. Die Gehalte an Gesamtphenolen der minderversorgten Stickstoff-Varianten (N $\frac{1}{2}$ ) wurden durch eine Elicitation mit Hefefiltrat nicht induziert, bei 5% Hefefiltrat wurden sie sogar eher gehemmt. Allerdings erfuhren die optimal bis überversorgten Varianten eine deutliche Anreicherung. Der Gehalt an Gesamtphenolen der Kalli in Versuch 2 (Abbildung 69B) wurde bei der unbehandelten

Variante durch die verschiedenen Stickstoffverfügbarkeiten nur unmerklich beeinflusst, wobei eine Tendenz zur Akkumulation bei Stickstoffüberschuss erkennbar war. Eine optimale Stickstoffversorgung durch die Kultur auf dem N1-Medium in Kombination mit einer Elicitation mit Hefefiltrat führte zu einer stärkeren Akkumulation der Gesamtphenole als bei der Kultur auf N $\frac{1}{2}$ - oder N3-Medien.

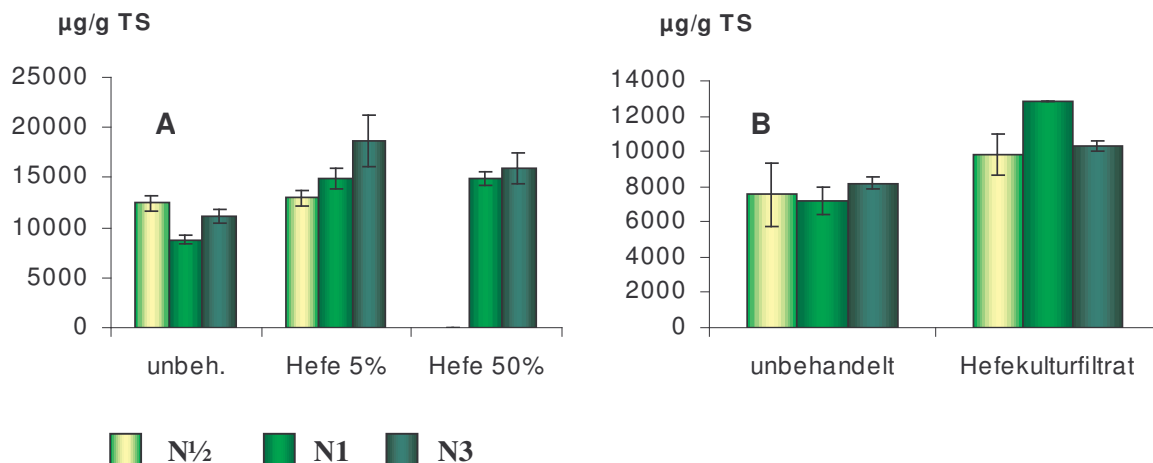


Abbildung 69: Gehalt an Gesamt-Phenylpropanoiden von unbehandelten und **A** mit zwei verschiedenen Konzentrationen Hefefiltrat (5% und 50%) elicitierten Weinkalli der Sorte „Regent“ (**Versuch 1**) 48 Stunden nach der Behandlung sowie **B** mit Hefefiltrat behandelten Weinkalli der Sorte „Regent“ (**Versuch 2**) 48 Stunden nach der Behandlung. Mittelwerte aus Messwerten: Versuch 1: unbehandelt (N $\frac{1}{2}$ : 4; N1: 3; N3: 4), Hefe 5% (N $\frac{1}{2}$ : 2, N1: 2, N3: 3), Hefe 50% (N $\frac{1}{2}$ : 1, N1: 3, N3: 4); Versuch 2: unbehandelt (N $\frac{1}{2}$ : 2, N1: 2, N3: 3), Hefefiltrat (N $\frac{1}{2}$ : 3, N1: 2, N3: 3);  $\pm 0,5 \times$  Standardabweichung.

### 3.3.16.2 Catechine

Auch die Catechine in Versuch 1 reagierten auf ein vermindertes bzw. erhöhtes Stickstoffangebot (N $\frac{1}{2}$  und N3) im Vergleich zu optimalversorgten (N1) Kalli mit einer Stoffakkumulation (Abbildung 70). Trotz der schon beschriebenen starken Stoffdynamik der Catechine ist dieser Zusammenhang sowohl bei dem 24 als auch bei dem 48 Stunden Entnahmeterrin zu erkennen. Eine Elicitation mit Hefefiltrat führte zu einer Umkehrung des Stickstoffeinflusses. Bei einer Elicitorkonzentration von 5% wiesen die Kalli sowohl 24 als auch 48 Stunden nach der Behandlung höhere Gehalte an Catechinen auf als die beiden anderen Stickstoffvarianten. Eine auf 50% gesteigerte Elicitorkonzentration zeigte diese Stoffakkumulation mit einer Verzögerung von 24 Stunden. Wie schon bei den Gesamtphenolen zeigten auch die Catechine der N $\frac{1}{2}$ -versorgten Kalli keine akkumulierende Reaktion auf eine Elicitorbehandlung, die N1-versorgten Kalli hingegen zeigte diese deutlich. Die N3 versorgte Variante nahm eine Mittelstellung ein.

In Versuch 2 konnte bei den unbehandelten Kalli keine Konzentrationsveränderung der Catechine durch unterschiedliches Stickstoffangebot im Medium festgestellt werden.

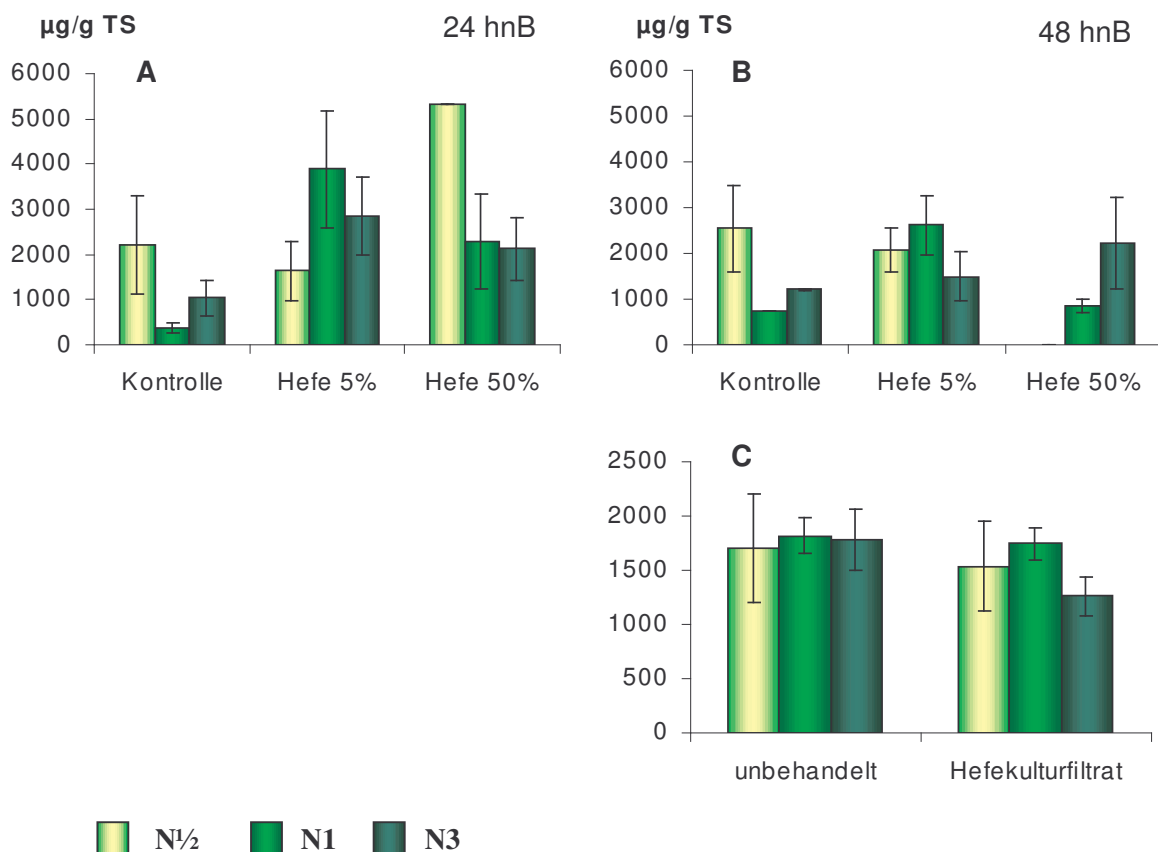


Abbildung 70: Gehalt an Catechinen von unbehandelten und **A, B** mit zwei verschiedenen Konzentrationen Hefefiltrat (5% und 50%) elicitierten Weinkalli der Sorte „Regent“ (**Versuch 1**) **A** 24 Stunden **B** 48 Stunden nach der Behandlung; **C** mit Hefefiltrat behandelten Weinkalli der Sorte „Regent“ (**Versuch 2**) 48 Stunden nach der Behandlung. Mittelwerte aus Messwerten: Versuch 1: unbehandelt (N $\frac{1}{2}$ : 4; N1: 3; N3: 4), Hefe 5% (N $\frac{1}{2}$ : 2, N1: 2, N3: 3), Hefe 50% (N $\frac{1}{2}$ : 1, N1: 3, N3: 4); Versuch 2: unbehandelt (N $\frac{1}{2}$ : 2, N1: 2, N3: 3), Hefefiltrat (N $\frac{1}{2}$ : 3, N1: 2, N3: 3);  $\pm 0,5 \times$  Standardabweichung.

48 Stunden nach der Elicitation mit Hefefiltrat war bei den Kalli, die auf dem N3-Medium gewachsen waren, ein verminderter Gehalt an Catechinen zu erkennen. Bei den normal versorgten Kalli schien eine Elicitation keinen Einfluss auf den Catechin-Gehalt zu nehmen.

### 3.3.16.3 Einfache Phenole und Verbindungen der Stoffgruppe Spektrum 2

Die einfachen Phenole in Versuch 1 (Abbildung 71) wurden sowohl in den unbehandelten als auch in den elicitierten Kalli durch eine übermäßiges Stickstoffangebot im Medium deutlich akkumuliert. Die Gehalte der Kalli, die auf einem Medium mit vermindertem Stickstoffangebot kultiviert worden waren, unterschieden sich kaum von denen mit einem optimalen Stickstoffangebot. Auch in Versuch 2 war zu erkennen, dass mit steigendem Stickstoffangebot im Medium der Gehalt an einfachen Phenolen deutlich zunahm (Abbildung 72).



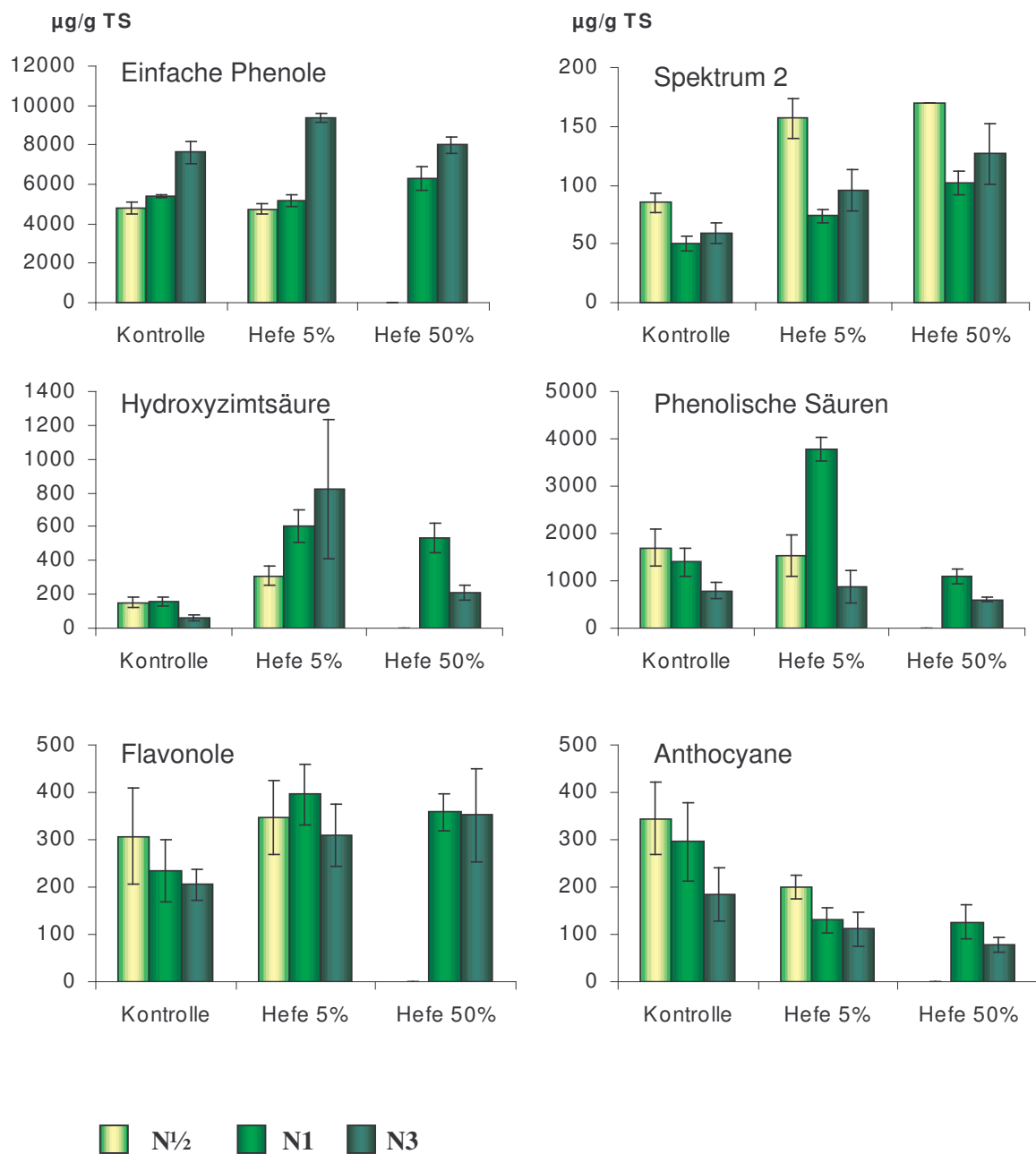


Abbildung 71: Einfache Phenole, Spektrum 2, Hydroxyzimtsäuren, Benzoessäuren, Flavonole und Anthocyane von unbehandelten und mit zwei verschiedenen Konzentrationen Hefefiltrat (5% und 50%) elicitierten Weinkalli der Sorte „Regent“ (Versuch1) 48 Stunden nach der Behandlung. Mittelwerte aus 3–6 Messwerten  $\pm 0,5 \times$  Standardabweichung

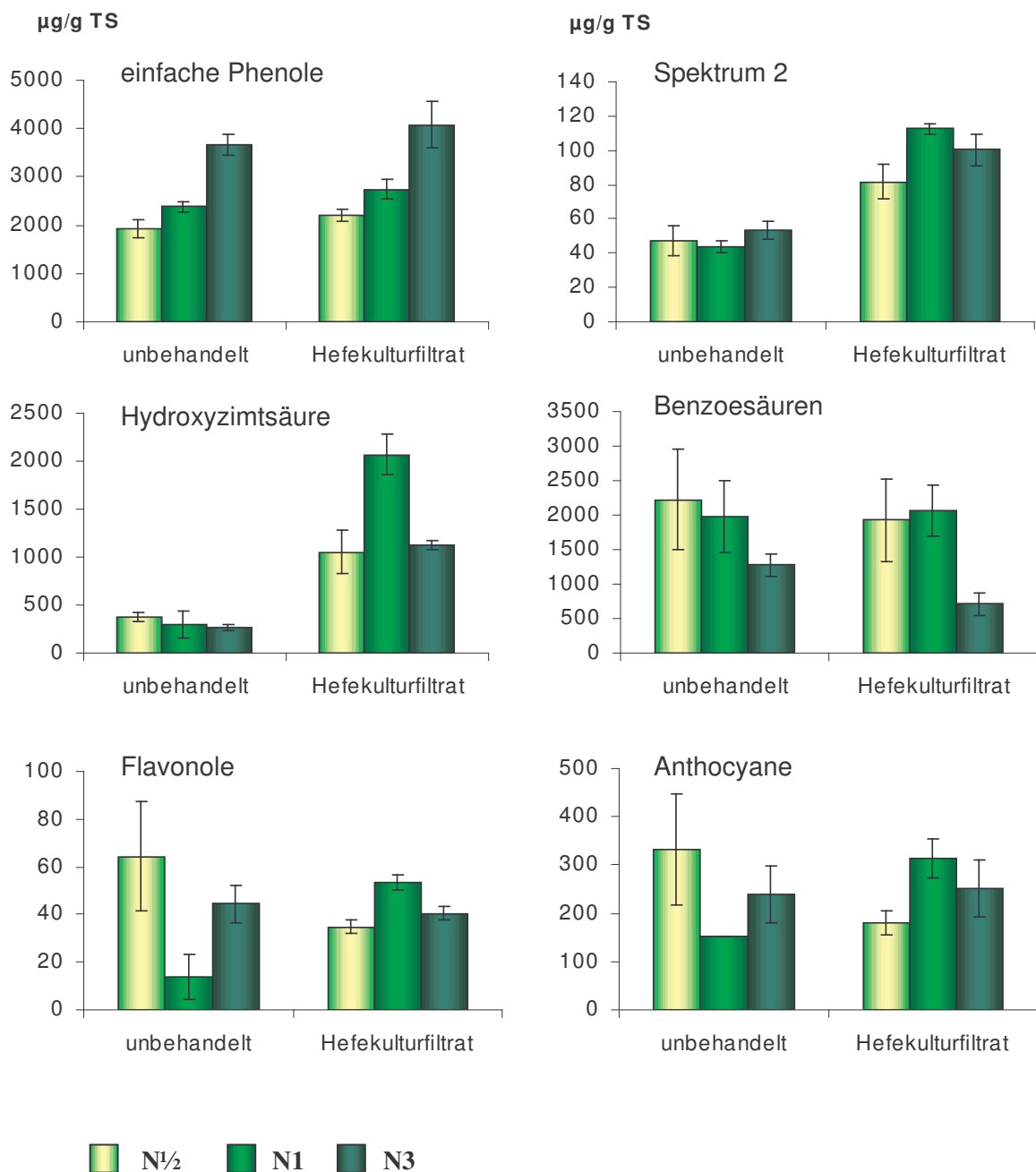


Abbildung 72: einfache Phenole, Spektrum 2, Hydroxyzimtsäuren, Benzoessäuren, Flavonole und Anthocyane von unbehandelten und mit Hefefiltrat behandelten Weinkalli der Sorte „Regent“ (**Versuch 2**) 48 Stunden nach der Behandlung. Mittelwerte aus Messwerten: unbehandelt ( $N_{1/2}$ : 2,  $N_1$ : 2,  $N_3$ : 3), Hefefiltrat ( $N_{1/2}$ : 3,  $N_1$ : 2,  $N_3$ : 3);  $\pm 0,5 \times$  Standardabweichung.

Die Gehalte der Verbindungen, die der Gruppe Spektrum 2 zugeordnet wurden, verhielten sich in Versuch 1 entgegengesetzt zu den einfachen Phenole und wurden durch N-Mangel deutlich induziert. Diese durch Stickstoff hervorgerufene Induktion wurde durch eine Elicitation mit Hefefiltrat noch verstärkt.

Die Gehalte dieser Stoffgruppe wiesen in Versuch 2 bei den unbehandelten Kalli innerhalb der unterschiedlichen Stickstoffvarianten konstantere Werte auf als in Versuch 1. Im Gegensatz zu Versuch 1 akkumulierten in Versuch 2 die elicierten Kalli auf einem optimal mit Stickstoff versorgtem Medium (N1) den höchsten Gehalt dieser Stoffgruppe.

#### **3.3.16.4 Hydroxymizsäuren und Benzoesäuren**

Die Hydroxymizsäure-Derivate der Weinkalli nahmen in Versuch 1 (Abbildung 71), analog zu den Benzoesäuren, durch ein übermäßiges Stickstoffangebot im Medium ab, variierten aber nur wenig zwischen der N $\frac{1}{2}$ - und N1-Variante. Erst durch eine Elicitation mit einer geringen Hefefiltratkonzentration kehrte sich das Syntheseverhalten um und der Gehalt akkumulierte mit zunehmendem Stickstoffangebot. Nach Erhöhung der Elicitorkonzentration konnte diese Wechselwirkung jedoch nicht festgestellt werden.

Auch in Versuch 2 (Abbildung 72) zeigte sich bei den unbehandelten Kalli mit steigendem Stickstoffangebot im Medium eine leichte Tendenz zur Gehaltsabnahme. Eine Behandlung der Kalli mit Hefefiltrat führte bei Kalli aller Stickstoffmodifikationen zu einer Induktion der Hydroxymizsäure-Derivate. Dabei akkumulierten die auf N1 gewachsenen Kalli am deutlichsten, die N $\frac{1}{2}$ - und die N3-Varianten zeigten vergleichbare Gehalte.

Bei den Benzoesäuren konnte in Versuch 1 (Abbildung 71) eine maximale Akkumulation durch die Kultur der Kalli mit optimaler Stickstoffversorgung kombiniert mit geringer Elicitorkonzentration hervorgerufen werden. Sowohl Stickstoffüberschuss als auch -mangel sowie eine Erhöhung der Elicitorkonzentration verminderte die Induktionsfähigkeit. Durch eine erhöhte Elicitorkonzentration konnte sogar ein verminderter Gehalt an Benzoesäuren festgestellt werden.

Auch in Versuch 2 (Abbildung 72) verminderte sich mit zunehmendem Stickstoffangebot der konstitutive Gehalt an Benzoesäuren. Während sich eine Elicitation mit Hefefiltrat auf die Kalli, die auf N $\frac{1}{2}$ - und N1-Medium kultiviert wurden, kaum auf den Gehalt an Benzoesäuren auswirkte, verminderte sich, wie schon in Versuch 1 beschrieben, der Gehalt der auf N3 kultivierten Kalli 48 Stunden nach der Behandlung deutlicher.

#### **3.3.16.5 Flavonole**

Die Gehalte der Flavonole waren in Versuch 1 (Abbildung 71) relativ unabhängig vom Stickstoffangebot im Medium. Es zeichnete sich eine sinkende Tendenz der Konzentration mit zunehmendem Stickstoffangebot im Medium ab. Bei der Kombination von Stickstoffeinfluss und Elicitation mit Hefefiltrat zeigte sich keine eindeutige Wirkung.

Der Flavonol-Gehalt der Kalli lag in Versuch 2 deutlich unter dem in Versuch 1. Trotzdem zeigte sich 48 Stunden nach einer Elicitation, wie in Versuch 1, ein höherer Gehalt an

Flavonolen bei optimal mit Stickstoff versorgten Kalli im Vergleich zu Kalli, die auf N $\frac{1}{2}$  oder N3 Medium gewachsen waren. Die unbehandelten Kalli wiesen durch Stickstoffmangel und auch Stickstoffüberschuss höhere Gehalte an Flavonole auf als die optimal mit Stickstoff versorgte Variante. Stickstoffunterversorgte Kalli schienen durch eine Elicitation eine Verminderung des Gehaltes zu erfahren, was im Gegensatz zu Versuch 1 steht, Kalli, die optimal versorgt sind zeigten wie in Versuch 1 hingegen eine Akkumulation.

#### **3.3.16.6 Anthocyane**

Wie bei den Flavonolen verminderte sich auch der Gehalt der Anthocyane in Versuch 1 (Abbildung 71) mit steigendem Stickstoffangebot im Medium. Diese Wirkung addierte sich nach einer Elicitation mit 5% Hefefiltrat mit der induzierten Gehaltsreduktion und ergab so das gleiche Bild auf geringerem Niveau.

In Versuch 2 (Abbildung 72) zeigte sich kein linearer Zusammenhang zwischen Stickstoffangebot im Medium und Anthocyanidin-Konzentration in unbehandelten Kalli wie in Versuch 1. Hier schienen Kalli, die optimal Stickstoff versorgt waren, geringere Gehalte aufzuweisen als Stickstoff fehlernährte Kalli. Eine Elicitation induzierte in diesem Versuch auch keine Reduktion der Anthocyanidin-Konzentration in den Zellen, wie es in Versuch 2 der Fall ist.

#### **3.3.16.7 Resveratrol-Derivate**

In Stickstoff minderversorgten Weinkalli konnte in Versuch 1 sowohl bei dem 24 Stunden als auch bei dem 48 Stunden Entnahmeterrin in den unbehandelten Varianten ein erhöhter Gehalt an trans-Resveratrol festgestellt werden (Abbildung 73 A und B). Eine Stickstoff-Übersorgung führte ebenfalls zu einer leichten Akkumulation gegenüber den normal versorgten Varianten. Diese Resveratrol-Akkumulation in den N $\frac{1}{2}$  und N3-Medien kultivierten Kalli konnte auch in Versuch 2 (Abbildung 73 C) beobachtet werde. Nach einer Elicitation mit 5% Hefefiltrat schienen sich in Versuch 1 die Induktionsfaktoren zu multiplizieren und es fand eine Akkumulation an trans-Resveratrol statt, die wie bei den unbehandelten Kalli bei den nicht optimal mit Stickstoff versorgten Kalli deutlich höher verlief als bei den auf N1 Medium gewachsenen. Eine Erhöhung der Elicitorkonzentration auf 50% Hefefiltrat überlagerte den Stickstoffeffekt, so dass mit steigender Stickstoffkonzentration im Medium die Induktionsfähigkeit der Kalli bezüglich von trans-Resveratrol abnahm. Diese Dynamik konnte auch in Versuch 2 beobachtet werden, der in den Versuchsparameter mit der eben beschriebenen Variante (mit 50% Hefefiltrat behandelte Kalli, 48 Stunden nach Behandlung) in Versuch 1 (Abbildung 73 B) übereinstimmte. 48 Stunden nach den Elicitorbehandlungen wurde in Versuch 1 sowohl bei den auf N $\frac{1}{2}$  als auch auf N1 gewachsenen Kalli ein

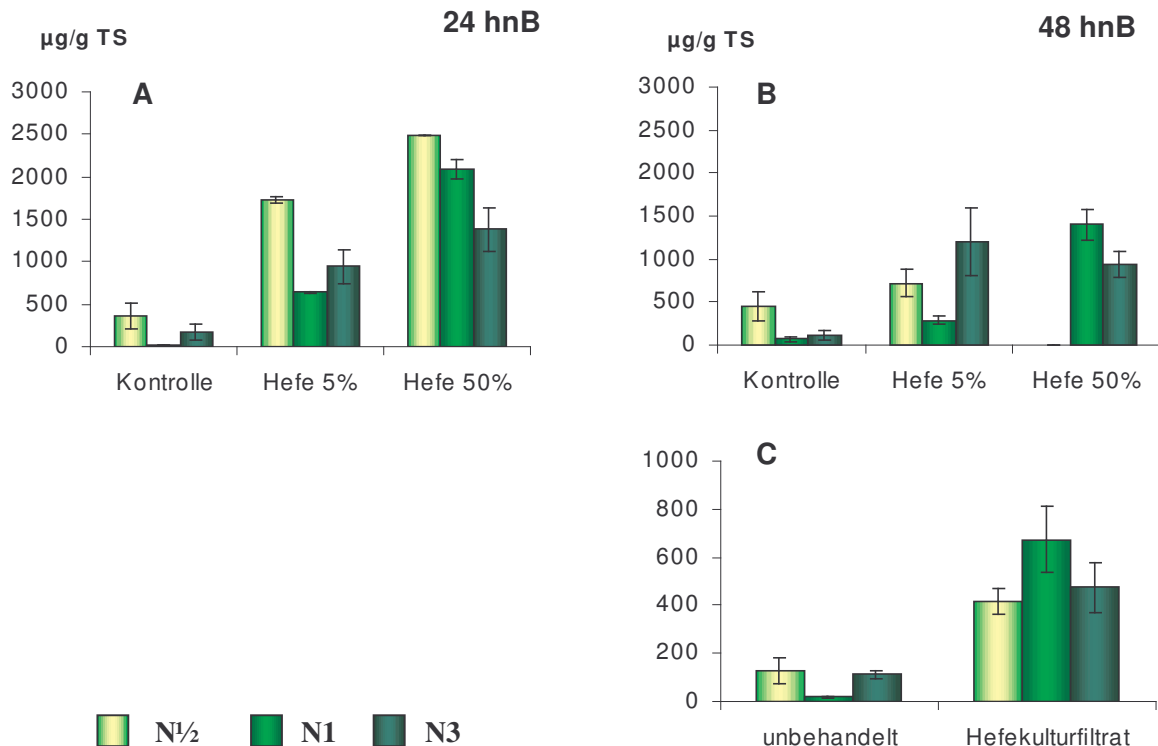


Abbildung 73: Gehalt an trans-Resveratrol von unbehandelten und **A, B** mit zwei verschiedenen Konzentrationen Hefefiltrat (5% und 50%) elicierten Weinkalli der Sorte „Regent“ (**Versuch 1**) A 24 Stunden B 48 Stunden nach der Behandlung; **C** mit Hefefiltrat behandelten Weinkalli der Sorte „Regent“ (**Versuch 2**) 48 Stunden nach der Behandlung. Mittelwerte aus Messwerten: Versuch 1: unbehandelt (N $\frac{1}{2}$ : 4; N1: 3; N3: 4), Hefe 5% (N $\frac{1}{2}$ : 2; N1: 2; N3: 3), Hefe 50% (N $\frac{1}{2}$ : 1; N1: 3; N3: 4); Versuch 2: unbehandelt (N $\frac{1}{2}$ : 2; N1: 2; N3: 3), Hefefiltrat (N $\frac{1}{2}$ : 3; N1: 2; N3: 3);  $\pm 0,5 \times$  Standardabweichung.

abnehmender Gehalt an trans-Resveratrol festgestellt. Nur der Gehalt der auf N3-Medium kultivierten Kalli stagnierte.

Auch die monomeren Resveratrol-Derivate in Versuch 1 (Abbildung 74) wurden durch ein reduziertes Stickstoffangebot im Medium induziert. Eine Kombination von N-Minderversorgung und Elicitation mit Hefefiltrat verstärkt oder beschleunigt die Induktion im Vergleich zu den normal und übermäßig versorgten Kalli. Dies zeigt sich darin, dass sie schon 24 Stunden nach der Behandlung einen hohen Gehalt aufwiesen, der bis 48 Stunden nach Behandlung schon wieder vermindert war. Der Gehalt der auf N1 gewachsenen Kalli stagniert bei einer 5%igen Elicitorbehandlung auf dem Wert von 24 Stunden nach der Behandlung. N-Überschuss induzierte bei dieser Elicitorkonzentration eine weitere Akkumulation der monomeren Resveratrol-Derivate bis 48 Stunden nach der Behandlung.

Wie auch in Versuch 1 führte in Versuch 2 eine Kultivierung auf N $\frac{1}{2}$ - und N3-Medium zu einer erhöhten Akkumulation der monomeren Resveratrol-Derivate in den Kalli (Abbildung 75). Durch eine Elicitation schienen Kalli, die auf N $\frac{1}{2}$  und N1 kultiviert wurden,

ähnliche hohe Akkumulationsraten hervorzurufen, die auf N3-Medium kultivierten Kalli wiesen hingegen verminderte Gehalte gegenüber den beiden anderen Stickstoffstufen auf. Die oligomeren Resveratrol-Derivate zeigten in beiden Versuchen ähnliche Wechselwirkungen wie ihre monomeren Vertreter.

Die Pallidol-Derivate erfahren in beiden Versuchen eine deutliche Akkumulation durch die Behandlungen mit Hefefiltrat. Wie auch schon bei den monomeren und oligomeren Resveratrol-Derivaten war 48 Stunden nach der Behandlung bei Kalli, die optimal mit Stickstoff versorgt waren, eine maximale Akkumulation dieser Stoffgruppe zu verzeichnen.

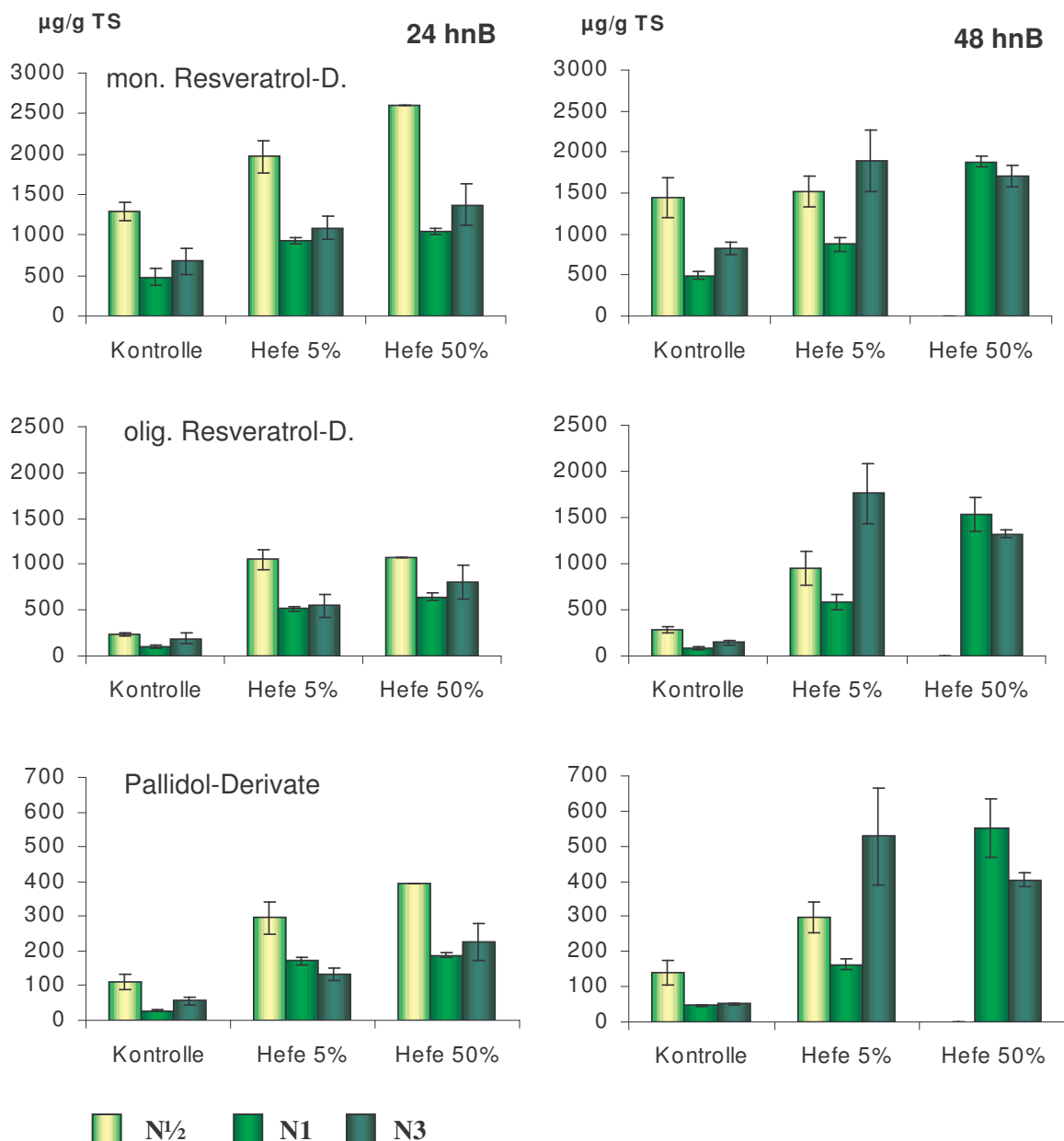


Abbildung 74: Monomere Resveratrol-, oligomere Resveratrol- und Pallidol-Derivate von unbehandelten und mit zwei verschiedenen Konzentrationen Hefefiltrat (5% und 50%) elizitierten Weinkalli der Sorte „Regent“ (**Versuch 1**) 24 (linke Seite) und 48 (rechte Seite) Stunden nach der Behandlung.. Mittelwerte aus 3–6 Messwerten  $\pm 0,5 \times$  Standardabweichung.

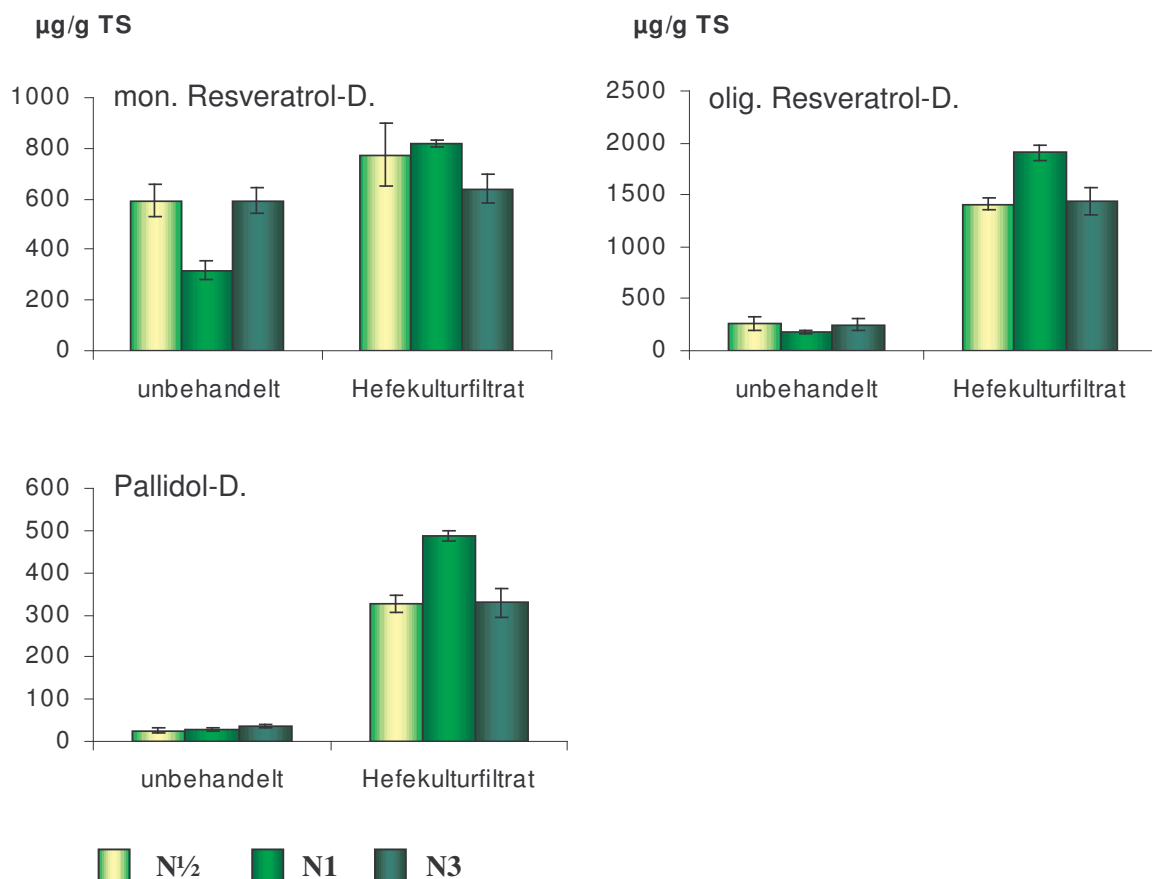


Abbildung 75: Monomere Resveratrol-, oligomere Resveratrol- und Pallidol-Derivate von unbehandelten und mit Hefefiltrat behandelten Weinkalli der Sorte „Regent“ (**Versuch 2**) 48 Stunden nach der Behandlung. Mittelwerte aus Messwerten: unbehandelt ( $N^{1/2}$ : 2,  $N1$ : 2,  $N3$ : 3), Hefefiltrat ( $N^{1/2}$ : 3,  $N1$ : 2,  $N3$ : 3);  $\pm 0,5 \times$  Standardabweichung.

### 3.3.17 Einfluss der Stickstoffverfügbarkeit auf den pH-Wert der Kulturmedien

Unterschiedliche Stickstoffkonzentrationen und -formen in Kulturmedien der Weinkalli bewirkten schon durch den Autoklavivorgang leichte Veränderungen im pH-Wert (Abbildung 76). Die pH-Werte der vorher auf 6,2 eingestellten Medien sanken beim Medium  $N^{1/2}$  auf 5,77, bei  $N1$  auf 5,66 und bei  $N3$  auf 5,48 ab. Eine Erhöhung der Ammoniumnitrat-Menge führte also zu einer Absenkung des pH-Wert durch den Autoklavivorgang.

Die doch relativ geringen pH-Wert-Schwankungen bei den Nährstoffmodifikationen verursacht durch den Autoklavivorgang verstärkten sich während der dreiwöchigen Kultur der Weinkalli auf diesen Medien. Mit steigendem Angebot an Ammoniumnitrat wurde das Kulturmedium innerhalb der Kulturdauer zunehmend saurer, was die Darstellung der prozentualen Veränderung des pH-Wertes (Abbildung 76: rote Linie) deutlich macht.

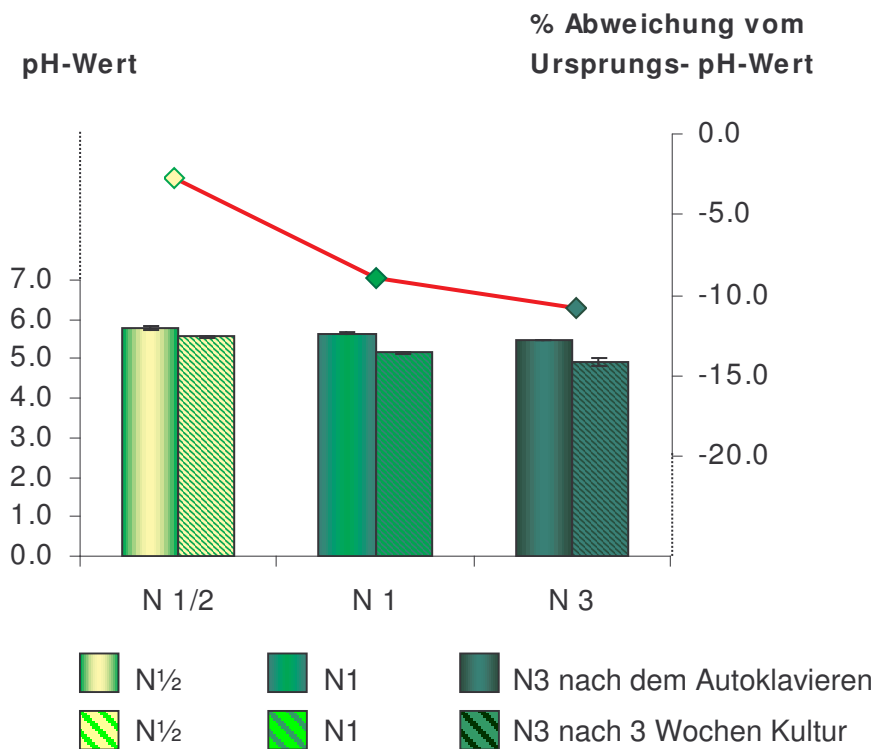


Abbildung 76: pH-Werte der Stickstoff-modifizierten Medien (N $\frac{1}{2}$ , N1 und N3) nach dem Autoklavieren und nach der 3 Wochen dauernden Kultur von Weinkallus der Sorte „Regent“ auf den Medien. Die rote Linie verbindet die prozentualen pH-Wert-Veränderungen der einzelnen Stickstoffvarianten. Mittelwerte aus :N-Varianten nach dem Autoklavieren je 4 Messwerte; nach 3 Wochen Kultur (N $\frac{1}{2}$ : 16), (N1: 14), (N3: 15) Messwerten,  $\pm 0,5 \times$  Standardabweichung

### 3.3.18 Einfluss von verschiedenen Hefekomponenten als Elicitor auf Weinkallus

Um Informationen bezüglich der elicitierenden Bestandteile im Hefeextrakt zu erlangen, wurden die Weinkalli der Sorte „Regent“ sowohl mit dem herkömmlichen Hefefiltrat, als auch mit den Hefefiltrat-Fractionen aus einer Ethylacetat/Wasser-Phasentrennung behandelt. Als zusätzliche Vergleichsbehandlung wurde eine 1%ige Lösung aus einem Hefeextrakt von Merck verwendet.

Die Reaktionen im Sekundärstoffwechsel, verursacht durch die unterschiedlichen Behandlungen, sind in den Abbildungen 77 und 78 im Vergleich zu einer unbehandelten Variante dargestellt.

#### Phenolische Inhaltstoffe

Der Gesamtphenol-Gehalt wurde in Versuch 5 durch Behandlungen mit dem schon bekannten Hefefiltrat und abgeschwächt auch durch die Behandlung mit einer 1%igen Suspension des Hefeextraktes von Merck induziert (Abbildung 77).



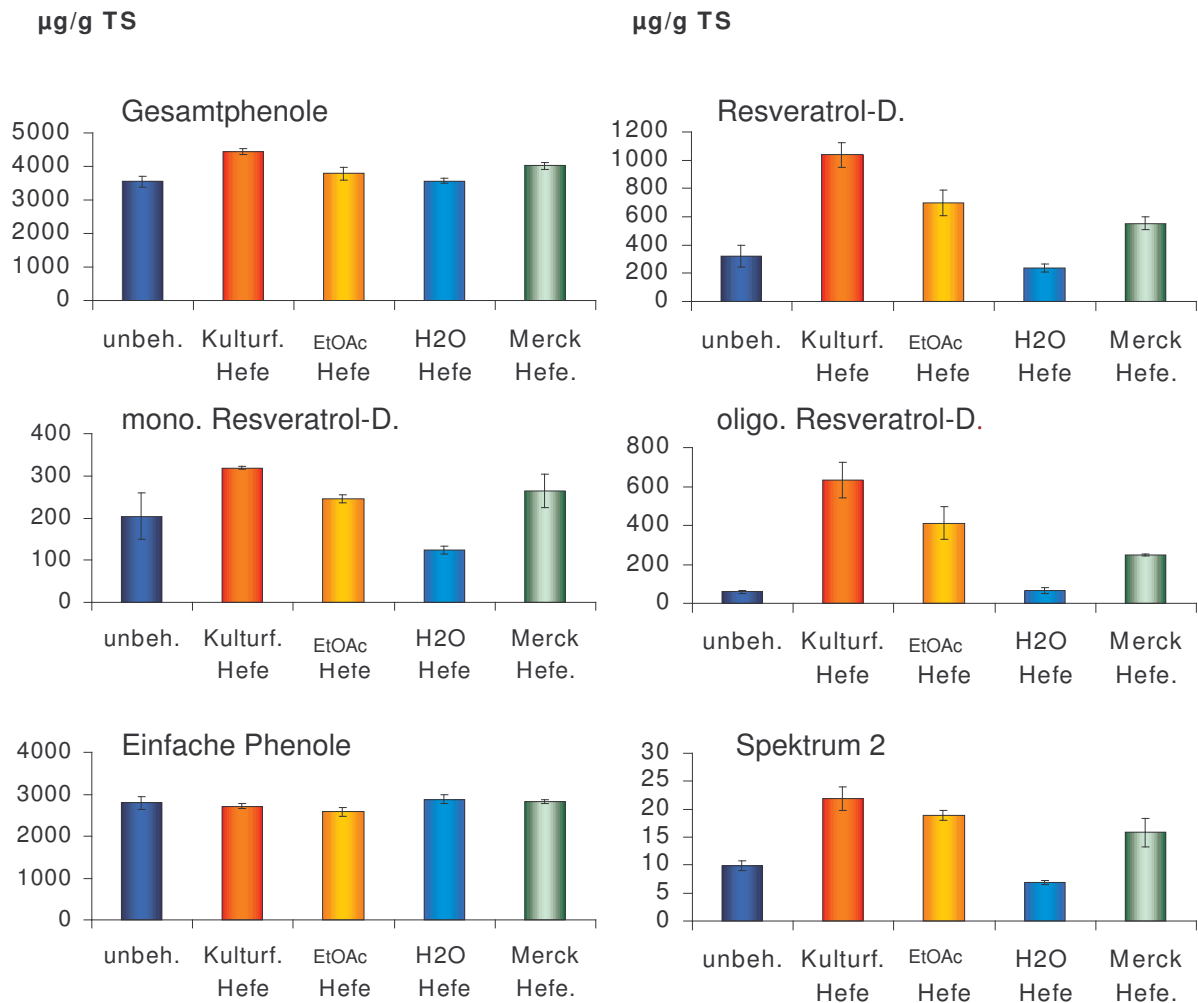


Abbildung 77

unbeh. = unbehandelte Kalli  
 Kulturf. Hefe = Hefefiltrat  
 EtOAc.Hefe = Ethylacetat-Phase des Hefefiltrates  
 H<sub>2</sub>O Hefe = Wasser-Phase des Hefefiltrates

Summe der Phenylpropanoide, Summe Resveratrol-Derivate ohne Resveratrol, monomere Resveratrol-Derivate, oligomere Resveratrol-Derivate, einfache Phenole und Verbindungen die Spektrum 2 zugewiesen wurden von unbehandelten und mit verschiedenen Aufbereitungen eines Hefefiltrates behandelte Kalli (Kulturfiltrat Hefe (Kulturf. Hefe), hydrophobe Bestandteile eines Hefefiltrates aus der Ethylacetatphase (EtOAc. Hefe), hydrophile Bestandteile eines Hefefiltrates aus der Wasserphase (H<sub>2</sub>O Hefe) und eine 1% Suspension eines Hefeextraktes von Merck. Mittelwerte aus 6 Messwerte (unbehandelt; Kulturf. Hefe; Meck Hefe) und 4 Messwerte (EtOAc Hefe; H<sub>2</sub>O Hefe) ± 0,5xStandardabweichung

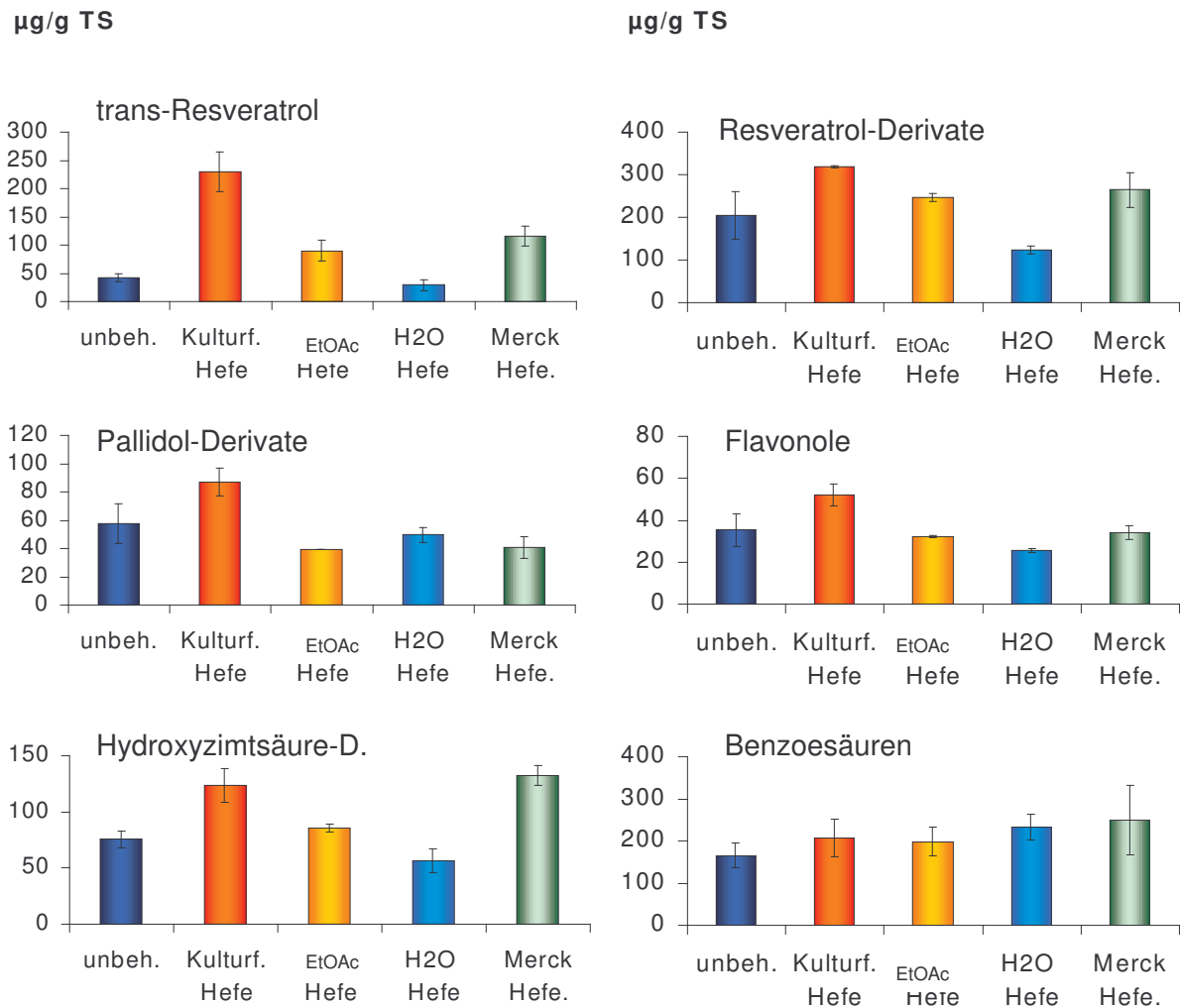


Abbildung 78

unbeh. unbehandelte Kalli  
 Kulturf. Hefe Hefefiltrat  
 EtOAc.Hefe Ethylacetat-Phase des Hefefiltrates  
 H<sub>2</sub>O Hefe Wasser-Phase des Hefefiltrates

Trans-Resveratrol, monomere Resveratrol-Derivate ohne Resveratrol, Pallidol-Derivate, Flavonole, Hydroxyzimtsäuren und Benzoessäuren von unbehandelten und mit verschiedenen Aufbereitungen eines Hefefiltrates behandelte Kalli (Kulturfiltrat Hefe (Kulturf. Hefe), hydrophobe Bestandteile eines Hefefiltrates aus der Ethylacetatphase (EtOAc Hefe), hydrophile Bestandteile eines Hefefiltrates aus der Wasserphase (H<sub>2</sub>= Hefe) und eine 1% Suspension eines Hefeextraktes von Merck. Mittelwerte aus 6 Messwerte (unbehandelt; Kulturf. Hefe; Meck Hefe) und 4 Messwerte (EtOAc Hefe; H<sub>2</sub>O Hefe) ± 0,5xStandardabweichung

Die Induktion durch die Ethylacetat-Phase des Hefefiltrates war gegenüber der unbehandelten Variante unmerklich höher, die Wasserphase des Filtrates hatte keine Auswirkungen auf die Gesamt-Polyphenole.

Während die einfachen Phenole in allen Behandlungen vergleichbare Konzentrationen aufwiesen, akkumulierten die Resveratrol-Derivate je nach Behandlung deutlich verschieden (Abbildung 78). Das schon bekannte Hefefiltrat induzierte die Resveratrol-Derivat-Synthese am stärkste, gefolgt von der Ethylacetatphase des Filtrates. Auch die Anwendung des Merck Hefeextraktes führt zu einer Akkumulation von Resveratrol-Derivaten. Dabei erfuhren die oligomeren Resveratrol-Derivate 48 Stunden nach den Behandlungen stärkere Induktionen als ihre monomeren Vertreter. Die Induktionen der in Spektrum 2 zusammengefassten Verbindungen waren mit denen der monomeren Resveratrol-Derivate vergleichbar. Das Aglykon trans-Resveratrol war in seinem Induktionsverhalten bezüglich der unterschiedlichen Behandlungen mit den oligomeren-Resveratrol-Derivaten vergleichbar (Abbildung 78) und wurde stärker induziert, als seine übrigen monomeren Derivate. Die Pallidol-Derivate wurden ausschließlich durch die Behandlung mit dem schon bekannten Hefefiltrat induziert, während die übrigen Behandlungen eher zu einem Konzentrationsrückgang in den Weinkalli führte. In ähnlicher Weise wie die Pallidol-Derivate reagierten auch die Flavonole.

Die Hydroxyzimtsäure-Derivate zeigten bezüglich der verschiedenen Behandlungen ähnliche Akkumulations-Reaktionen wie die Resveratrole, dabei war die Akkumulation durch die Anwendung des Merck Hefeextraktes tendenziell sogar stärker als durch eine Behandlung mit dem selbst-erzeugten Hefefiltrat.

Die hydrophilen Bestandteile des Hefeextraktes in der Wasserphase schienen in keiner der benannten Stoffgruppen induzierende Fähigkeiten zu besitzen. Eine Ausnahme stellte dabei die Stoffgruppe der Benzoesäuren dar, bei der alle Behandlungen eine tendenzielle Akkumulation induzierten, wobei die Wasserphase des Hefeextraktes zusammen mit der Anwendung des Merck Hefeextraktes aber die deutlichste Induktion hervorrief. Die Behandlung mit dem Hefeextrakt von Merck weist dabei jedoch eine starke Streuung auf.

### 3.3.1 Inokulation mit *Botrytis cinerea*

In Versuch 5 wurden die 24 Stunden zuvor mit Hefefiltrat elicitierten Weinkalli einer Inokulation mit *Botrytis cinerea*-Konidien suspension unterzogen. Dabei wurden die Gesamt-Gehalte der phenolischen Inhaltstoffe durch eine alleinige *Botrytis*-Infektion nicht induziert (Abbildung 79). Eine Behandlung mit dem Hefefiltrat führte schon 24 Stunden nach der Elicitation zu einer deutlichen Akkumulation der Phenylpropanoide, die bei fortschreitender Elicitationsdauer stetig zu nahm. Eine der Hefebehandlung nachgeschaltete *Botrytis cinerea*-Inokulation erhöhte den Gesamtgehalt nicht zusätzlich, sondern nahm 48 Stunden nach der Elicitation bei vergleichbarer Konzentration mit der alleinigen Hefefiltrat-Behandlung

tendenziell wieder ab. Eine Mykosin-Behandlung induziert die Phenylpropanoide in schwächerer Form als eine Behandlung mit Hefefiltrat. Die Anwendung der Hefekomponente aus Mykosin führt gegenüber der Mykosinbehandlung zu einer geringeren Akkumulation der Phenole.

Die Induktionsraten der einzelnen Behandlungen wurden vorwiegend durch eine vermehrte Akkumulation von Resveratrol-Derivaten bestimmt.

Für das trans-Resveratrol ergab sich nach einer Elicitation mit Hefefiltrat eine Dynamik mit einer maximalen Akkumulation nach 48 Stunden und einer darauffolgenden Konzentrationsabnahme bis 96 Stunden nach Behandlung. Eine nachgeschaltete *Botrytis cinerea*-Inokulation führte 48 Stunden nach der Elicitation zu einem trans-Resveratrol-Gehalt, der deutlich unter dem einer ausschließlichen Filtrathandlung lag und auch nach fortschreitender Elicitationszeit nicht weiter akkumulierte. Der Maximalgehalt dieser Variante war mit dem der Mykosin-behandelten Variante vergleichbar. Eine Anwendung mit der Hefekomponente aus Mykosin führte zu einer deutlich verminderten Akkumulation von trans-Resveratrol im Vergleich zur Anwendung mit dem Gesamtpäparat.

Die Dynamik der Pallidol-Derivate spiegelte die der gesamten Resveratrol-Derivate ohne Resveratrol selbst wider. Eine Filtrat-Behandlung aus Hefe führte zu einer kontinuierlichen Akkumulation der Pallidol-Derivate. Durch eine nachgeschaltete *Botrytis cinerea*-Inokulation nahmen die Gehalte nach 48-stündiger Akkumulation kontinuierlich wieder ab, verliefen also gegenläufig zu einer Filtratbehandlung ohne *Botrytis cinerea*-Inokulation.

Die Induktionsraten von Pallidol-Derivaten durch Mykosin und dessen Hefebestandteile waren gegenüber der Filtratanwendung deutlich vermindert.

Bei der Betrachtung der Resveratrol-Derivate bezüglich ihrer Konfigurationen wurde deutlich, dass die trans-Resveratrol-Derivate nach einer Behandlung mit Hefefiltrat mit fortschreitender Elicitationszeit kontinuierlich zunahmten, die cis-Resveratrol-Derivate jedoch schon 24 Stunden nach der Behandlung maximal akkumulierten. Jedoch variierte die Dynamik der einzelnen cis-Resveratrol-Derivate untereinander (Abbildung 79).

Die Gehalte der Mischvarianten von trans- und cis-Resveratrol-Derivaten (Abbildung 79) nahmen sowohl bei der Behandlung mit Hefefiltrat als auch bei der Behandlung mit nachgeschalteter *Botrytis cinerea*-Inokulation mit fortschreitender Inokulationszeit kontinuierlich zu.

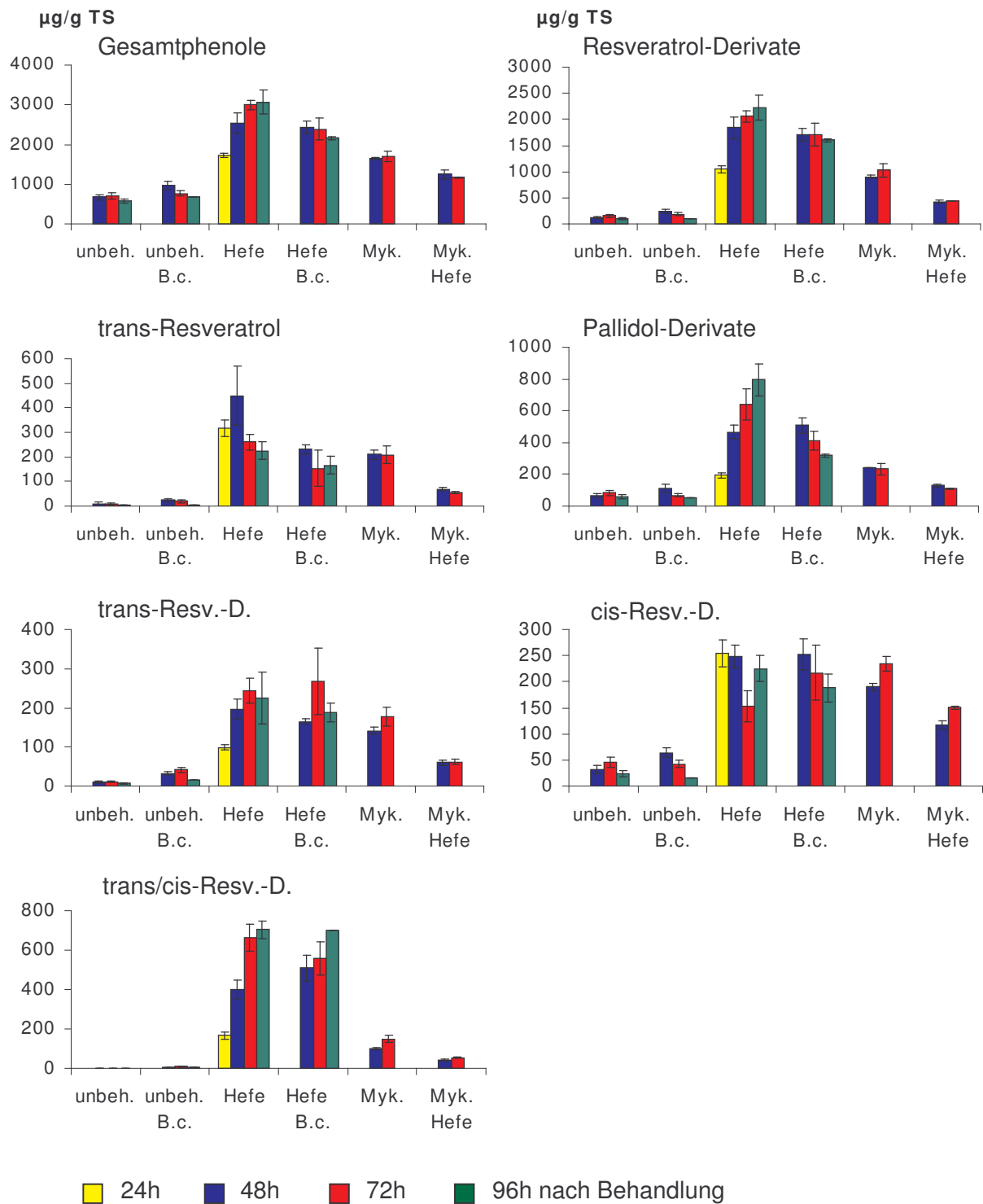


Abbildung 79: Gesamtphenole, Resveratrol-Derivate ohne Resveratrol, trans-Resveratrol, Pallidol-Derivate, trans-Resveratrol-Derivate, cis-Resveratrol-Derivate und trans-/cis-Resveratril-Derivat von unbehandelten (unbeh.) und mit Hefefiltrat (Hefe) elicitierten Weinkalli, jeweils mit und ohne 24 Stunden nach Elicitation durchgeführter Inokulation mit *Botrytis cinerea*-Sporensuspension (B. c.), sowie mit Mykosin als auch mit der Hefekomponente aus Mykosin (Myk. H) behandelte Weinkalli der Sorte „Nero“, 24, 48, 72 und 96 Stunden nach Elicitation, bzw. 0, 24, 48 und 72 Stunden nach B.c.-Inokulation (Versuch 5). Mittelwerte aus Messwerte: (unbehandelt: 48h/13, 72h/9, 96h/5); (unbehandelt + B.c.: 48h/9, 72h/14, 96h/13); (Hefe: 24h/5, 48h/16, 72h/6, 96h/4); (Hefe + B.c.: 48h/7, 72h/13, 96h/3); (Mycosin: 48h/3, 72h/2); (Hefe aus Mycosin: 48h/3, 72h/2) ± 0,5 x Standardabweichung

### Gallussäure-Derivate

Unbehandelte Kalli akkumulierten innerhalb von 24 Stunden nach einer *Botrytis cinerea*-Inokulation Gallussäure-Derivate (Abbildung 80). Eine Akkumulation dieser Säuren wurde sowohl durch eine 72-stündige Elicitation mit Hefefiltrat als auch durch eine 48-stündige Elicitation mit der Hefekomponente aus Mykolin induziert. Die Induktionen dieser Stoffgruppe sind bei allen Behandlungen nicht so deutlich wie die der Resveratrol-Derivate.

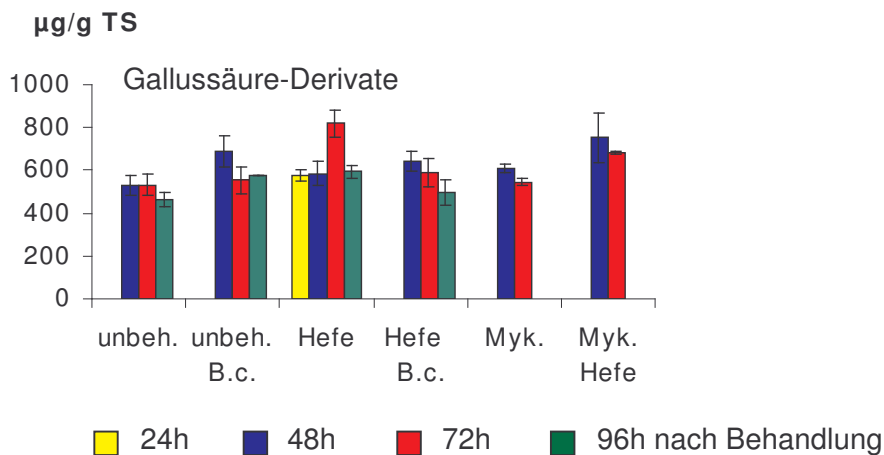


Abbildung 80: Gallussäure-Derivate von unbehandelten (unbeh.) und mit Hefefiltrat (Hefe) elicierten Weinkalli, jeweils mit und ohne 24 Stunden nach Elicitation durchgeführte Inokulation mit *Botrytis cinerea*-Sporensuspension (B.c.), sowie mit Mykolin als auch mit der Hefekomponente aus Mykolin (Myk. H) behandelte Weinkalli der Sorte „Nero“, 24, 48, 72 und 96 Stunden nach Elicitation, bzw. 0, 24, 48 und 72 Stunden nach B.c. Inokulation (Versuch 5). Mittelwerte aus Messwerten: (unbehandelt: 48h/13, 72h/9, 96h/5); (unbehandelt + B.c.: 48h/9, 72h/14, 96h/13); (Hefe: 24h/5, 48h/16, 72h/6, 96h/4); (Hefe + B.c.: 48h/7, 72h/13, 96h/3); (Mykolin: 48h/3, 72h/2); (Hefe aus Mykolin: 48h/3, 72h/2)  $\pm 0,5 \times$  Standardabweichung

Welchen Einfluss die Elicitation mit dem Hefefiltrat von *Aureobasidium pullulans* auf die Infektionsgeschwindigkeit einer *Botrytis cinerea*-Inokulation hatte, zeigt Abbildung 81. Über 80% der mit Hefefiltrat vorbehandelten Weinkalli wiesen 24 Stunden nach einer *Botrytis cinerea*-Inokulation (Abbildung 81) keine oder nur erste Mycelbildung des Pathogens auf. Bei der unbehandelten Variante waren nur 11% gar nicht oder leicht mit Mycel überzogen. 49% der unbehandelten Kalli wiesen ein Mycelwachstum des Pathogens auf, das sich über die Hälfte des Kalluskörpers erstreckte, 40% waren komplett mit Mycel überzogen. Bei den elicierten Kalli zeigten 17% der Kalli ein Mycelwachstum über die Hälfte des Kalluskörpers und kein eliciertes Kallus war 24 Stunden nach Elicitation komplett mit Mycel überzogen. 48 Stunden nach einer *Botrytis cinerea*-Inokulation waren 100% der unbehandelten Kalli komplett mit Mycel überzogen, wobei 78% auch schon Verbräunungen zeigten, was ein Absterben der Kalluszellen widerspiegelt. Bei den elicierten Kalli waren nur 18% komplett mit Mycel überzogen, wiesen jedoch noch keine Verbräunungen auf. 46% der Kalli waren nur leicht und 36% zur Hälfte mit Mycel überzogen.

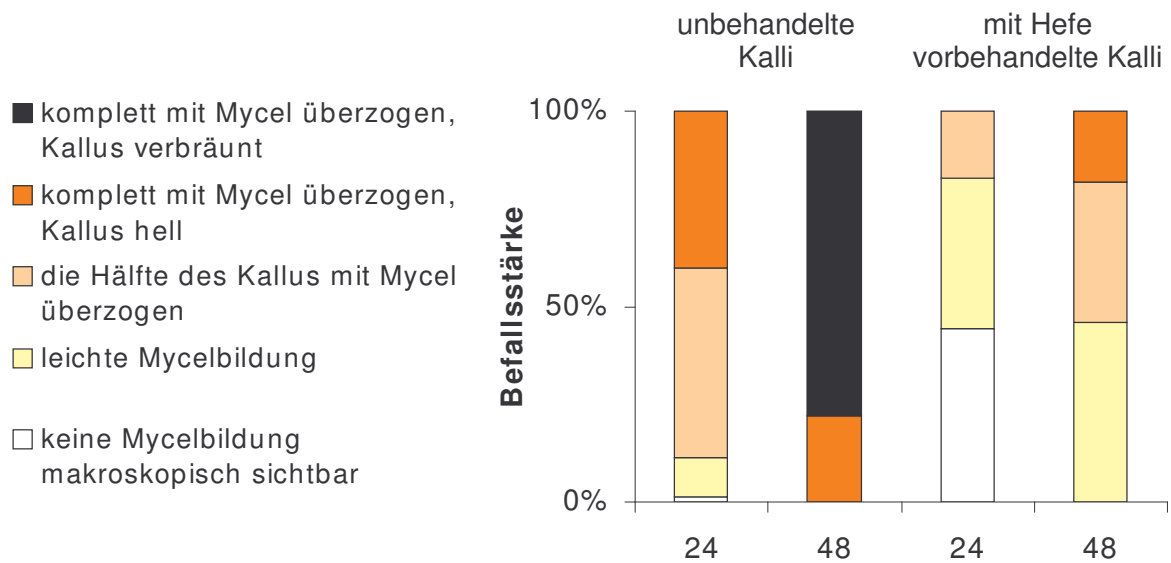


Abbildung 81: Befallsstärke von unbehandelten und mit Hefefiltrat elicitierten Weinkalli der Sorte „Nero“ 24 und 48 Stunden nach einer Inokulation (hnl) mit *Botrytis cinerea*, entspricht 48 und 72 Stunden nach Elicitation (**Versuch 5**). Bonitierte Kalli pro Variante: 24 Stunden nach Inokulation (h): je 70 Kalli; 48 hnl 50 Kalli

Eine Woche nach der Inokulation mit *Botrytis cinera* überzog auch die elicitierten Kalli ein Mycel, was sich über den gesamten Kallus erstreckte. Ferner wiesen die Kalli Verbräunungen auf. Die unbehandelten Kalli waren von einem dichten Mycelrasen überzogen und in ihrem Volumen fast abgebaut. Zu diesem Termin standen pro Variante 30 Kalli zur Auswertung zur Verfügung.

### 3.4 Diskussion der Induktionsversuche

#### 3.4.1 Identifikation der Hefeisolate

Der Forschungsbedarf bei endophytischen und epiphytischen Mikroorganismen spiegelt sich in der Widersprüchlichkeit von Ergebnissen nach Anwendung unterschiedlicher Identifikationsmethoden wider. Die Tatsache, dass die Identifikation der Hefestämme mittels physiologischer Tests, die nach dem standardisierten System der Vergleichsdatenbank durchgeführt wurden, und die, die mittels rDNA-Sequenzanalyse (28S) analysiert wurden, unterschiedliche Zuordnungen hervorbrachten, machte eine eindeutige Identifikation schwierig. Da die nach beiden Identifikationsmethoden zugeordneten Organismen sich in den Untersuchungen als wirkungsvolle Antagonisten von Nacherntepathogenen bei Obst und Gemüse erwiesen, sie in Versuchen vergleichbare Ergebnisse erzielten und häufig zusammen in einer Versuchsreihe verwendet wurden, wird dieser nicht eindeutigen Identifikation der Hefeisolate zum jetzigen Zeitpunkt nicht viel Bedeutung beigemessen. Die Ergebnisse der Sequenzanalyse wurden dennoch als aussagekräftiger angesehen, so dass von der Zuordnung des hefeähnlichen Pilzstammes *Aurebasidium pullulans* ausgegangen wird.

#### 3.4.2 Verwendung von Kalluskulturen als Versuchsmodell

Da *Vitis vinifera*-Zellsuspensionskulturen nach einer Kulturdauer von 14–16 Tagen eine maximale Akkumulation von Anthocyanen und Stilbenen aufwiesen (VITRAC et al. 2001b) und auch die Reaktionsfähigkeit von Kalluszellen auf eine Elicitation abhängig vom Zellalter war, wurden die Versuche immer genau nach einer 14-tägigen Vorkultur der Kalluslinien durchgeführt. Dass die physiologischen Wachstumseigenschaften der Kalluszellen die Aktivität des Sekundärstoffwechsels beeinflussen, zeigten PELTONEN et al. (1997) durch eine vom physiologischen Stadium abhängige Induktionsfähigkeit von Phytoalexinen nach einer Elicitorbehandlung bei Bohnenzellkulturen. Auch FUNK et al. 1987 zeigten an etablierten Zellsuspensionskulturen von *Glycine max* und *Thalictrum rugosum*, dass diese ein sensitiveres Reaktionsvermögen gegenüber einer Elicitorbehandlung aufweisen als jüngeren Zellkulturen. Somit scheint auch die Verwendung von zweijährigen, etablierten *Vitis vinifera*-Kalluskulturen, wie sie in dieser Versuchsreihe verwendet wurden, gute Induktionsvoraussetzungen zu erbringen. Jedoch weisen verschiedene Enzyme ihre Akkumulationsmaxima in unterschiedlichen physiologischen Stadien der Zellen auf. So zeigten Zellkulturen von *Vitis vinifera* 18 Stunden nach dem Zuführen von neuem Kulturmedium, also noch in der Phase, in der keine Zellteilung erfolgt, ein Expressionsmaximum von Stilbensynthase mit anschließender Resveratrol-Synthese. Die Bestandteile der Nährlösung scheinen als Elicitor für die Stilbensynthase zu fungieren. In dem gleichen Versuchssystem wurde die PAL-Aktivität erst 5-6 Tage nach der Zugabe der



neuen Nährlösung am Ende der logarithmischen Phase der Zellvermehrung maximal exprimiert (LISWIDOWATI et al. 1991). Demnach führen Bestandteile der Nährlösung nicht zu einer maximalen Induktion, sondern es sind entweder Einflussfaktoren wie Stoffwechselfausscheidungen oder Zellwandbausteine, eventuell auch pH-Wert-Veränderungen des Nährmediums während der Zellvermehrung notwendig, um die PAL-Aktivität maximal zu induzieren, oder aber die jungen Zellen selbst weisen eine höhere PAL-Aktivität auf. Die Aktivität der Stilbensynthese in Zellkulturen ist scheinbar in älteren Zellen auch gegeben, was mit einer zunehmenden Induzierbarkeit von Resveratrol bei steigendem Blattalter von *Vitis vinifera* übereinstimmen würde (LANGCAKE und MCCARTHY 1979; STEIN und BLAICH 1985). Durch Elicitation mit pilzlichen Zellwänden werden beide Enzym-Aktivitäten sowohl in der stationären als auch in der logarithmischen Zellteilungsphase induzierbar, wobei sie jedoch in der stationären Phase ausgeprägter und selektiver sind.

#### **3.4.2.1 Kulturmedium**

Neben der individuellen Stoffwechselaktivität der jeweiligen Kalluslinie haben auch die Bestandteile des Kulturmediums Einfluss auf das Akkumulationsvermögen der Zellen. So führt nicht nur eine Erhöhung der Saccharose-Konzentration im Medium zu einer gesteigerten Anthocyanidin-Synthese bei *Vitis vinifera*-Zellsuspensionskulturen, sondern auch eine Verminderung der Nitratkonzentration (HIRASUNA et al. 1991). Eine Modifikation des B5-Mediums (GAMBORG et al. 1968) mit 0,5 mg/Liter 2,4-D induzierte das 1,5-fache der Anthocyanidin-Konzentration wie das gleiche Medium mit 5,0 mg/Liter NAA. Durch die Zugabe von 0,5 mg/Liter 2,4-D und 0,5 mg/Liter Kinetin halbiert sich der Anthocyanidin-Gehalt der Zellen im Vergleich zum Medium mit alleiniger 2,4-D-Zugabe. Die Verwendung von BA an Stelle von Kinetin reduzierte die Anthocyanidin-Konzentration sogar um den Faktor 5 (HIRASUNA et al. 1991). Die Wirkung dieser Einflussfaktoren kann in Bezug auf andere Phenylpropanoide völlig unterschiedlich sein.

Damit wird die Komplexität der Einflussmöglichkeiten, die die Bestandteile des Kulturmediums auf den Sekundärstoffwechsel haben, deutlich. Sie zeigt auf der anderen Seite aber auch auf, wie viele Steuermöglichkeiten dieses System beinhaltet.

#### **3.2.2.2 Verbräunung von Kallusgewebe**

Nach einer Elicitation von den Kalluskulturen mit Hefefiltrat konnte sowohl bei einer 5- als auch bei einer 50%igen Kulturfiltratlösung eine leichte Verbräunung der Kalli festgestellt werden, die jedoch nicht mit dem Absterben der Zellen in Zusammenhang gebracht werden konnte, da Vitalitätstests der Weinkalli mit Evans-Blue Färbereagenz keine sichtbaren Unterschiede aufzeigten. Verbräunungen nach Behandlungen mit Hefeelicatoren wurden

schon mehrfach beobachtet. So induzierte bei WOJTASZEK (1997) ein Hefeelictor bei *Lupinus albus*-Pflanzen eine Akkumulation von Isoflavonoid-Aglykonen, die mit zunehmender Elicitorkonzentration anstieg. Eine Elicitation mit  $\text{CuCl}_2$  wies vergleichbare Induktionen auf, unterschied sich jedoch in der Verteilung der Aglykone im Gewebe. Eine Elicitation des Pflanzengewebes mit dem Hefeelictor führte zu einem Transport von 50% der freien Aglykone aus dem Pflanzengewebe hinaus. Bei einer Behandlung mit  $\text{CuCl}_2$  werden weniger als 1% der Verbindungen vom Pflanzengewebe abgesondert, was zu einem stärkeren Verbleib im Pflanzengewebe führt. Obwohl bei *Lupinus albus*-Kotyledonen nach einer Behandlung mit dem Hefeelictor, nicht aber nach einer Behandlung mit  $\text{CuCl}_2$ , eine Verbräunung von Gewebe vorgefunden wurde, konnte keine Korrelation zwischen der Isoflavonoid-Produktion und dem Verbräunen von Geweben festgestellt werden. Die Ursache scheint also mehr in der Lokalisierung der Isoflavonoide zu liegen. Demnach muss die Pflanze Regulationsmechanismen besitzen, die nicht nur Phytoalexine induzieren lässt, sondern auch steuert, ob sie in der Pflanze verbleiben oder ausgeschieden werden. Dazu muss die Pflanzenzelle verschiedene Elicortypen unterscheiden können.

Dass Zellsuspensionskulturen aus Weinblättern von Sorten mit höheren Phenolgehalten auch eine stärkere braune Pigmentierung aufweisen, zeigten SGARBI et al. (2003). Ob die stärkere Braunfärbung der hier verwendeten Kalli in einer erhöhten Konzentrationen an Phenylpropanoiden begründet liegt, oder die Kalluskulturen durch eine Hefebehandlung vermehrt Phytoalexine aus der Zelle hinaus transportiert haben, die dann eventuell durch Oxidation diese Verbräunungen ausmachten, wurde bislang noch nicht untersucht. Dies sollte jedoch mittels Überspülen der Kalli mit Waschlösungen und anschließender Untersuchung dieser Waschlösung auf phenolischen Stoffe nachgeholt werden.

Für eine Verbräunung durch Stilben-Oxidation sprechen aber die Ergebnisse von HOOS und BLAICH (1988). Hier wurden Zellsuspensionskulturen von pilzanfälligen *Vitis vinifera*-Sorten („Riesling“ und „Optima“) sowie resistenten Sorten („Pollux“ und „Sirius“) mit Mycel von *Botrytis* behandelt. Die Zellen der anfälligen Sorten wurden nach 60 Stunden abgetötet. Die resistenten Sorten erlitten nur leichte Schäden. Es konnten zwei Typen von Peroxidasen charakterisiert werden, die eine hohe Affinität zu Resveratrol als Substrat aufwiesen und dieses zu einem braunen Pigment oxidierten. Die Peroxidaseaktivität war bei den anfälligen Sorten geringer als bei den resistenten. Die Oxidationsprodukte vom Resveratrol hatten eine hemmende Wirkung auf die Peroxidase.

Die zunehmende Verbräunung mit fortschreitender Elicitationszeit könnte mit dem zunehmenden Gehalt an oligomeren Resveratrol-Derivaten im Zusammenhang stehen, die durch ein vermehrtes Vorhandensein von Peroxidasen induziert wurden.

### 3.4.3 Induktion der Phenylpropanoide

#### 3.4.3.1 Konzentrationsunterschiede zwischen den Versuchen

Die verwendeten Kulturfiltrate der Hefeisolate führten in allen Versuchen mit zunehmender Elicitationszeit zu einer fortschreitenden Induktion der Gesamtphenole (siehe Abbildung 30). Auffällig waren jedoch die, trotz gleicher Kalluskultur und identischer Versuchsdauer, unterschiedlichen Gesamtgehalte in den Versuchen. Während unbehandelte Kalli der Sorte „Regent“ in Versuch 3 Gesamtgehalte der Phenylpropanoide von durchschnittlich 3500 µg/g Trockensubstanz (TS) aufwiesen, zeigten die Kalli in Versuch 1 Gehalte um 8500 µg/g TS und die in Versuch 2 um 7300 µg/g TS. Die unbehandelten Kalli der Sorte „Nero“ wiesen in Versuch 4 Gehalte um 3500 µg/g TS auf, während in Versuch 5 nur 650 µg/g TS ermittelt wurden. Die unterschiedlichen Induktionsintensitäten bei den verschiedenen Versuchen, könnte in der Inhomogenität der physiologischen Aktivitäten durch variierende Seneszenz der Kalluskulturen begründet liegen. Die Kalluskulturen wurden zwar alle einer 14-tägigen Vorkultur unterzogen, bevor sie den Behandlungen ausgesetzt wurden, das Ausgangsmaterial variierte jedoch im Alter zwischen 3 und 6 Wochen.

Ferner traten trotz identischer Autoklavierzeiten der Kulturmedien durch variierende Abkühlgeschwindigkeit nach dem Autoklavieren pH-Wert-Schwankungen auf, die bei dem verwendeten Medium zwischen 5,5 und 6,0 lagen. Inwieweit sich Schwankungen dieser Größenordnung auf den Phenylpropanoidstoffwechsel auswirken, sollte in weiteren Untersuchungen betrachtet werden.

#### 3.4.3.2 Dynamik der Akkumulation der Phenylpropanoide

In allen Versuchen zeigte sich durch die Elicitation mit Hefefiltrat eine Steigerung der Gesamtphenol-Konzentration, was eine induzierte PAL-Aktivität voraussetzt (Abbildung 30, 45, 46). Da die Induktion der PAL eine der am häufigsten beobachteten pflanzlichen Reaktionen auf eine Vielzahl von Elicitoren ist, wie auch in Zellsuspensionkulturen von *Vitis vinifera* nach Behandlungen mit pilzlichen Elicitoren beobachtet wurde (REPKA et al. 2001, LISWIDOWATI et al. 1991), liegt es sehr nahe, dass auch in Kalluskulturen eine PAL-Stimulation durch Hefefiltrat auftritt. Da in Zellsuspensionskulturen schon 10 Minuten nach einer Elicitation die transkriptionelle Aktivierung der Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL), der 4-Cumarat-CoA-Ligase (4Cl), der Chalkonsynthase (CHS), der Chalkonisomerase (CHI) und verschiedener PR-Proteine einsetzte und diese nach 4 Stunden ihr maximales Transkriptionslevel erreichten (REPKA et al. 2001), ist die Voraussetzung für eine schnelle Biosynthese verschiedener Abwehr-Verbindungen gegeben. Die Transkription von 4Cl erfolgte etwas langsamer und erlangte ihr Maximum etwa 8 Stunden nach Elicitation. Eine Kalluskultur von SGARBI et al. (2003) zeigte nach einer Ozon-Begasung eine Induktion der Stilbensynthase-Aktivität, was in einer deutlichen Akkumulation von Resveratrol 12 bis 24

Stunden nach Begasung deutlich wurde. Auch BÉZIER et al. (2002) zeigten in mit *Botrytis cinerea* infizierten Weinblättern eine zunehmende Expression der PAL- und Stilbensynthase-Gene, sowie Polygalacturonase-hemmenden Protein- und VCH3-Chitinase-Genen 6 Stunden nach Inokulation, eine Expression von VCHIT1b-Chitinase-Genen verzögerte sich auf 24 Stunden nach Inokulation (BÉZIER et al. 2002), wobei die VCH3-Chitinase nur in Blättern gefunden wurde, die VCHIT1b-Chitinase jedoch in Blättern und Früchten. Auch BUSAM et al. (1997a) stellten in *Vitis vinifera*-Zellsuspensionskulturen wie auch JACOBS et al. (1999) in mehltauinfizierten Weinblättern eine schnellere Transkription von VCH3-Chitinase-Genen als von VCHIT1b-Chitinase-Genen fest. In diesem Fall wurden PR-Proteine später als Phytoalexine induziert. Mit Hefeextrakt behandelte Weinzellkulturen induzierten die VCH3-Chitinase-Gene zur gleichen Zeit wie die Stilbensynthase-Gene und zwar 2 Stunden nach Behandlung (BUSAM et al. 1997a, b).

Enzymatischen Untersuchungen von Frau Pfeiffer am Lehrstuhl für Zierpflanzenbau der Technischen Universität München-Weihenstephan bezüglich der Stimulation der PAL-Aktivität im Weinkallus „Nero“ durch Elicitation mit Hefefiltrat stehen noch aus.

Trotz der schnellen Verfügbarkeit von wichtigen Enzymen nahm der Gesamtgehalt der Phenylpropanoide innerhalb von 5 Stunden nach der Elicitation mit Hefefiltrat in den Weinkalli in Versuch 1 ab (Abbildung 30, 45, 46), in Versuch 3 dagegen zu (Abbildung 30). Ähnlich verhält es sich mit den Catechinen (Abbildung 31, 45, 47), den einfachen Phenolen, mit den Verbindungen Spektrum 2 (Abbildung 32, 45, 48), den Hydroxyzimtsäuren (Abbildung 33, 45, 50) sowie mit allen konstitutiv vorkommenden Stilbenen (Abbildung 38, 53). Nur das Gallussäure-Derivat B war 5 Stunden nach Elicitation mit Hefefiltrat in beiden Versuchen deutlich reduziert (Abbildung 33, 49).

Da keine Daten über Zustand vor den Behandlungen zur Verfügung stehen, könnte ein Grund für die, im Vergleich zu unbehandelten Kalli, verminderte Konzentration der elicitierten Kalli, in einer Stimulation der mit K2-Medium behandelten Kontrollvariante, also in der Zugabe frischer Nährlösung begründet sein. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass die Aktivität von PAL und/oder weiterer Enzyme im Frühstadium einer Elicitation gehemmt ist. In Versuch 3 könnte dieser Aktivitätsabfall der Enzyme schon in einen Aktivitätsanstieg umgeschlagen sein, während sich die Kalli in Versuch 1 noch in der ersten Phase befanden. Eine verminderte Synthese der Gallussäure könnte zusätzlich in einer verminderten Aktivität des Enzyms begründet liegen, welches die 3-Dehydroshikimisäure zu Gallussäure umwandelt, herbeigeführt durch eine bevorzugte Biosynthese dieser Vorstufe zu Phenylalanin (siehe Abbildung 82). Da eine Reaktionszeit von 5 Stunden sehr gering ist und

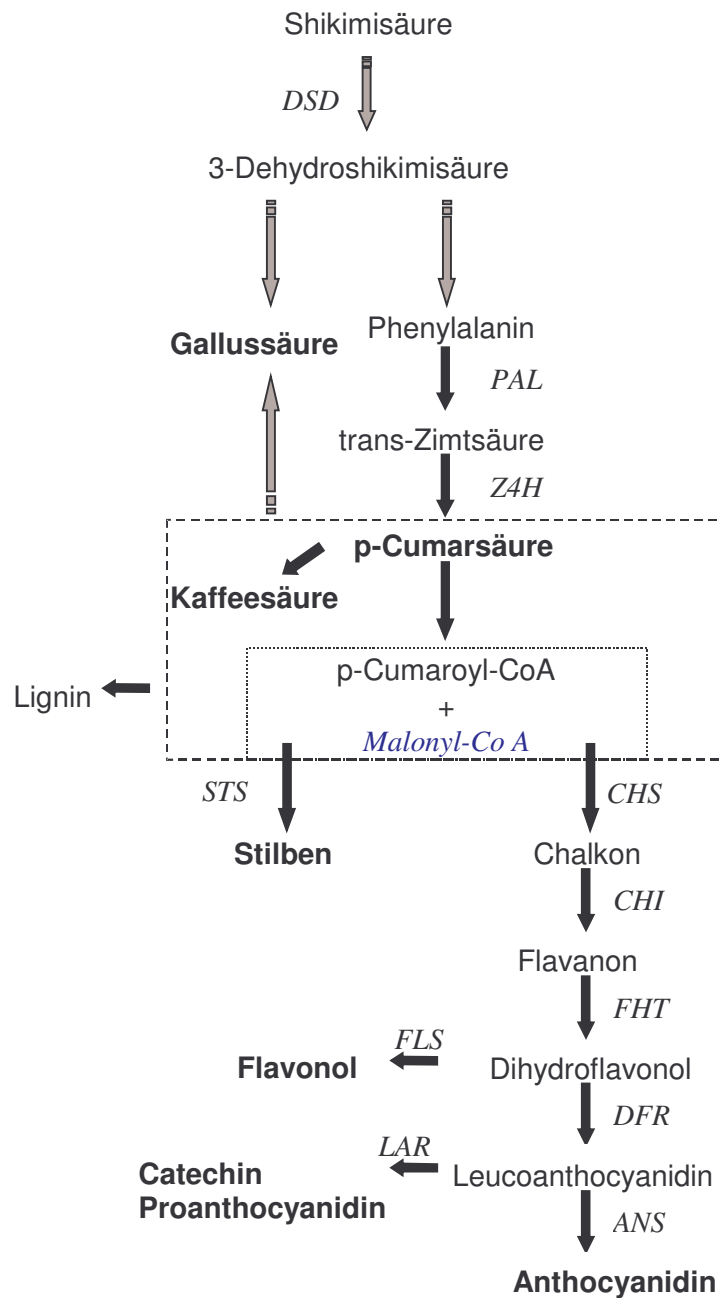


Abbildung 82: Schema: Auszug aus dem Phenylpropanoidstoffwechsel (Biosyntheseweg nach HELLER und FORKMANN 1994, JEANDET et a. 2002)

- DSD (Dehydroshikimi-dehydrase)
- PAL (Phenylalanin-Ammonium-Lyase)
- Z4H (Zimtsäure-4-hydroxylase)
- STS (Stilbensynthase)
- CHS (Chalkonsynthase)
- CHI (Chalkonisomerase)
- FHT (Flavanon 3-hydroxylase)
- FLS (Flavonolsynthase)
- LAR (Leucoanthocyanidin 4-reductase)
- DFR (Dihydroflavonol 4-reduktase)
- ANS (Anthocyan synthase)

sich zwischen Versuch 1 und Versuch 3 widersprüchliche Ergebnisse zeigen, kann auch ein systembezogener Fehler nicht ausgeschlossen werden.

Ab 10 Stunden nach der Elicitation lassen Akkumulationen unterschiedlicher Stoffgruppen in allen Versuchen auf eine Aktivierung verschiedenster Enzyme schließen.

### 3.4.3.3 Catechine

Da die Catechine zwischen 10 und 18% des gesamten Flavonoid Gehaltes ausmachen, ist es nicht verwunderlich, dass sich die Konzentrationsschwankungen der Catechine zwischen den einzelnen Entnahmetermen in vergleichbaren Schwankungen der Gesamtphenole widerspiegeln. Eine deutliche Akkumulation an Flavanolen, wie sie von FEUCHT et al. (1996) in Weinblättern nach einer Pilzinfektion beobachtet wurde, konnte 24 Stunden nach einer Elicitation von Weinkallus der Sorte „Regent“ mit 5% Hefefiltrat deutlich beobachtet werden (Abbildung 47). Behandlungen mit höherer Elicitorkonzentration führten zu weniger deutlichen Reaktionen, da die Akkumulation durch Elicitation vermindert war und große Konzentrationsschwankungen auftraten. Auf die möglichen von der Elicitorkonzentration abhängigen Akkumulationen wird später noch eingegangen.

Das verminderte Akkumulationsvermögen an Catechinen beim Weinkallus im Gegensatz zu Weinblättern könnte im Ursprungsgewebe begründet sein. Sogar im Blatt weisen die verschiedenen Gewebetypen unterschiedliche Akkumulationsfähigkeiten auf. Während die oberen Pallisadenzellen eines Blattes nach einer Pilzinfektion hohe Konzentrationen an Flavanolen aufweisen, sind die Flavanol-Konzentrationen in den darunter liegenden Parenchymzellen geringer. Die Epidermiszellen sind Flavanol frei (FEUCHT et al. 1996). Da die Kalluskulturen aus kambialem Gewebe der Sprossinternodien gewonnen wurden, könnte die Fähigkeit, Catechine zu synthetisieren, vermindert sein.

Das nicht eindeutig zu interpretierende Reaktionsvermögen von Catechinen bei den verwendeten Kalluskulturen auf eine Elicitation mit hoher Konzentration an Hefefiltrat könnte aber auch auf ungünstige Entnahmezeitpunkte beruhen. *Vitis vinifera*-Kalluskulturen können je nach Aktivität des Sekundärstoffwechsels eine spezifische Dynamik der Flavanole auf eine Elicitation zeigen (SGARBI et al. 2003). So reagierten polyphenolreiche Kalluslinien auf eine Elicitation innerhalb von 2 Stunden mit einer Reduktion des Flavanol-Gehaltes und anschließendem Angleichen auf das Ausgangsniveau wohingegen Kulturlinien mit vermindertem Phenolsynthesevermögen eine verzögerte Gehaltsreduktion erst 24–48 Stunden nach Elicitation zeigten. Durch unterschiedliches Reaktionsvermögen verschiedener Kulturlinien, könnte die Betrachtung des Flavanol-Gehaltes erst 5 Stunden nach einer Elicitation und anschließend in den hier gewählten Zeitintervallen, ein verfälschtes Bild der Synthesedynamik ergeben. Um die Kulturlinien bezüglich ihrer Flavanol-Dynamik exakter einordnen zu können, müssten daher, in den ersten zehn Stunden nach einer Elicitation stündlich und dann in 5-Stunden-Intervallen Probenahmen durchgeführt werden.

### 3.4.3.4 Hydroxyzimtsäure-Derivate und Benzoessäuren

Die Gruppe der Hydroxyzimtsäuren mit ihrem Hauptvertreter p-Cumarsäure-Derivat (Peak L) erfährt in allen Versuchen durch eine Elicitation mit Hefefiltrat eine Induktion ab 10 NHB, die bis 24 HNB weiter ansteigt, um dann zu stagnieren. Diese schnelle Induzierbarkeit von Hydroxyzimtsäuren, die auch KOLB et al. (2003) an Weintrauben nach UV-Bestrahlung feststellte, ist jedoch nur bei dem p-Cumarsäure-Derivat L festzustellen, nicht aber bei dem Kaffeesäure-Derivat AA (Abbildung 50). Dieser Akkumulation geht eine Erhöhung der PAL-Aktivität voraus, die eine vermehrte Synthese von Zimtsäuren ermöglicht, wie REGLINSKI et al. (1994) auch an mit Zellwandextrakten von *Saccharomyces cerevisiae* elicitierten Sojapflanzen beobachtet konnten. Eine Akkumulation von Zimtsäuren und ein ausreichendes Vorhandensein von Zimtsäure-4-Hydroxylase sind Voraussetzung für eine gesteigerte Metabolisierung von p-Cumarsäure. Die Induktion scheint unabhängig von der Elicitorkonzentration zu erfolgen, da an dem p-Cumarsäure-Derivat Peak L nach einer Elicitation mit 50 und mit 5% Hefefiltrat vergleichbare Konzentrationen ermittelt wurden. Es ist aber auch denkbar, dass das p-Cumarsäure-Derivat Peak L bei höherer Elicitorkonzentration eine gesteigerte Synthese erfährt, es jedoch gleich weiter zu Resveratrol metabolisiert wird und somit die durch eine höhere Elicitorkonzentration verursachte Akkumulationszunahme nicht erfasst wurde.

Da Kaffeesäure nicht akkumuliert wird, kann man entweder davon ausgehen, dass Kaffeesäure schnell weiter metabolisiert wird oder, dass die Anreicherung an p-Cumarsäure als Pool für weitere Verbindungen dominanter und dass die Hydroxylierung von p-Cumarsäure zu Kaffeesäure katalysierende Enzym in seiner Aktivität reduziert ist.

Das Gallussäure-Derivat ist im Weinkallus schon konstitutiv in großen Mengen vorhanden, es wird jedoch nur geringfügig durch eine 50%ige Hefefiltratbehandlung induziert (Abbildung 49). Auffallend ist die deutlich gesteigerte Induktion durch eine 5%ige Hefefiltratbehandlung. Wenn eine niedrige Hefekonzentration die Akkumulation von Gallussäure elicitiert, so ist es wahrscheinlich, dass der Kallus durch eine höhere Hefekonzentration ein vergleichbares Elicitorsignal bekommt. Scheinbar induziert eine hohe Elicitorkonzentration die Verschiebung des Stoffwechsels in Richtung Resveratrol-Derivate, so dass der Biosynthese der Gallussäure-Derivate, über den Zwischenschritt Zimtsäuren, weniger Substrat zur Verfügung steht.

Die Ursachen für die Akkumulation der Gallussäure nach der Elicitation könnten entweder in einer gesteigerten PAL-Aktivität verbunden mit zunehmender Synthese der p-Cumarsäure, die über Kaffeesäure und Protocatechusäure zu Gallussäure weiter metabolisiert wird oder in einer Induktion der Aktivität des Enzyms, das die 3-Dehydroshikimisäure zu Gallussäure katalysiert, liegen. Die erste These würde das Fehlen von Akkumulationsreaktionen des Kaffeesäure-Derivat Peak AA erklären, indem diese Verbindung schnell weiter metabolisiert

werden könnte. Die Protocatechusäure erfuhr wie die Gallussäure durch eine niedrige Elicitorkonzentration eine stärkere Akkumulation, was ihr Auftreten als Zwischenprodukt bestätigen würde (Abbildung 51).

#### **3.4.3.5 Einfache Phenole und Spektrum 2**

Aufgrund der stetigen Akkumulation der Verbindungen von Spektrum 2 mit zunehmender Elicitationsdauer in allen Versuch (Abbildung 32, 48) und bei beiden Weinsorten („Regent“ und „Nero“), ist eine chemische Verwandtschaft zu den Resveratrol-Derivaten wahrscheinlich. Allerdings konnten, bedingt durch die der geringen Konzentrationen der einzelnen Verbindungen dieser Stoffgruppe, keine genauere Identifikationen durchgeführt werden.

Das einfache Phenol Peak A weist sowohl bei der geringen als auch bei der hohen Hefefiltrat-Konzentration zwischen 10 und 24 Stunden nach Behandlung einen deutlichen Konzentrationseinbruch auf (Abbildung 48). Dieser wird bei Verwendung der geringen Filtratkonzentration von einem deutlichen Konzentrationsanstieg der Catechine (Abbildung 47) und bei der hohen Filtratkonzentration von einem deutlichen Anstieg an Resveratrol (Abbildung 53) begleitet.

#### **3.4.3.6 Monomere Resveratrol-Derivate**

Da in Weinblättern nur sehr lokal – in einem etwa 3–6 mm breiten Saum des noch nicht nekrotischen Gewebes um eine Pilzläsion herum – die höchsten Konzentrationen an Resveratrol-Derivaten messbar sind (STEIN und HOOS 1984), weiter von der Infektionsstelle entferntes Gewebe jedoch keine Resveratrol-Derivate aufweist, scheinen diese Verbindungen direkt für den Versuch der Pathogenabwehr synthetisiert zu werden. Dies zeigt sich auch in der schnellen Synthese von Resveratrol, die im Weinkallus schon 10 Stunden nach einer Behandlung mit Hefekulturfiltrat zu einer deutliche Akkumulation von trans-Resveratrol führte und die ihr Maximum 24 Stunden nach Behandlung erreichte (Abbildung 37, 53). Auch bei einer Induktion von Weinblättern mit UV-Strahlen wurden die höchsten Resveratrol-Gehalte 24–48 Stunden nach Inokulation gefunden (STEIN und HOOS 1984).

Die nach einer Elicitation mit 50% Hefefiltrat parallel verlaufende Stoffdynamik von trans-Resveratrol und p-Cumarsäure-Derivat (Peak L) (Abbildungen 53 und 50) unterstreicht die Stellung des p-Cumarsäure-Derivates als Vorstufe des Resveratrol. Dass die Akkumulation von Piceid, und somit auch die von Resveratrol, von der Verfügbarkeit von Phenylalanin als Substrat abhängig ist, zeigten schon KRISA et al. (1999), die durch eine Zugabe von 2 mM Phenylalanin ins Kulturmedium von *Vitis vinifera* Zellkulturen eine Erhöhung der Piceid-Konzentration um das 1,4 fache feststellten.



Nach der Metabolisierung wird zunächst das Aglykon Resveratrol angereichert und dann vermehrt zu mono- und oligomeren Verbindungen derivatisiert, was zu einer Reduktion des Resveratrol-Pools 48 Stunden nach Behandlung führt. Um eine direkte Glucosidierung des Resveratrols zu Piceid zu verhindern, sind  $\beta$ -D-Glucosidasen notwendig (JEANDET et al. 1997a).

Trans- und cis-Piceid sind Resveratrol-Derivate, die im Gegensatz zum Aglykon konstitutiv und ohne große Streuung im Kallus vorkommen. Dabei kann der Umstand, dass in UV-bestrahlten Weintrauben ein, im Vergleich mit cis-Piceid, 40-fach höherer Gehalt an trans-Piceid gefunden wurde (ADRIAN et al. 2000b), nicht ohne weiteres auf die Kalluskulturen „Nero“ und „Regent“ übertragen werden. Im Weinkallus lag sowohl der konstitutive als auch der induzierte Gehalt von trans-Piceid nur unwesentlich über dem von cis-Piceid (Abbildung 38, 53) oder war maximal doppelt so hoch. Diese Werte stehen mit den von WAFFO-TEGUO et al. (1996a, 1998) in *Vitis vinifera*-Zellsuspensionskulturen gefundenen Gehalten im Einklang

Auch ein mengenmäßiger Anteil der Piceide an der Summe der konstitutiven Resveratrol-Derivate von 90–95%, wie von KRISA et al. (1999) in phenolreichen *Vitis vinifera*-Zellkulturlinien ermittelt, wird in Kalluskulturen der Sorten „Regent“ und „Nero“ nicht erreicht. In allen Versuchen wiesen sie bei der Sorte „Regent“ einen Gesamtanteil von etwa 40% (Vergleich Abbildungen 30 und 38) und bei „Nero“ sogar nur von 26% auf.

Da in unbehandelten Weinkalli nur geringe Konzentrationen des Aglykons trans-Resveratrol zu finden waren, schienen die Kalli die glucosidierten Resveratrol-Derivate als konstitutive Speicherform zu bevorzugen. Da Methyljasmonat in *Vitis vinifera*-Zellsuspensionskulturen die Akkumulation von Piceid deutlich induziert, die Synthese von Astringin und Resveratrol jedoch nicht beeinflusst wurde (KRISA et al. 1999), scheint die Konzentration von Signalstoffen wie Methyljasmonat direkt mit der Glucosidierung in Zusammenhang zu stehen. Durch eine Elicitation mit Hefefiltrat wird die sofortige Glucosidierung von Resveratrol unterbunden, so dass das Aglykon akkumulieren kann und somit für die Metabolisierung der verschiedenen Derivate zur Verfügung steht.

Das ebenfalls konstitutive Vorkommen des trans-Resveratrol-Derivats Peak T und der wahrscheinlich entsprechenden cis-Variante Peak Y in Verbindung mit ihrem, dem Piceid ähnlichen Akkumulationsverhalten nach einer Hefefiltratbehandlung, deutet auf eine stoffliche Verwandtschaft der Verbindungen hin (Vergleich Abbildung 38 und 39).

#### **3.4.3.7 Oligomere Resveratrol-Derivate**

Eine gegenüber Resveratrol um 24 Stunden verzögerte Synthetisierung von Viniferinen, wie sie STEIN und HOOS (1984) sowie CANTOS et al. (2002) in Blättern von *Vitis vinifera*

feststellten, konnte im Weinkallus von „Nero“ und „Regent“ bestätigt werden. Allerdings konnten PEZET et al. (2003b) nach UV-C-Bestrahlungen an Weinblätter, keine zeitlichen Verschiebungen in der Resveratrol- und  $\epsilon$ -Viniferin-Akkumulation feststellen.

Für eine Polymerisation von Resveratrol-Derivaten werden Peroxidasen benötigt, wie sie HOOS und BLAICH (1988) nach einer Elicitation mit abgetötetem *Botrytis cinerea*-Myzel in *Vitis vinifera*-Zellsuspensionskulturen nachwiesen. Dabei fanden sie gleich zwei Peroxidase-Typen mit hoher Affinität zum Substrat Resveratrol, die die Fähigkeit besaßen, Viniferin zu metabolisieren. Viniferin schien dabei das Zwischenprodukt einer Oxidation zu einem braunen Pigment zu sein. Da die Resveratrol-Oxidationsprodukte wiederum eine hemmende Wirkung auf die Peroxidasen haben, könnte eine Selbsthemmung und damit eine direkte Regulierung der Peroxidasekonzentration vorliegen.

#### 3.4.3.8 Anthocyane

Eine Behandlung mit einer hohen Kulturfiltrat-Konzentration führte in Versuch 1 schon 5 Stunden nach Elicitation zu einem Abfall des Gehaltes von Anthocyanidin Peak II, der bis 48 Stunden nach Behandlung konstant vermindert blieb (Abbildung 36, 52). Eine Elicitation mit niedriger Filtrat-Konzentration rief eine kurzfristige Induktion mit anschließend kontinuierlichem Abfall des Gehaltes (Abbildung 52) hervor. 48 Stunden nach Behandlung wiesen die Kalli bei beiden Filtratbehandlungen vergleichbar reduzierte Konzentrationen des Anthocyanidin Peak II auf. Ein verminderter Gehalt nach Anwendung der höheren Hefefiltrat-Konzentration war auch bei dem Anthocyanidin BB zu beobachten.

Eine Reduktion der Anthocyanidin-Synthese bei gleichzeitig gesteigertem Phenylalanin-Gehalt durch eventuelle Reduktion der ANS-Aktivität (Anthocyan synthase) kann mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, da bei KRISA et al. (1999) eine Zugabe von Phenylalanin zu *Vitis vinifera*-Zellsuspensionskulturen zu einer Induktion der Anthocyane führte.

Es ist anzunehmen, dass nicht die behandelten Kalli mit einer schnellen Verminderung der Konzentration, sondern die unbehandelten Kalli, versorgt mit frischem K2-Medium zuzüglich 5 g Glucose pro Liter als Kontrollvariante, innerhalb von 5 Stunden mit einer Akkumulation reagierten. Dieser Konzentrationsanstieg der Kontrollvariante war auch in Versuch 3 zwischen 5 und 10 Stunden nach der Behandlung zu beobachten (Abbildung 36).

Da sich schon KRISA et al. (1999) und VITRAC et al. (2001b) bei der Kultivierung von *Vitis vinifera*-Zellsuspensionskulturen eine Akkumulation von Anthocyanen durch gesteigertes Saccharose- und Makronährstoff-Angebot im Kulturmedium zu Nutze gemacht hatten, liegt es nahe, die Akkumulation von Peak II auf diese Einflussgrößen zurück zu führen. Auch LARRONDE et al. (1998) interpretierten die Korrelation zwischen der Anthocyanidin-

Akkumulation in Weinzellen und dem intrazellulären Hexosegehalt (Glucose und Fructose) als zuckerabhängige Expression der Chalkonsynthase-Gene.

Sowohl ein gesteigerter Saccharosegehalt als auch höhere Makronährstoffkonzentrationen, sind durch die Zufuhr frischer Nährlösung zur Kalluskultur bei der Kontrollbehandlung gegeben. Durch eine 48-stündige Kultivierung der Hefeisolate auf dem Kulturmedium, müssten sowohl ein Teil der Makronährstoffe als auch die Kohlenstoffquellen im Medium von den Hefezellen verstoffwechselt worden sein, so dass diese Einflussfaktoren nur noch einen geringen Einfluss auf das Ergebnis der Hefebehandlung haben. Da bei der Behandlung mit 5% Hefefiltrat, die Verdünnung des Filtrates ebenfalls mit K2-Medium zuzüglich 5 g Glucose pro Liter durchgeführt wurde, ist die hinsichtlich Induktionsverhalten festgestellte Mittelstellung dieser Behandlung, die sich in einer kurzzeitigen Stoffakkumulation und anschließend, kontinuierlichem Abfall der Konzentration bis auf das Niveau der mit 50% Hefefiltrat behandelten Variante darstellt, wie schon bei der Kontrollvariante, durch Nährstoffzufuhr erklärbar.

#### **3.4.4 Einfluss der Elicitorkonzentration auf den Phenylpropanoidstoffwechsel**

Obwohl in Versuch 1 die Elicitorkonzentration keinen Einfluss auf die Summe der Phenylpropanoide zu nehmen schien (Abbildung 45, 46), reagierten die einzelnen Stoffklassen doch ganz individuell auf verschiedene Elicitorstärken (Abbildung 45). Das würde für eine, von der Elicitorkonzentration unabhängige Aktivierung der PAL bei gleichzeitiger konzentrationsabhängiger Steuerung der weiteren Biosynthese, sprechen. Dieser Zusammenhang wird durch Korrelationen zwischen der Induzierbarkeit der PAL-Aktivität und sowohl der Zellzahl der Suspensionskultur als auch der Elicitorkonzentration in Zellkulturen von *Vitis vinifera* gestützt (FUNK et al. 1987).

Während die Protocatechusäure (Abbildung 51), aber noch deutlicher das Gallussäure-Derivat B (Abbildung 49) genauso wie die monomeren und oligomeren Catechine (Abbildung 45, 49) stärker bei verminderter Elicitorkonzentration akkumulierten und Hydroxymitsäuren (Abbildung 45, 50) und Flavonole (Abbildung 45, 52) bei beiden Elicitorkonzentration vergleichbare Gehalte aufwiesen, reagierten die einfachen Phenole und die Verbindungen mit Spektrum 2 (Abbildung 48) auf eine höhere Elicitorkonzentration mit zunehmender Akkumulation. Dies zeigte sich bei allen Resveratrol-Derivat noch deutlicher (Abbildungen 45, 53–56).

Alle Resveratrol-Derivate akkumulierten bei höherer Elicitorkonzentration deutlich stärker als bei geringerer Konzentration. Auch in Zellsuspensionskulturen von *Vitis ripariabei* führte eine gesteigerte Induktorkonzentration zu einer vermehrten Akkumulation von Resveratrol. Die Synthese von  $\epsilon$ -Viniferin verlief hingegen unabhängig von der Konzentration (STEIN und HOOS 1984).

Sowohl die Resveratrol-Derivate als auch das p-Cumarsäure-Derivat Peak L müssen durch beide Elicitorkonzentrationen (5% und 50% Hefefiltrat) gleiche Induktionen der jeweils katalysierenden Enzyme (PAL und Zimtsäure-4-hydroxylase bzw. Stilbensynthase) erfahren, da vergleichbare Stoffakkumulationen sowohl bei der p-Cumarsäure als auch bei Resveratrol bis 10 Stunden nach Behandlung, bei den Resveratrol-Derivaten bis 24 Stunden nach Behandlung feststellbar waren (Abbildungen 50, 53–56). Dabei bewirkte eine Verminderung der Elicitorkonzentration eine verzögerte, aber in ihrem Maximum vergleichbare Akkumulation des p-Cumarsäure-Derivates Peak L. Eine verminderte Elicitorkonzentration bewirkte ein früheres Stagnieren der Akkumulation von Resveratrol-Derivaten.

#### **3.4.4.1 Akkumulationsdynamik von Resveratrol und dessen Derivate**

Die schnelle Akkumulation von Resveratrol wird durch die schnelle Transkription von Stilbensynthase ermöglicht. Schon 6 Stunden nach einer Elicitation zeigte sich durch Inokulationen mit *Phytophthora cambivora* (WIESE et al. 1994) oder Zellwänden von *Botrytis cinerea* (LISWIDOWATI et al. 1991) in *Vitis vinifera*-Zellsuspensionskulturen eine erste maximale Akkumulation von mRNA. Ein weiteres Transkriptionsmaximum erfolgte 20 Stunden nach einer Elicitation. Diese Enzymdynamik führte zu einer ersten Resveratrol-Akkumulation bei UV-bestrahlten *in vitro*-Weinblättern 8 bis 12 Stunden nach der Induktion und zeigte ein weiteres Akkumulationsmaximum nach 22 bis 24 Stunden, bzw. nach 20 und 40 Stunden in Freiland-Weinblättern (DOUILLET-BREUIL et al. 1999).

Diese beiden Stilbensynthase-Maxima werden durch verschiedene Gene hervorgerufen (WIESE et al. 1994), von denen das erste für eine schnelle Expression mittels degradationsanfälligeren mRNA verantwortlich ist und das zweite eine spätere Expression mit stabilerer mRNA hervorruft.

Dabei könnte das erste Resveratrol-Maximum der schnellen Pathogenabwehr dienen. Eine Weitersynthese bliebe aufgrund fehlender Enzyme zu diesem Zeitpunkt aus. Dies würde die Anreicherung von Resveratrol innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Elicitation erklären.

Das zweite Maximum der Resveratrol-Akkumulation könnte für die Metabolisierung von Resveratrol-Derivaten bestimmt sein, die eine höhere fungizide Wirksamkeiten ausweisen als das Aglykon selbst und somit für eine langfristige oder wirksamere Pathogenabwehr bestimmt sind. 24 Stunden nach der Elicitation mit Hefefiltrat akkumulieren die Kalli nicht nur vermehrt Resveratrol, sondern es beginnen sich auch Resveratrol-Glycoside, sowie dimere und oligomere Verbindungen, die auf Resveratrol basieren, anzureichern. Scheinbar stehen zu diesem Zeitpunkt ausreichend Enzyme zur Verfügung, um diese Metabolisierung zu ermöglichen. Die verminderte Konzentration an Resveratrol 48 Stunden nach Elicitation mit Hefefiltrat in Versuch 1 deutet auf eine Reduzierung des Resveratrol-Pools durch

zunehmende Synthese von anderen Resveratrol-Derivaten, besonders den oligomeren Derivaten, hin.

Da sowohl eine Behandlung mit 5 als auch mit 50% Hefefiltrat eine schnellen Synthese von Resveratrol und den daraus metabolisierten Derivaten in den Weinkalli induziert (Abbildungen 53–56), scheint das Signal zur Aktivierung der Stilbensynthese, schon bei der niedrigen Elicitorkonzentration, ausreichend gegeben zu sein. Warum trotz Induktion der Stilbensynthese die geringe Elicitorkonzentration zu einer Stagnation des Gehaltes von Resveratrol und die höhere zu einer fortschreitenden Akkumulation führte, ist zu diesem Zeitpunkt nicht zu interpretieren.

#### **3.4.4.2 Resveratrolakkumulation in Abhängigkeit von der Elicitorkonzentration**

##### **Sekundäre Elicitation**

Toxische Verbindungen könnten in einer Behandlung mit 50% Hefefiltrat in so hohen Konzentrationen auftreten, dass es zu Zellschädigungen führen könnte. Würden dadurch freigesetzte endogene Elicitoren eine sekundäre Elicitation auslösen, käme es zu einer zusätzlichen Aktivierung der PAL-Aktivität (GUO et al. 1997). Diese Enzymakkumulation würde sich in einer Erhöhung der Gesamtphenole niederschlagen, was jedoch nicht beobachtet wurde (Abbildung 45). Zum anderen würden Zellschädigungen, die zu einem vermehrten Vorhandensein von Peroxidasen führen, möglicherweise eine gesteigerte Metabolisierung von oligomeren Resveratrol-Derivaten mit sich führen. Die deutliche Akkumulation von Resveratrol wäre damit jedoch nicht zu erklären, da Resveratrol nicht durch mechanische Verletzungen am Gewebe induzierbar ist (STEIN und HOOS 1984).

##### **Stilbensynthese als Schaltstelle der Resveratrolakkumulation**

Durch eine höhere Elicitorkonzentration wurden in den Weinkalli bei gleichbleibendem Gesamtgehalt vermehrt Verbindungen synthetisiert, die auf eine Aktivierung der Stilbensynthese basieren. Flavonoide, denen eine Reaktion der Chalkonsynthese zu Grunde liegt, wurden parallel dazu weniger akkumuliert. Somit werden vermehrt Resveratrol-Derivate synthetisiert, Flavonole, Anthocyane und Catechine erfahren eine verminderte Akkumulation (Abbildung 45). Eine verminderte Elicitorkonzentration dreht die Syntheserichtung im Phenylpropanoidstoffwechsel um. Die Metabolisierung von p-Cumarsäure entweder zum Chalkon oder zum Stilben kann somit als Schaltstelle angesehen werden, dessen Syntheserichtung offenbar von der Elicitorkonzentration abhängig ist.

Da die Vorstufe von Resveratrol, das p-Cumarsäure-Derivat Peak L, schon nach einer Elicitation mit 5% Hefefiltrat in ausreichenden Mengen vorhanden ist, folglich also genügend Enzyme wie PAL, Zimtsäure-4-hydroxylase und 4Cl gebildet wurden, ist die verminderte

Synthese von Resveratrol in einem unzureichenden Vorhandensein von Stilbensynthese zu suchen.

Sollte die Transkription aller Enzyme über den gleichen Rezeptorimpuls ausgelöst worden sein, scheint eine verminderte Signalstoffkonzentration bei 5% Filtrat eine kürzere Transkriptionsdauer der Stilbensynthese hervorzurufen zu haben als eine höhere Konzentration der Signalstoffe bei 50% Filtrat. Andere Enzyme scheinen unabhängig von der Elicitorkonzentration induziert zu werden, da Catechine oder Hydroxyzimtsäuren bei beiden Filtratkonzentrationen vergleichbare Akkumulationen aufwiesen.

Diese Akkumulationsunterschiede bei verschiedenen Enzymen könnten in eine variierende Sensitivität begründet liegen. Vergleichbare Ergebnisse fanden auch VITRAC et al. (2001b), die nach einer Behandlung von *Vitis vinifera*-Zellkulturen mit Methyljasmonat zwar bei den Gesamtstilbene eine Verdoppelung, bei den Anthocyanen und Catechinen jedoch nur eine Akkumulation um rund 20%, feststellten.

Es besteht außerdem die Möglichkeit, dass die Induktion der Enzyme über unterschiedliche Rezeptorsysteme erfolgt. So reagierten phenolreiche, braun-pigmentierte Weinkalli von Blattexplantaten der Sorte „Lambrusco salamino“ auf eine Ozonbegasung, schon 2 Stunden nach Behandlung, mit einer signifikanten Zunahme der PAL-Aktivität. Eine Induktion der Stilbensynthese blieb in dieser Kulturlinie jedoch aus. Gegenläufig verhielt es sich bei einer phenolärmeren, wenig pigmentierten Kalluslinie der gleichen Weinsorte (SGARBI et al. 2003). Eine Signalgebung durch Salicylsäure induzierte bei Tomatenpflanzen eine systemische Resistenz (THALER et al. 1999). Behandlungen von Pflanzen mit Jasmonsäure führten zu einer reduzierten Genexpression an pathogenspezifischen Proteinen.

Durch eine reduzierte Menge Stilbensynthese wird weniger Substrat, p-Cumarsäure-Derivat Peak L, zu Resveratrol metabolisiert und steht somit der Synthese durch die Chalkonsynthese zur Verfügung. Sollte die Stilbensynthese eine höhere Affinität zur p-Cumarsäure aufweisen als die Chalkonsynthese, wäre damit die deutliche Verschiebung des Stoffwechsels in Richtung Resveratrol-Bildung nach Elicitation mit 50% Hefefiltrat, die eine größere Menge an Stilbensynthese bereitstellt, zu erklären.

Bestehen zwischen Stilbensynthese und Chalkonsynthese jedoch keine Affinitätsunterschiede, führt eine höhere Elicitorkonzentration möglicherweise zu einer verstärkten Transkription der Stilbensynthese bei gleichzeitig verminderter Transkription der CHS. Dies würde auch die reduzierte Biosynthese an Flavonolen, Catechinen und Anthocyanen erklären.

### **Expriemierung nur eines Stilbensynthese-Gens**

Bei der Induktion der Stilbensynthese werden zwei unterschiedliche Gene zu verschiedenen Zeitpunkten aktiviert (WIESE et al. 1994, DOUILLET-BREUIL et al. 1999).

Da auch eine niedrige Elicitorkonzentration zu einer Akkumulation von Resveratrol-Derivaten führte, könnte man die Hypothese aufstellen, dass die Behandlung mit der niedrigen Elicitorkonzentration das Gen für die schnelle Transkription der Stilbensynthese mRNA aktiviert, dass die Konzentration jedoch nicht ausreicht, um das Signal für eine Aktivierung des zweiten Gens auszulösen. Diese Theorie würde die Induktion von Resveratrol durch beide Elicitorkonzentrationen und ihr zu einem späteren Zeitpunkt unterschiedliches Akkumulationsverhalten – bei geringer Elicitorkonzentration stagnierende Gehalte, bei hoher eine weitere Akkumulation – erklären (Abbildungen 53-56).

Pflanzen mit verschiedenen Resistenzpotentialen können in der Akkumulationsdynamik Varianzen aufweisen, wie es BORIE et al. (2004) bei *in vitro* kultivierten *Vitis rotundifolia*-Pflanzen zeigten. Dabei wies eine Mehltau-tolerante Sorte eine konstante Expression der Stilbensynthese auf, die anfällige Sorte hingegen zeigte zwei Expressions-Peaks mit analoger Resveratrolakkumulation.

### **Kreuzreaktionen von Chalkon- und Stilbensynthese**

Die Chalkon- und die Stilbensynthese in *Aracis hypogea* (SCHRÖDER et al. 1988) sind zu 75% identisch und unterscheiden sich nur in 35 Aminosäurepositionen voneinander. Beide Enzyme verwenden das gleiche Substrat und rufen gleiche kondensierende Enzymreaktionen hervor, führen dabei jedoch zu verschiedenen Produkten. Wenn sich die unterschiedlichen Aminosäurepositionen im inaktiven Bereich des Enzyms befinden sollten, wäre es denkbar, dass beide Enzyme in das jeweils andere umwandelbar sind. Diese Hypothese wird durch auftretende Kreuzreaktionen in transformierten *Escherichia coli* (YAMAGUCHI et al. 1999) gestärkt, bei denen eingeschleuste Chalkon- und Stilbensynthese-Gene auch in der Lage waren, das jeweils andere Endprodukt zu synthetisieren.

Ein bisher unbekannter Einflussfaktor, der in der Behandlung mit 50% Filtrat auftritt, würde dann die Umwandlung in Richtung Stilbenmetabolismus ausrichten.

Um genauere Aussagen bezüglich der Induktionsdynamik und den enzymatischen Steuermechanismen machen zu können, müssten sowohl qualitative als auch quantitative Untersuchungen der Genexpressionsdynamik erfolgen.

### **3.4.5 Einfluss des Hefestammes auf die Phenylpropanoid-Akkumulation**

Das verwendete Hefeisolat 10/8 wies die niedrigste Induktionsrate der Gesamtphenole auf (Abbildung 57). Das Isolat S 3.2 führte 24 Stunden nach der Behandlung zu der deutlichsten Akkumulation an Phenylpropanoiden. Obwohl beide Isolate vergleichbare Konzentrationen des p-Cumarsäure-Derivats Peak L (Abbildung 58) induzierten, bewirkte das Isolat S 3.2, innerhalb der ersten 10 Stunden nach Behandlung, eine deutliche Akkumulation an Flavanolen, während das Isolat 10/8 keine induzierende Auswirkungen auf die Gehalte an

mono- und oligomeren Catechinen hatte (Abbildung 57). Ferner zeigte sich die Tendenz, dass das Isolat 10/8 eine schnellere Resveratrol-Akkumulation in den Kalli induziert, dass die maximal induzierte Konzentration aber niedriger bleibt als bei den übrigen Isolaten. Es liegen also bei den verschiedenen Hefeisolaten unterschiedliche Induktionspotentiale vor, die sich nicht ausschließlich auf höhere oder niedrigere Induzierbarkeiten beschränken, sondern die spezifische Reaktionen auslösen können.

### **3.4.6 Einfluss von Stickstoff auf die Weinkalli**

Stickstoff ist ein wichtiger Bestandteil zahlreicher Pflanzeninhaltsstoffe und erfüllt eine Vielzahl von Funktionen. Dabei hat Stickstoff nicht nur starken Einfluss auf die Nährstoffaufnahme und -verteilung in der Pflanze, sondern beeinflusst auch ihren Wasserhaushalt. Dieser Baustein organischer Verbindungen und Hauptbestandteil von Eiweiß, DNA, RNA sowie einiger Pflanzenhormone, ist auch in organischen Basen, Enzymen, Vitaminen und im Chlorophyll enthalten (SCHOLZ und HELM 2000) (siehe Abbildung 84). Die Stickstoffkonzentration muss somit Einfluss auf den Primär- und Sekundärstoffwechsel haben (Rühmann et al. 2002, 2003).

#### **3.4.6.1 Die Stickstoffform als Einflussfaktor auf den Primärstoffwechsel**

Auch die Stickstoffform beeinflusst die Entwicklung der Pflanzen. ALLAN et al. (1994) stellten eine Biomassenproduktion bei  $\text{NO}_3$  gedüngten Preiselbeeren fest, die 30 bis 100% geringer waren, als bei  $\text{NH}_4$  gedüngten und die, mit der Veränderung des pH-Wertes in der pflanzennahen Umgebung in Zusammenhang gebracht wurde. Während Ammonium eine pH-Senkung im Boden bewirkt, führt Nitrat zu einer Erhöhung (SCHOLZ und HELM 2000). Um die Veränderungen des pH-Wertes möglichst gering zu halten, wurden Stickstoff-Modifikationen der Kallusmedien vorwiegend mit einer Kombination aus beiden, dem Ammoniumnitrat, vorgenommen.

Die schon durch den Autoklaviervorgang erfolgten geringen pH-Wert-Absenkungen bei  $\text{N}_{1/2}$  (950 mg/l  $\text{KNO}_3$ ) bis  $\text{N}_3$  (4950 mg/l  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  und 1900 mg/l  $\text{KNO}_3$ ), verstärkten sich durch eine 14-tägige Kultur der Kalli auf diesen Medien. Es bestand jedoch kein linearer Zusammenhang zwischen Biomassenproduktion und pH-Wert des Mediums. In Versuch 1 bildeten die Kalli der unbehandelten Variante auf  $\text{N}_3$ -Medium die geringste Biomasse (Abbildung 67). Die Frischmassen der Kalli auf  $\text{N}_{1/2}$ -Medium und  $\text{N}_1$ -Medium (1650 mg/l  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  und 1900 mg/l  $\text{KNO}_3$ ) unterschieden sich in diesem Versuch nicht voneinander, Aber genau zwischen  $\text{N}_{1/2}$  und  $\text{N}_1$  war der Abfall der pH-Werte am größten (Abbildung 76). Scheinbar bewegten sie sich jedoch in einem Toleranzbereich, der ein optimales Wachstum der Kalli zuließ, der aber beim  $\text{N}_3$ -Medium unterschritten war und so zu einem verminderten Wachstum führte.



### 3.4.6.2 Stickstoffkonzentration als Einflussfaktor auf den Primärstoffwechsel

In vielen Untersuchungen wurde beschrieben, dass ein vermindertes Stickstoffangebot zu einer Abnahme der Biomasseproduktion führt (ESTIARTE et al. 1994; HAKULINEN et al. 1995). Das Kallusgewicht der auf N $\frac{1}{2}$ -Medium kultivierten Kalli zeigte jedoch gegenüber den höher stickstoffversorgten Kalli kein vermindertes Wachstum, weshalb auch nicht von einer N-Mangel-Variante gesprochen werden konnte.

Die Ursachen für einen verminderten Primärstoffwechsel bei auf N3-Medium kultivierten Kalli, könnte in einer ungünstigen Stickstoffform begründet liegen (ALLAN et al. 1994). Aber auch sekundärer Salzstress, resultierend aus zu hohen Stickstoffkonzentrationen, wäre als Ursache denkbar. Der Theorie einer beschleunigten Alterung der Zellen mit schnellerem Abschluss der Zellteilung, wie es RENNER und HELM 2000 bei übermäßig mit Stickstoff gedüngten Apfelbäumen beobachteten, spricht die, im Vergleich mit den anderen N-Varianten, deutlich gesteigerte Induzierbarkeit des Sekundärstoffwechsels entgegen. Möglicherweise liegt die Ursache aber auch in einem für die Kalluszellen zu niedrigem pH-Wert im Kulturmedium. Die pH-Werte der Kulturmedien betragen nach 2 Wochen im N $\frac{1}{2}$ -Medium 5,6; im N1- 5,2 und im N3- 4,9).

### 3.4.6.3 Stickstoffkonzentration als Einflussfaktor auf den Sekundärstoffwechsel

Während Benzoesäuren, Flavonole und Anthocyane mit zunehmendem Stickstoffangebot im Medium abnahmen, wiesen einfache Phenole ein gegenläufiges Syntheseverhalten auf. Bei diesen Stoffgruppen bestand ein nahezu linearer Zusammenhang zwischen N-Angebot im Medium und Stoffsynthese (Abbildung 71). Ähnliche Wechselwirkung zwischen N-Verfügbarkeit und Sekundärstoffwechsel bei *Vitis vinifera* fanden auch BAVARESCO et al. (1994). Bei schwach bis mittel Stickstoff gedüngten Reben zeigte sich eine lineare Regression zwischen N-Verfügbarkeit und Resveratrol-Synthese. Ein erhöhter Resveratrol-Gehalt war verbunden mit einem verminderten Befall mit *Botrytis cinerea*, *Oidium*, *Plasmopara* (BRAVARESCO und EIBACH 1987) oder *Uncinula necator* (KELLER et al. 2003).

Die Akkumulation der einfachen Phenole in den Weinkalli nahm mit gesteigertem Stickstoffangebot zu und war auf dem N3-Medium am größten (Abbildung 71, 72). Sowohl die Catechine (Abbildung 70) als auch die Resveratrol-Derivate (Abbildungen 73–75) wiesen in N1-versorgten Kalli die geringsten Konzentration auf. Sowohl das höhere (N3) als auch das geringere (N $\frac{1}{2}$ ) Stickstoffangebot im Medium führte zu einer Stimulation des konstitutiven Gehaltes dieser Stoffgruppen. Beim geringeren Angebot war die Akkumulation stärker ausgeprägt. Da Resveratrol und auch seine Derivate als Stressmetaboliten gelten und auch Catechine vielfach nach Pathogenbefall im Infektionsbereich angereichert werden (LYR 1965; MACE et al. 1978; VANCE et al. 1980; SCALBERT 1991; TREUTTER 1991; FEUCHT et

al. 1996) könnte man eine vermehrte Synthese beider Stoffgruppen sowohl bei auf N $\frac{1}{2}$ - als auch auf N3-Medium kultivierten Weinkalli als Stressreaktion deuten.

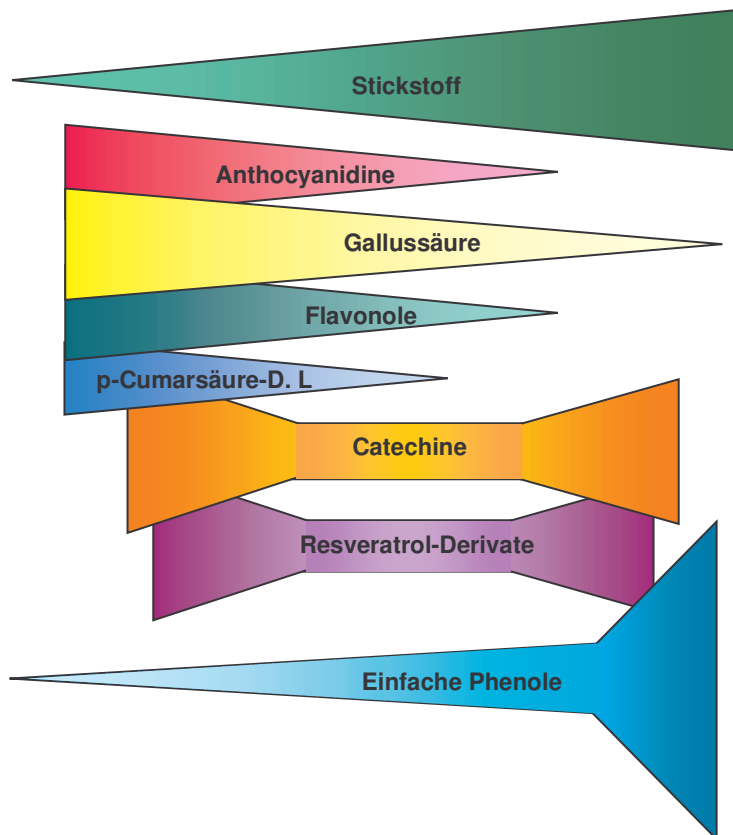


Abbildung 83: Schema: stickstoffspezifisches Akkumulationsverhalten von Anthocyanen, Gallussäure-Derivat Peak B, Flavonolen, p-Cumarsäure-Derivat Peak L, Resveratrol-Derivaten, Catechinen und einfachen Phenolen bei unbehandelten Kalli (Versuch 1)

#### 3.4.6.4 Stickstoff als Induktor von Stressmetaboliten

Eine pH-Wert-Absenkung im N3-Medium könnte einen Stressfaktor darstellen, der zu der Akkumulation von Catechinen und Resveratrol-Derivaten führte. Auch könnte sekundärer Salzstress durch hohe Stickstoffkonzentrationen bei Kalli auf N3-Medium, der Grund für eine Akkumulation von Stressmetaboliten sein. Allerdings kann dieser Einflussfaktor bei den Kalli auf N $\frac{1}{2}$ -Medium als Ursache ausgeschlossen werden.

Auch die Kombination der Stickstoffformen könnte ein Auslöser für die Induktion von Stressmetaboliten sein. N $\frac{1}{2}$  und N3 wiesen zwar unterschiedliche Stickstoffkombinationen auf, akkumulierten jedoch beide Stressmetaboliten.

Weil der niedrige Stickstoffgehalt der N  $\frac{1}{2}$ -Variante eine optimale Biomasseproduktion gewährleistete (Abbildung 67, 68) und auch keine limitierenden Auswirkungen auf den Sekundärstoffwechsel zu haben schien (Abbildung 69), kann eine Akkumulation der

Catechine und Resveratrol-Derivate nur auf Steuervorgänge im Stoffwechsel begründet liegen

Weil der niedrige Stickstoffgehalt der N<sub>1/2</sub>-Variante eine optimale Biomassenproduktion gewährleistete (Abbildung 67, 68) und er auch keine limitierenden Auswirkungen auf den Sekundärstoffwechsel zu haben schien (Abbildung 69), kann eine Akkumulation der Catechine und Resveratrol-Derivate nur durch einen gezielten Eingriff in den Stoffwechsel herbeigeführt worden sein.

*Vitis vinifera*-Zellsuspensionskulturen, die auf einem Kaliumnitrat-betonten B5-Medium (GAMBORG et al. 1967) kultiviert wurden (3000 mg/l KNO<sub>3</sub> und 134 mg/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) synthetisierten nach Reduktion der Kaliumnitratkonzentration auf 300 mg/l deutlich mehr Anthocyane. Da Variationen im Kalium-Gehalt keinen Einfluss zeigten (HIRASUNA et al. 1991), schien die Wirkung ausschließlich auf einem Nitrategieffekt zu basieren. Ein stimulierender Effekt auf die Stoffakkumulation durch eine verminderte KNO<sub>3</sub>-Konzentration im Medium war in dieser Untersuchung ebenfalls festzustellen. Aus der Untersuchung von HIRASUNA et al. (1991) geht allerdings nicht hervor, ob bei abnehmender Nitratkonzentration im Medium auch eine reduzierte Biomassenproduktion zu beobachten war.

Konzentrationsänderungen bei Ammonium schienen sich bei *Vitis vinifera*-Zellsuspensionskulturen nur geringfügig auf die Anthocyanidin-Akkumulation auszuwirken (HIRASUNA et al. 1991).

Dass sich eine Zugabe von Ammonium im Kulturmedium in einer 4-fachen Biomasseproduktion auswirkte, wie es GAMBORG et al. (1967) in Zellsuspensionskulturen von Sojabohnen feststellten, konnte nicht bestätigt werden.

Die unterschiedlichen Stickstoffformen haben aber auch direkten Einfluss auf die Synthese zahlreicher Polyphenole, wie DRÜGE (2000) an Preiselbeerpflanzen zeigte. Eine nitratbetonte Düngung, die gleichzeitig zu einem Anstieg des pH-Wert im Boden führte, induzierte eine Akkumulation von p-Cumarsäure in den Blättern. Eine Ammonium-betonte Düngung führte zu einer Konzentrationssteigerung an Gallus-, Protocatechu- und Vanillinsäure. Es konnte jedoch nicht bestimmt werden, ob die unterschiedlichen Metabolisierungen direkt in der Stickstoffform oder in den daraus resultierenden pH-Wert-Veränderungen begründet lagen.

Eine zunehmende Konzentration an Ammoniumnitrat führte bei GAMBORG et al. (1967) in Soja-Zellsuspensionskulturen zu einer exponentiellen Biomassezunahme. Eine Steigerung der Kaliumnitrat-Konzentration zeigte diesen Effekt jedoch nicht. Da die auf N<sub>3</sub>-gewachsenen Kalli trotz gesteigerter Konzentration an Ammoniumnitrat gegenüber den anderen Medienvarianten eine verminderte Biomasseproduktion aufwiesen, scheinen in dieser Variante die Kalli ungünstigen Kulturbedingungen ausgesetzt gewesen zu sein. Salzstress oder ein ungünstiger pH-Wert im Medium könnten somit nicht nur für eine

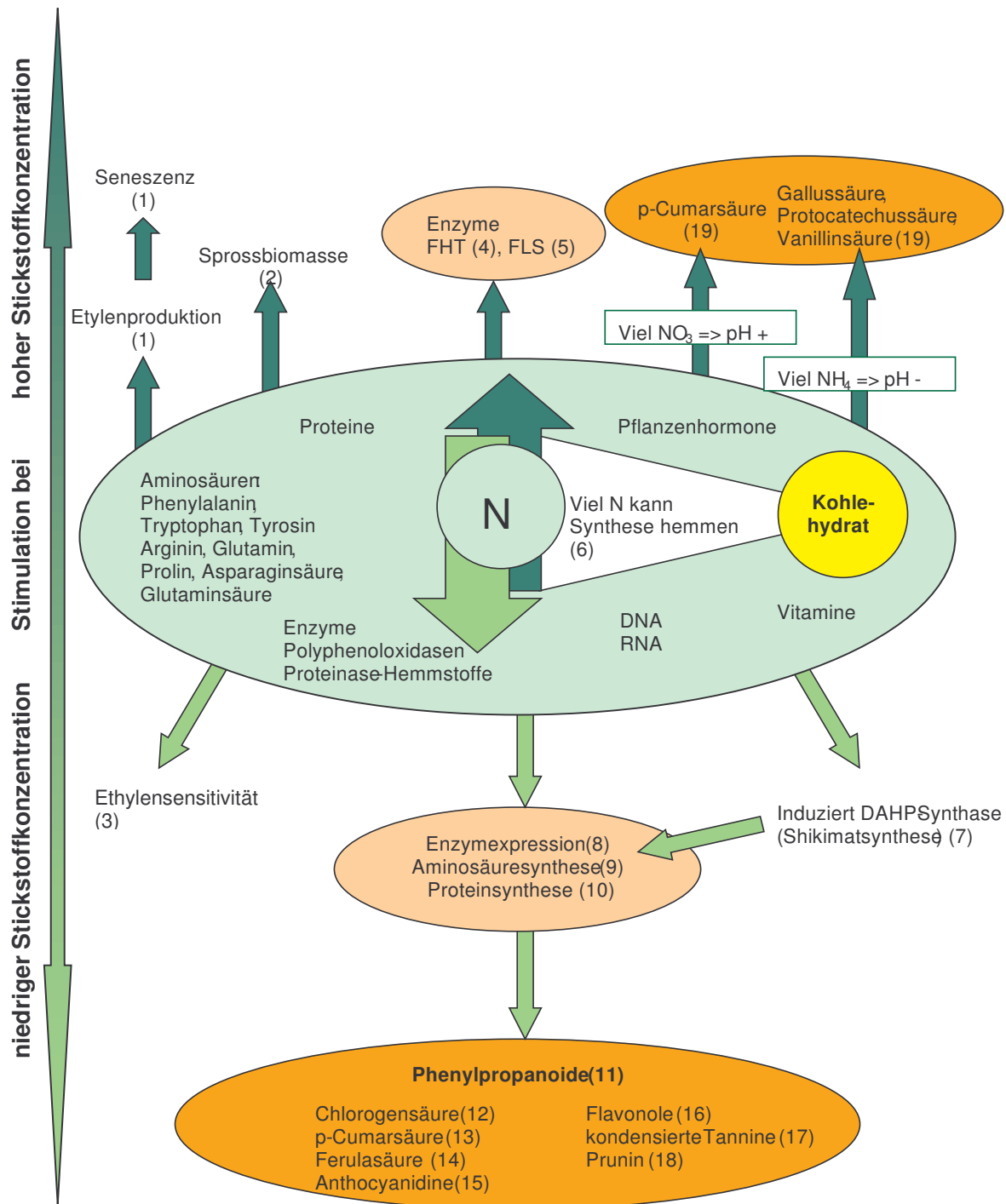


Abbildung 84: Schema über den Einfluss von Stickstoff im Stoffwechsel einer Pflanzenzelle

1: DRÜGE 2000

2: HAKULINEN et al. 1995; GRIFFIN et al. 1996;

3: DRÜGE 2000

4: FHT: HOYER. 2004

5: FLS: HOYER 2004

6: DRÜGE 2000

7: WEAVER und HERRMANN 1997 in HOYER 2004

8: PAL, CHS: HOYER 2004

9: DRÜGE 2000

10: DRÜGE 2000

11: ESTIARTE et al. 1994; PRICHARD et al. 1997;  
KELLER 1998; LUX-ENDRICH et al. 2000

12: DEL MORAL 1972; HAKULINEN et al. 1995

13: CHISAKI 1997

14: CHISAKI 1997

15: KELLER 1998; LUX-ENDRICH et al. 2000

16: ESTIARTE et al. 1994; WARREN et al. 1999

17: PRICHARD et al. 1997

18: TREUTTER und FEUCHT 1988

19: ALLAN et al. 1994

verminderte Biomasseproduktion, sondern auch für die Akkumulation von Stressmetaboliten verantwortlich sein.

Die in Abbildung 84 auszugsweise dargestellten Wechselwirkungen zwischen Stickstoff und Pflanzeninhaltsstoffen machen die vielfältigen Einflussmöglichkeiten und die potenziellen Schaltstellen im Primär- und Sekundärstoffwechsel deutlich. Damit ist Stickstoff einer der wichtigsten Bausteine für Aminosäuren, Proteine, Vitamine, Pflanzenhormone, etc. und somit auch für die Konzentration dieser Verbindungen.

#### **3.4.6.5 Einfluss der Stickstoffverfügbarkeit auf die Elicitierbarkeit von Weinkallus durch *Aureobasidium pullulans*-Kulturfiltrat**

Schon bei den Gesamtgehalten der Phenylpropanoide zeichnete sich ab, dass eine Elicitation bei verschiedenen Stickstoffkonzentrationen zu Veränderungen im Syntheseverhalten führen kann. Die auf N1-Medium kultivierten Kalli wiesen niedrigere konstitutive Gehalte an Phenylpropanoiden auf als die auf den beiden anderen Stickstoffvarianten kultivierten. Dies wird in Versuch 1 deutlicher als in Versuch 2 (Abbildung 69). Durch eine Elicitation mit 5% Hefefiltrat nahm die Induktionsfähigkeit der Gesamtphenole mit zunehmender Stickstoffverfügbarkeit im Medium zu (Abbildung 69 Versuch 1). Durch eine Behandlung mit 50% Hefefiltrat (Abbildung 69 Versuch 2), zeigten die N1-versorgten Kalli in Versuch 2 eine maximale Induzierbarkeit der Gesamtphenole, was in Versuch 1 jedoch nicht bestätigt werden konnte. Die einzelnen Stoffklassen reagierten ganz individuell auf die beiden Einflussfaktoren, Stickstoffverfügbarkeit und Elicitation mit Hefefiltrat.

Während die Synthese der einfachen Phenole durch eine zunehmende Stickstoffkonzentration im Medium sowohl von unbehandelten als auch von, mit beiden Hefefiltrat-Konzentrationen, elicitierten Weinkalli gesteigert wurde (Abbildung 71 und 72), zeigten sowohl die Catechine als auch alle Resveratrol-Derivate einen durch N $\frac{1}{2}$ - und N3-Medium induzierten konstitutiven Gehalt (Abbildungen 70, 73–75). Eine Kultivierung auf N1-Medium führte nach einer Elicitation mit 5% Hefefiltrat zu einer maximalen Induktion. In Versuch 2 ergab sich dieses Bild auch nach einer Elicitation mit 50% Hefefiltrat sowohl für die phenolischen Säuren als auch für die Flavonole und Anthocyane.

Auch bei den Benzoessäuren führte eine Stickstoffverfügbarkeit, wie sie die N1-Variante beinhaltet, zu einer maximalen Induktion (Abbildung 71), obwohl die konstitutiven Gehalte mit zunehmendem Stickstoffangebot stetig abnahmen. In Versuch 2 zeigte sich das gleiche Bild für die Hydroxymethylsäuren (Abbildung 72).

Sowohl in Versuch 1 als auch in Versuch 2 traten Wechselwirkungen zwischen Stickstoffversorgung, Elicitorkonzentration und Elicitationsdauer auf. Darin könnte ein Grund für die in den zwei Versuche zum Teil unterschiedlichen Ergebnisse im Hinblick auf das Akkumulationsverhalten liegen. Es wäre deshalb sinnvoll, weitere Versuche mit feineren

Abstufungen bei den Stickstoff- und Elicitorkonzentrationen durchzuführen und diese in kürzeren Entnahmeintervallen zu bonitieren. Variationen in der Stickstoffform würden dann weitere Informationen über physiologische und biochemische Einflüsse geben.

Möglicherweise sind die beobachteten Abweichungen in der Stoffdynamik der Kalli aber auch in unterschiedlichen physiologischen Zuständen und daraus resultierenden unterschiedlichen Synthesegeschwindigkeiten bzw. Reaktionsvermögen der Weinkalli begründet. Damit wären auch die Abweichungen erklärbar, die sich ergeben, wenn die 48 Stunden Variante aus Versuch 1 mit der 48 Stunden Variante aus Versuch 2 verglichen wird.

Dennoch lassen sich tendenziell verschiedene Induktions-Gruppen ermitteln, die in Tabelle 31 aufgelistet sind.

Durch eine höhere Elicitorkonzentration wird eine schnellere Akkumulation des p-Cumarsäure--Derivates Peak L induziert (Abbildung 85 und 86). Dieser Effekt wird durch eine verminderte Stickstoffverfügbarkeit noch verstärkt. Eine höhere Stickstoffverfügbarkeit führt 48 HNB nach der 5% Hefefiltrat-Behandlung zu einer deutlichen Anreicherung der Säure. Da zu diesem Zeitpunkt auch das Resveratrol und dessen Derivate vermehrt synthetisiert werden, kann ein Konzentrationsanstieg durch eine Poolbildung ausgeschlossen werden. Demnach wird das p-Cumarsäure-Derivat Peak L in übermäßig Stickstoff-versorgten Kalli durch eine niedrige Elicitorkonzentration stärker induziert, als durch eine hohe Elicitorkonzentration. Kalli, die auf dem N1-Medium kultiviert wurden, zeigten einen ähnlichen Effekt. 24 Stunden nach der Elicitation mit 50% Hefefiltrat fand eine deutliche Akkumulation an p-Cumarsäure in den auf der N $\frac{1}{2}$ -Variante kultivierten Kalli statt. Parallel dazu stieg auch die Synthese der Catechine, des Resveratrols und auch dessen Derivaten deutlich an (Abbildung 85, 87, 88). Man kann also, bei einer hohen Elicitorkonzentration, von einer Stimulation der p-Cumarsäure und deren Syntheseprodukte durch geringe Stickstoffversorgung sprechen. Dies stimmt mit Ergebnissen von BAVARESCO et al. (1994) an Reben überein.

*Tabelle 30: Einteilung der Stoffgruppen nach ihrem Induktionsverhalten in Weinkallus der Sorte „Regent“ bei unterschiedlicher Stickstoffverfügbarkeit im Medium*

<b>konstitutiver Gehalt steigt bei:</b>	<b>induzierter Gehalt steigt bei:</b>	<b>Stoffgruppe</b>	<b>In Versuch</b>
N $\frac{1}{2}$ $\Rightarrow$ N1 $\Rightarrow$ N3	N $\frac{1}{2}$ $\Rightarrow$ N1 $\Rightarrow$ N3	Einfach Phenole	1 und 2
N $\frac{1}{2}$ $\Leftarrow$ N1 $\Leftarrow$ N3	<b>N1</b>	Benzoessäuren Hydroxyzimtsäuren	1 2
<b>N<math>\frac{1}{2}</math></b> N3	<b>N1</b>	Catechine, Resveratrol-Dervate	1 1 **und 2
<b>N<math>\frac{1}{2}</math></b> N3	N $\frac{1}{2}$ <b>N3</b>	Resveratrol-Derivate	1 *

\* nur bei 5% Hefe    \*\* nur bei 50% Hefe

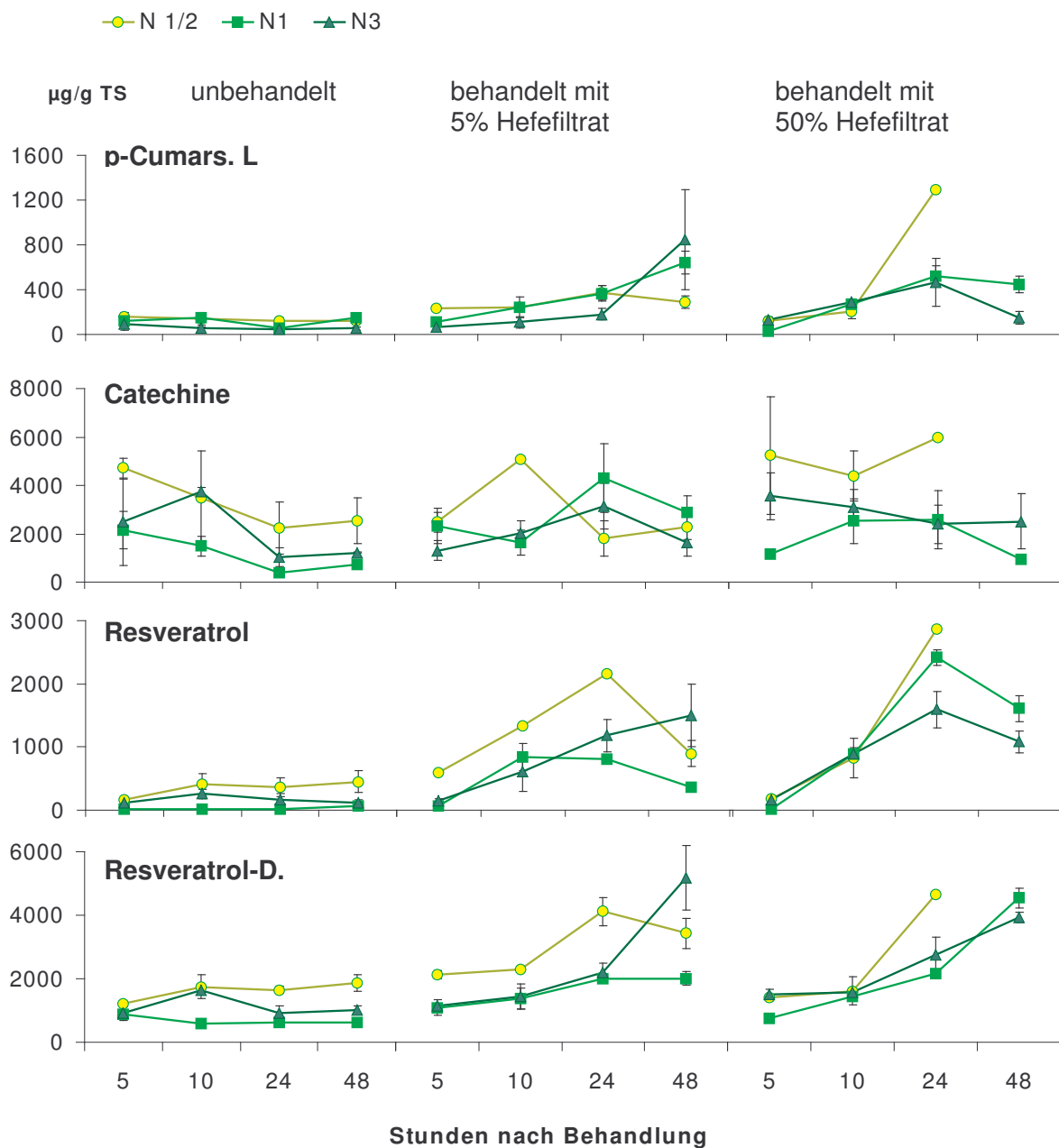


Abbildung 85: Akkumulationsverhalten von p-Cumarsäure-Derivat Peak L, Summe der mono- und oligomeren Catechine, dem Aglykon Resveratrol und den Resveratrol-Derivaten von unbehandelten und mit 5% bzw. 50% Hefefiltrat elicitierten Weinkalli unter dem Einfluss verschiedener Stickstoffverfügbarkeiten 5, 10, 24 und 48 Stunden nach Behandlung (**Versuch 1**). Mittelwerte aus Messwerten: unbehandelt (N<sup>1/2</sup>: 4; N1: 3; N3: 4), Hefe 5% (N<sup>1/2</sup>: 2, N1: 2, N3: 3), Hefe 50% (N<sup>1/2</sup>: 1, N1: 3, N3: 4) ± 0,5 x Standardabweichung

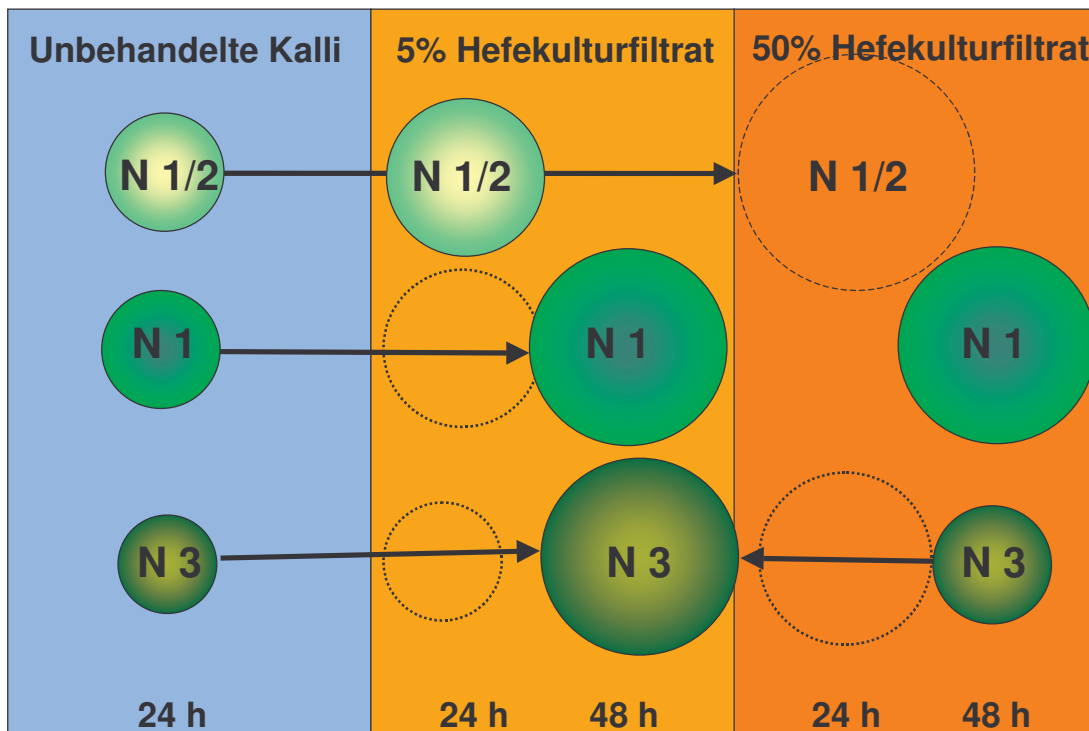


Abbildung 86: Schematische Darstellung des Akkumulationsverhaltens des p-Cumarsäure-Derivats Peak L; gestrichelte Kreise: Gehalt zum jeweils anderen Entnahmeterrmin

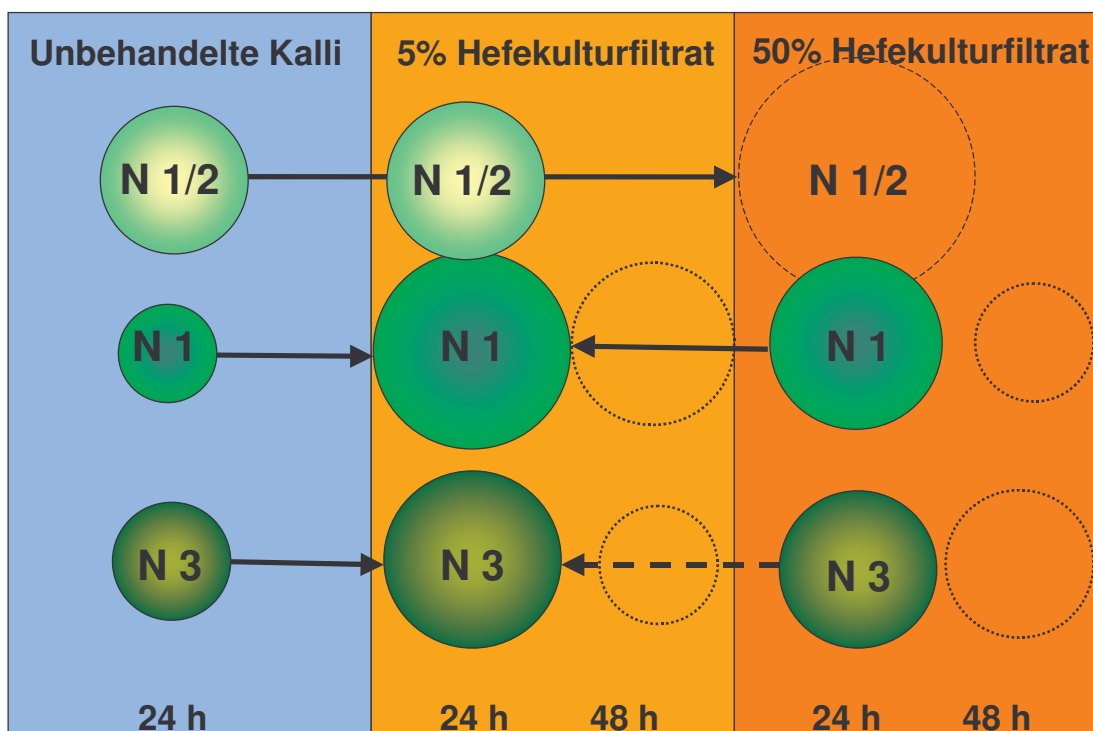


Abbildung 87: Schematische Darstellung des Akkumulationsverhaltens von Catechinen; gestrichelte Kreise: Gehalt zum jeweils anderen Entnahmeterrmin



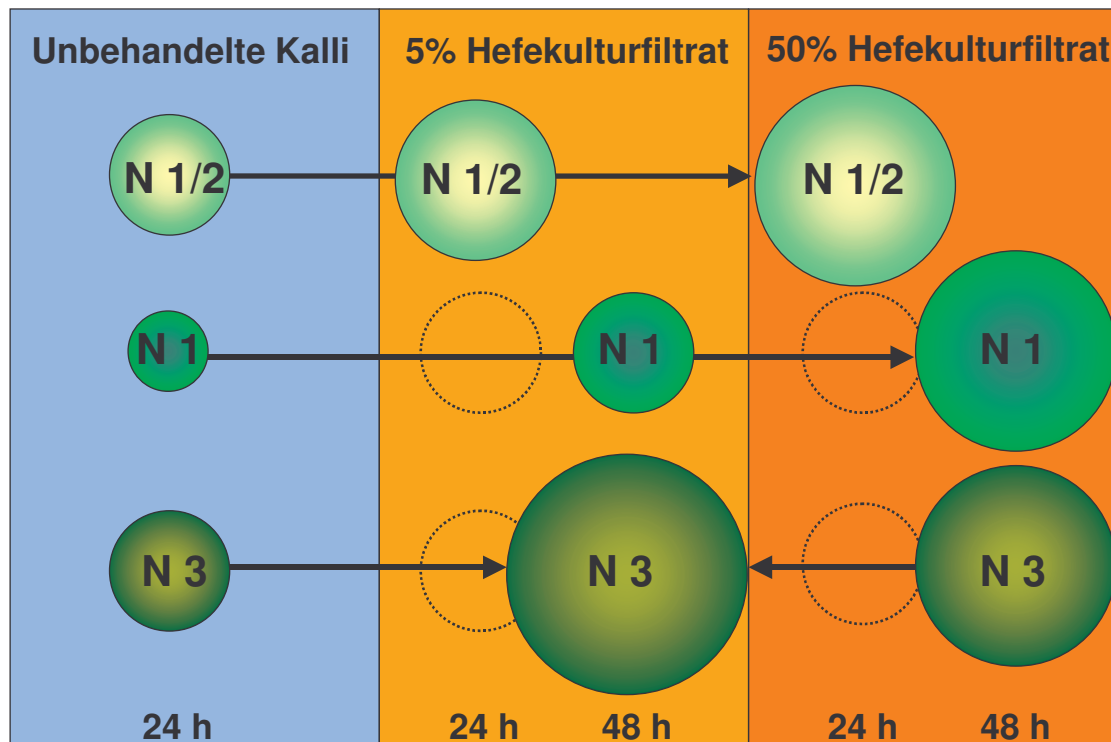


Abbildung 88: Schematische Darstellung des Akkumulationsverhaltens von Resveratrol-Derivaten; gestrichelte Kreise: Gehalt zum jeweils anderen Entnahmeterrin

Die fehlende Akkumulation des p-Cumarsäure-Derivates innerhalb von 24 Stunden, induziert durch eine niedrige Elicitorkonzentration, könnte mit der schnellen Weitersynthese zu Catechin, das zu diesem Zeitpunkt eine deutliche Konzentrationszunahme erfuhr, begründet werden. Auch der Gehalt an Resveratrol nahm in den auf N $\frac{1}{2}$ -Medium kultivierten Kalli 24 Stunden nach Behandlung mit 5% Hefefiltrat deutlich zu, so dass möglicherweise eine gesteigerte Synthese des p-Cumarsäure-Derivates Peak L stattfand, die aber durch die schnelle Metabolisierung nicht messbar war.

Demnach wurden durch eine gute Stickstoffversorgung im Weinkallus nicht nur Resveratrol-Derivate sondern auch das Substrat für die Stilbene vermehrt synthetisiert, was den Untersuchungsergebnissen von (BAVARESCO et al. 1994) an Reben widerspricht.

Die Ergebnisse zeigen, dass der Einfluss von Stickstoff als alleiniger Faktor schon nicht einfach nachvollzieh- und interpretierbar ist. Doch stellen sich zusätzliche Fragen: Wann wirkt ein vermindertes Stickstoffangebot auf eine Pflanzenzelle als Stressfaktor? Kann bei einer Akkumulation von Stressmetaboliten Stickstoffmangel als Ursache angesehen werden, obwohl der Primärstoffwechsel in keinsten Weise eingeschränkt war?

Und die Kombination von Stickstoff und Elicitation der Kalluszellen und ihre Wechselwirkungen, zeigen bezüglich Syntheseverhalten und Dynamik ein noch vielfältigeres Bild. Die Zusammenhänge stellen sich wie folgt dar:

1. Eine verminderte Stickstoffkonzentration verstärkt die Induzierbarkeit von p-Cumarsäure, Catechinen und Resveratrol-Derivaten durch eine Elicitation mit Hefefiltrat. Die Stickstoffkonzentration ist aber keine Steuergröße für eine Polarisierung des Stoffwechsels zwischen Chalkon- und Resveratrol-Synthese.
2. Eine niedrige Stickstoffkonzentration im Medium beschleunigt die Synthese von Catechinen und Resveratrol-Derivaten.

### **3.4.7 Einfluss von verschiedenen Hefekomponenten als Elicitor auf Weinkallus**

Welche Komponenten in Hefefiltraten von *Aureobasidium pullulans* elicitierende Wirkungen aufweisen, wurde in dieser Arbeit nicht abschließend untersucht. Aus Versuch 4, konnten lediglich Informationen über die Polaritäten der Wirkbestandteile gewonnen werden (Abbildungen 77 und 78). Behandlung mit den Verbindungen aus dem Hefefiltrat, die beim Ausschütteln in die Ethylacetatphase übergegangen waren, wiesen im Vergleich mit dem Filtratgemisch, leicht verminderte Stoffakkumulation bei den Resveratrol-Derivaten auf. Die in der Wasserphase befindlichen Substanzen zeigten dagegen keine Auswirkungen auf den Gehalt an Resveratrolen und sonstigen Stoffgruppen. Es liegt also der Rückschluss nahe, dass hydrophobe Verbindungen diese Induktion elicitimieren. Daraus abgeleitet, können Zucker als Wirksubstanzen ausgeschlossen werden. Die reduzierte Wirksamkeit der Bestandteile in der Ethylacetatphase gegenüber der Hefefiltrat-Behandlung könnte darin begründet liegen, dass die elicitimierende Verbindungen im Filtrat durch das Ethylacetat denaturiert und ihre Wirksamkeit somit abgeschwächt wurde.

Genaueren Untersuchungen von wirksamen Fraktionen des Hefefiltrates bezüglich chemischer Eigenschaften wird in zukünftigen Fragestellungen mehr Bedeutung beigemessen.

## 4 Gesamtdiskussion

Pflanzen stehen eine Vielzahl von Abwehrstrategien zur Abwehr von pathogenen Mikroorganismen zur Verfügung. Die chemische Aktivierung von Pflanzenabwehrmechanismen durch Applikationen von Elicitoren ist eine Möglichkeit um Pflanzenkrankheiten vorzubeugen.

Phenole werden ganz allgemein mit Resistenzmechanismen in Verbindung gebracht (KORTEKAMP und ZYPRIAN 2003) und, da viele funktionelle, Elicitor-stimulierende Gene einschließlich spezifische Zellwandreaktionen (KAWALLECK et al. 1992) mit dem sekundären Metabolismus in engem Zusammenhang stehen, besteht eine wichtige Frage darin, zu klären, ob Hefen und hier besonders epiphytische Hefen, ebenfalls die Fähigkeit besitzen, auf die Biosynthese der Phenylpropanoide Einfluss zu nehmen.

### 4.1 Kalluskulturen als Modellsystem und ihre Übertragbarkeit auf Pflanze

In dem hier vorgestellten Modellsystem, wurden Weinkalluskulturen verwendet. Für eine korrekte Einordnung der Ergebnisse, muss bewusst sein, dass, obwohl alle Zellen totipotent und somit zu artspezifischen Stoffwechselreaktionen befähigt sind, nur ein geringer Teil von ihnen auch Phenylpropanoide akkumuliert. HALL und YEOMAN (1987) fanden, dass bei *Catharanthus roseus*-Zellkulturen nur 10% der Zellen Anthocyane synthetisierten. Dieses Ergebnis war bei den Weinkalli beider Sorten, mit bloßem Auge nachvollziehbar, da nur vereinzelt Zellen mit starker Anthocyanidin-Anreicherung auftraten, während die Mehrzahl der umliegenden Zellen, keinerlei Pigmentierung zeigten. Diese schon in einem geringen Prozentsatz der Kalluszellen auftretende Akkumulation verschiedener Verbindungen, unterstreicht die Dimension der Elicitierbarkeit durch das Hefefiltrat.

Der in den ersten Versuchen, infolge inhomogener Einflussfaktoren, beobachteten großen Varianz der Inhaltstoffen, sollte, durch Standardisierung der Kultur- und Vorkulturbedingungen und Stabilisierung des pH-Wertes im Kulturmedium, entgegengewirkt werden. Für die Weinsorte „Nero“ wurde eine Optimierung des Kulturmediums durchgeführt, um eine Steigerung des Sekundärstoffwechsels zu erzielen. Mögliche zu Faktoren für eine Modifikation sind der Saccharosegehalt, die Nährstoffkonzentration sowie der Auxingehalt und die -formulierung (FEUCHT et al. 1996).

Die Übertragbarkeit der Ergebnisse der Elicitationen von Weinkalli auf Weinpflanzen ist wahrscheinlich nur im Einzelfall möglich, da der Stoffwechsel des kambialen Kallusgewebes von dem einer kompletten Weinpflanze abweicht. Diese Unterschiede werden z. B. durch das Fehlen von blatttypischen Weinsäureverbindungen (Tartraten) im Kallus deutlich.

Durch die nachweisliche, zwischen verschiedenen Zell- und Gewebetypen allerdings stark variierende Fähigkeit (STEIN und HOOS 1984; VITRAC et al. 2001a) der Weinkalli, Resveratrol

und dessen Derivate zu synthetisieren, eignet sich dieses System bei *Vitis vinifera* besonders gut, um die Abwehrreaktionen auf Zellebene zu untersuchen.

Obwohl die Weinsorte „Nero“ als resistent gegen Falschen Mehltau und *Botrytis cinerea* gilt, waren die Weinkalli, nach einer Inokulation mit *Botrytis cinerea*-Konidien, innerhalb von 48 Stunden mit Mycel überwachsen, ohne dass eine deutliche Akkumulation an Abwehrverbindungen induziert worden war. Sollte die beobachtete Anfälligkeit, in der geringen Anzahl an stoffwechselaktiven Kalluszellen begründet liegen, so stellt sich die Frage, warum dann nach Elicitation mit Hefefiltrat eine so deutliche Akkumulation gemessen wurde. Ob die Stoffakkumulation von einigen wenigen Zellen mit jeweils sehr ausgeprägter Anreicherung hervorgerufen wurde oder ob doch mehr als 10% der Zellen zur Synthese angeregt werden, sollte in weiterführenden Arbeiten an Kalluszellen mittels phenolfärbenden Reagenzien, wie Toluidinblau oder Safranin, deutlich gemacht werden.

#### 4.2 Hefen als Elicitor

Aufgrund der in dieser Untersuchungsreihe ermittelten Akkumulationen von konstitutiven Verbindungen und der Neusynthese von Resveratrol-Derivaten im Weinkallus der Sorten „Regent“ und „Nero“ nach Behandlungen mit dem Kulturfiltrat von *Aureobasidium pullulans*, ist dieses Hefefiltrat eindeutig als Elicitor zu bezeichnen. Diese Einschätzung wird durch das verzögerte Mycelwachstum von *Botrytis cinerea* nach Elicitation mit dem Filtrat noch bestärkt. Mögliche Resistenzmechanismen und die genaue Struktur der elicitierenden Verbindungen in dem Filtrat könnten in weiteren Untersuchungen von Bedeutung sein.

In den meisten Untersuchungsreihen konnte die eindämmende Wirkung von epiphytischen Hefen auf verschiedene pathogene Pilze, auf eine direkte Wechselwirkung zwischen Hefe und Pathogen zurückgeführt werden. Dabei standen Mechanismen wie Nahrungskonkurrenz oder direktes Einwirken von Hefezellen auf die Konidienkeimung oder Appressorienbildung im Mittelpunkt. Es konnte gezeigt werden, dass eine verminderte Konidienkeimung oder Appressorienbildung nach Hefebehandlungen, nicht nur durch lebende Hefezellen verursacht wird. So bewirkten z. B. hitzestabilen Substanzen in Kulturfiltraten von *Saccharomyces cerevisiae* (Bäckerhefe) eine Hemmung der Mehltauentwicklung (*Colletotrichum graminicola*) an Maispflanzen (SANDRA et al. 1990).

Viele Untersuchungen mit dem hefeähnlichen Pilz *Aureobasidium pullulans* beschränkten sich bisher auf Anwendungen von lebenden Zellen als Antagonisten von nachernterelevanten, pilzlichen Pathogenen. Dabei konnte zwar bei Apfel eine hemmende Wirkung auf die Sporenkeimung von *Botrytis cinerea* und *Penicillium expansum* festgestellt werden, doch war der Einfluss bei *Monilia frutigena* nur gering. Das Mycelwachstum der drei

Pathogene konnte *Aureobasidium pullulans* kaum beeinflussen (FALCONI und MENDGEN 1994), was Nahrungskonkurrenz als alleinigen Einflussfaktor fraglich erscheinen lässt.

Auch COOK et al. (1999) verwendete lebende Zellen verschiedener endophytischer Hefen (*Candida sake*, *Candida pulcherrima*, *Trichosporon pullulans*) um Infektionen mit *Botrytis cinerea* bei der Lagerung von Kiwis entgegenzuwirken. Dabei zeigte sich ein additiver Effekt zwischen der Anwendung der Hefezellen und einer Induktion des Sekundärstoffwechsels mittels Erhöhung der Lagertemperatur von 0°C auf 10°C. Beide Anwendungen für sich, führten schon zu einer verminderten Botrytis-Infektion der Früchte, doch ließ sich dieser Effekt durch ihre Kombination noch verstärken. Grund dafür. Könnte eine zusätzliche, stimulierende Wirkung der Hefe auf die Phenolsynthese sein.

*Aureobasidium pullulans* ist sowohl befähigt  $\alpha$ -L-Arabinofuranoside,  $\beta$ -Glucoside und  $\alpha$ -L-Rhamnopyranoside zu hydrolisieren (MCMAHON et al. 1999), als auch das Exopolysaccharid Pullulan, eine poly- $\alpha$ -1,6-Maltotriose, zu synthetisieren (YURLOVA und DE HOOG 1997). Einige Stämme synthetisierten auch Glucane mit  $\alpha$ -1,4-D-,  $\beta$ -1,6-D und  $\beta$ -1,3-D-glucosidischen Bindungen. Dadurch liegt die Vermutung nahe, dass nicht nur Oberflächenstrukturen der Hefezellen, sondern auch Stoffwechselprodukte, die von den Zellen ins Kulturmedium abgegeben werden, als Elicitor fungieren können. Auch Substanzen, die sich im Zellinnern befinden, wären als Elicitoren von Pflanzenzellen denkbar.

Dass *Aureobasidium pullulans* Auswirkungen auf die Physiologie von *in vitro* kultivierten *Vitis riparia* Pflanzen hat, zeigten Untersuchungen von BLAICH (1977) sowie BLAICH und RUSTER (1979). Dabei riefen nicht nur lebende Zellen des hefeähnlichen Pilzes, der mit der Wurzel eine Mykorrhiza-ähnliche Beziehung eingeht (BLAICH 1977), sondern auch das Kulturfiltrat dieser Hefe, physiologische Veränderungen hervor. Nach beiden Behandlungen zeigte sich eine Steigerung der Wurzelbildung und -verzweigung, wie es auch durch Zugabe von Indolyl-3-Essigsäure beobachtet werden konnte. In Einzelfällen erfolgte sogar an der ersten Internodie eine Wurzelbildung, die allerdings häufig mit gestörter Polarität verbunden war. Die Blätter wiesen eine dunklere Färbung auf und zeigten eine stärker ausgeprägte Blattzahnung. Da die Oberseiten der Blätter, induziert durch die Hefeanwendungen, stärker wuchsen als die Blattunterseiten, krümmten sich die Blätter. Auch diese Symptome können durch die Gabe von Indolyl-3-Essigsäure hervorgerufen werden. Eine Verlängerung der Internodien wurde nur durch Suspensionen mit lebenden Zellen, verbunden mit anschließender Mycelbildung über dem Wurzelbereich, nicht aber durch Behandlungen mit dem Filtrat, induziert.

Die aus dem *Aureobasidium pullulans*-Filtrat isolierten Aminosäuren riefen ebenfalls physiologische Veränderungen hervor, allerdings nicht im selben Maß wie die bei hefebehandelten Pflanzen.

Ein Teil der Auswirkungen von *Aureobasidium pullulans* auf morphologische Vorgänge in der Pflanze steht somit in engem Zusammenhang mit der Ausscheidung hormonell wirkender Substanzen. Ein weitaus größerer Teil der Effekte beruht allerdings auf der Synthese von Aminosäuren – *Aureobasidium pullulans* scheidet hauptsächlich Asparaginsäure und Glutaminsäure aus – der Pflanze zurück, die ihrerseits wiederum Auswirkungen auf den IES-Haushalt der Pflanze ausüben könnte. Bei so deutlichen Auswirkungen des Kulturfiltrates auf Vorgänge im Primärstoffwechsel sind Reaktionen im Sekundärstoffwechsel wahrscheinlich.

### **4.3 Elicitorkonzentration als Einflussgröße auf den Sekundärstoffwechsel**

#### **4.3.1 Einfluss auf die Ausrichtung des Stoffwechsel**

Dass die Induktionsstärke der gesamten Phenylpropanoide bei beiden Elicitorkonzentrationen vergleichbar war, widerspricht Ergebnissen von FUNK et al. (1987), die bei *Vitis vinifera*-Zellkulturen sowohl zwischen Zellzahl als auch zwischen Elicitorkonzentration und Induzierbarkeit der PAL-Aktivität eine positive Korrelation fanden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Konzentration des Hefefiltrates einen deutlichen Einfluss auf die Ausrichtung des Flavonoidstoffwechsel hat und stark von der Stickstoffversorgung beeinflusst wird.

Da auch bei STEIN und HOOS (1984) eine steigende Elicitorkonzentration eine Zunahme an Resveratrol induzierte, könnten es sein, dass sich selbst eine 5%ige Hefefiltratbehandlung im Wirkungsgrad einer maximalen Induktion befindet.

#### **4.3.2 Einfluss auf die Synthesegeschwindigkeit**

Die Reaktionsgeschwindigkeit der Resveratrol-Synthese spielt für das Resistenzpotential eine wichtige Rolle, da sie genauso wie die Intensität der Stilbenproduktion in elicitierten Rebblättern mit der *Botrytis*-Resistenz positiv korreliert ist (STEIN und HOOS 1984). Dabei könnten Sensitivitätsunterschiede, unterschiedliche Transkriptionsgeschwindigkeiten und/oder verschieden schnelle Signalübertragungen mit den Reaktionsgeschwindigkeiten der Pflanzen im Zusammenhang stehen.

In dieser Versuchsreihe führte eine höhere Elicitorkonzentration zu einer schnelleren Akkumulation des p-Cumarsäure-Derivates Peak L, bei gleichzeitig verzögerter Anreicherung von Catechinen. Die Fähigkeit, den Stoffwechsel möglichst schnell in Richtung Resveratrol-Metabolismus auszurichten, könnte ein weiterer Einflussfaktor auf das Resistenzpotential sein.

Mechanismen bezüglich der Genaktivierung von Enzymen oder Ausrichtungen innerhalb des Sekundärstoffwechsels können nur durch enzymatische und, sowohl qualitative als auch quantitative, Untersuchungen der Genexpressionsdynamik aufgeklärt werden.

#### 4.3.4 Suppressoren als Minderer der Elicitorerkennung

Eine Induktion von Stilbenen im Weinkallus könnte zusätzlich zu einer spezifischen Elicitorerkennung auch durch das Vorhandensein sogenannter Suppressoren gemindert sein, die die Wirkung von Elicitoren hemmen. Eine höhere Elicitorkonzentration verändert das Verhältnis von Suppressoren und Elicitoren, was zu einer vermehrten Elicitorbindung an den Rezeptor führen könnte. Das Vorhandensein von bislang als Suppressoren bekannten Verbindungen im Hefefiltrat, Peptiden oder Oligosacchariden, ist vorstellbar. Einen möglichen Wirkmechanismus von Suppressoren könnte die Interferenz mit der Bindungsstelle des Elicitors an einen Rezeptor sein, was eine entsprechende Verminderung der Affinität und somit eine Reduktion der biologischen Aktivität des Elicitors zur Folge hätte (SCHWEIZER und MÉTRAUX 1996). Diese Wechselwirkungen stellten auch BASSE und BOLLER (1992) an Zellsuspensionskulturen von Tomaten fest. Eine Induktion der Ethylen- und PAL-Synthese durch eine Glycopeptidfraktion eines Hefeextraktes wurde dort durch Zugabe von Enzymen, die Oligosaccharide freisetzen, reduziert oder sogar ganz unterbunden. Die Zugabe dieser Oligosaccharide zu einer Tomaten-Zellsuspensionskultur, die mit Elicitorfraktionen eines anderen, pilzlichen Erregers, *Phytophthora megasperma* induziert wurden, hemmte die Induktionsintensität hingegen nicht. Scheinbar wirken Oligosaccharide spezifisch auf die Wahrnehmung von Elicitoren.

#### 4.3.5 Einfluss auf die Signalübertragungen

Die von der Elicitorkonzentration abhängige Ausrichtung der Biosynthese entweder in Richtung Chalkone oder Stilbene könnte in der Beteiligung verschiedener Sensitivitäten der Gene gegenüber Signalstoffkonzentrationen oder in der Notwendigkeit des Vorhandenseins verschiedener Signalstoffe für verschiedene Genaktivierungen begründet liegen.

Methyljasmonat ist an der Signalübertragung für eine Aktivierung der Gentranskription der Stilbensynthese beteiligt (LARRONDE et al. 2003) und induziert somit die Biosynthese von Stilbenen (VITRAC et al. 2001b). Eine Zugabe von Methyljasmonat, führte in *Vitis vinifera*-Zellsuspensionskulturen aber gleichzeitig zu einem Anstieg an Anthocyanen und Catechin, allerdings nicht in dem Ausmaß wie bei den Resveratrol-Derivaten (VITRAC et al. 2001b).

Die Sensitivität gegenüber Methyljasmonat kann bei verändertem physiologischem Zustand des Pflanzengewebes variieren. So verlieren Trauben von *Vitis vinifera* mit zunehmendem Reifeprozess die Fähigkeit auf Methyljasmonat zu reagieren und trans-Resveratrol zu synthetisieren. Blätter behalten die Synthesefähigkeit bei, metabolisieren jedoch bei gleichem Signalmolekül trans-Piceid (LARRONDE et al. 2003). Es ist also durchaus denkbar, dass verschiedene Gene unterschiedliche Sensitivitäten gegenüber Signalstoffen aufweisen. Die These, dass verschiedene Signalstoffe für die Aktivierung unterschiedlicher Enzym-Expressionen vorhanden sein müssen, wird dadurch gestützt, dass eine Zufuhr von Methyljasmonat zu *Vitis vinifera*-Zellsuspensionskulturen eine Induktion der Piceid-

Konzentration auf das 11-fache des Ausgangswertes bewirkt, dass die Gehalte von Astringin und Resveratrol davon jedoch unbeeinflusst bleiben (KRISA et al. 1999a). Für die Metabolisierung von Astringin und das Unterbinden der Glycosilierung von Resveratrol scheinen andere Signalstoffe oder Signalstoff-Konzentrationen benötigt zu werden

#### **4.4 Wirkungen von *Hefe-Filtrat* auf das Resistenzpotential von Weinkallus**

##### **4.4.1 Auswirkungen auf den Sekundärstoffwechsel**

Der Akkumulation von Phenylpropanoiden, im speziellen von Resveratrol-Derivaten, dürften vergleichbare Reaktionen vorausgegangen sein, wie sie in der Untersuchung von KORTEKAMP und ZYPRIAN (2003) nach einer Infektion von Weinblätter mit Mehltau (*Plasmopara viticola*) beobachtet wurde. Hier war die Infektion mit einer Zunahme an reaktivem Sauerstoff (4 h nach Behandlung), begleitet von einer Aktivitätszunahme der Peroxidasen (1-12 h nach Behandlung), was zu einer Akkumulation von Phenolen führte (12-15 h nach Behandlung) verbunden.

Eine Infektion von *Vitis vinifera*-Zellkulturen mit *Botrytis cinerea* führte nach LISWIDOWATI et al. (1991) zu einem starken Anstieg der gesamten Proteinsynthese und zur selektiven Bildung der L-Phenylalanin-Ammonium-Lyase und der Stilbensynthese. Bei den in dieser Untersuchung durchgeführten Inokulationen der Weinkalli mit *Botrytis cinerea* konnten nur geringfügige Stilbenakkumulationen festgestellt werden.

Je nach Pathogen oder Elicitor wurden spezifische Gene induziert. Eine Infektion von *Vitis vinifera*-Blättern und -Trauben mit *Botrytis cinerea* führte nach BÉZIER et al. (2002) zu einer Stimulation verschiedener abwehrrelevanter Gene. Dabei kam es zu einer zunehmenden Transkription zweier Chitinasen, von der eine nur in Blättern gefunden wurde, die andere jedoch in Blättern und Früchten. Eine Infektion mit Mehltau (*Plasmopara viticola*) hingegen hatte bezüglich dieser Chitinasen keine induzierende Wirkung. Aufgrund der beobachteten Spezifität der Abwehrmechanismen bei verschiedenen Elicitoren, sollten Übertragungen auf andere Wirt-Elicitor-Reaktionen nur mit großer Vorsicht vorgenommen werden.

##### **4.4.2 Resveratrol-Derivate als Phytoalexine**

Es ist bekannt, dass das natürliche Resistenzpotential von *Vitis vinifera* gegen pathogene Pilze, wie zum Beispiel *Botrytis cinerea*, von der Fähigkeit begleitet wird, schnell Stilbene, wie Resveratrol (LANGKAKE and PRYCE 1976), Resveratrol-Glucoside (WATERHOUSE und LAMUELA REVENTOS 1994), Pterostilben und  $\epsilon$ -Viniferin (LANGKAKE and PRYCE 1977a), akkumulieren zu können.

Resveratrol lässt sich in Blättern aller bisher daraufhin untersuchten *Vitaceen* im Anschluss an kurzweilige UV-Bestrahlung nachweisen (BLAICH und BACHMANN 1980). Auch nach Inokulationen von Weinblättern mit pilzlichen Stoffwechselprodukten wurde mehrfach eine



Synthese dieser Verbindung induziert (STEIN und HOOS 1984). Daher ist es nicht verwunderlich, dass auch eine Behandlung von Weinkallus mit dem *Aureobasidium pullulans* Hefefiltrat elicitierende Wirkungen hat und zu einer Induktion von Resveratrol-Derivaten führt. Resveratrol ist auch in dieser Untersuchung das Stilben, das als erstes und am schnellsten synthetisiert wird. Es dient also der schnellen Abwehr. Allerdings bleibt die Frage: Warum die Zelle dann noch andere Resveratrol-Derivate synthetisiert, wenn ihr schon ein Phytoalexin zur Verfügung steht? Eine mögliche Antwort ist, dass diese Metabolisierung ihren Ursprung in der wechselseitigen Anpassung von Wirt und Pathogen hat. Die Anreicherung von Resveratrol gegen pilzliche Angreifer führte möglicherweise zur Fähigkeit der Pathogene das Phytoalexin mittels Freisetzung von Stilbenoxidasen zu detoxifizieren. So scheidet *Botrytis cinerea* Laccase aus, um der fungiziden Wirkung von Resveratrol entgegenzuwirken (MARBACH et al. 1984; BREUIL et al. 1999). Die Pflanzenzelle war also gezwungen, noch wirksamere Substanzen, auf der Grundlage des Resveratrols, zu entwickeln.

Verschiedenartige Elicitoren scheinen spezifische Enzymaktivierungen auszulösen, die dann die unterschiedlichen Resveratrol-Derivate von *Vitis vinifera* metabolisierten. Diesen Derivaten werden wiederum differenzierte Abwehrfunktionen zugeschrieben.

Durch mechanische Verletzungen ließ sich bisher kein Resveratrol-Derivat induzieren (LANGCAKE et al. 1979b; CASTORIA et al. 2000). Während die Gehalte an den Resveratrol, Piceatannol und Viniferin, in Früchten von *Vitis vinifera* durch eine UV-Bestrahlung signifikant induziert werden konnten, wurden andere Stilbene, wie Astringin, Piceid (CANTOS et al. 2003) und Pterostilben (LANGCAKE et al. 1978) weniger akkumuliert. Pterostilbene werden im Gegensatz zu Resveratrol und Viniferinen nicht durch eine *Botrytis cinerea*-Infektion synthetisiert (LANGCAKE et al. 1978), akkumulierten jedoch nach Infektionen mit Mehltau (*Plasmopara viticola*) deutlich (CASTORIA et al. 2000) und scheinen somit spezifische Abwehrverbindungen zu sein.

Glycosilierte Flavonoide (PISLEWSKA et al. 2002) gelten als biologisch inaktiver und werden in den Vakuolen eingelagert. WAFFO-TEGUO et al. (1998) führten Vergleiche zwischen Verbindungen und ihrem Aglykon durch und zeigten, dass trans-Piceid eine 7-fach geringere Aktivität als trans-Resveratrol, trans-Resveratrolsid eine 35-fach geringere als trans-Resveratrol und Astringin eine 1,6-fach geringere als Piceatannol, hat. Aktive Aglykone werden für gewöhnlich aus dem Protoplasten ausgeschieden. Da Piceid, das konstitutiv am dominantesten vorkommende Resveratrol-Derivat war, scheint es eine für die Weinkalluszelle günstigere Lagerform als das Resveratrol selbst darzustellen.

JEANDET et al. (1997a) und AYRAN et al. (1987) vermuteten, dass das Vorkommen von freiem Resveratrol im Extrakt von Weinblättern ausschließlich durch das Vorhandensein von endogenen  $\beta$ -D-Glucosidasen, die ihre Aktivität während des Extraktionsprozesses

beibehalten, verursacht wird. Diese Schlussfolgerung zogen sie aufgrund der negativen Korrelation zwischen dem Gehalt an freiem Resveratrol und dem Gehalt an glycosyliertem Resveratrol im Pflanzenextrakt. Ungebundenes Resveratrol käme somit nur als Folge der Extraktion in Blattextrakten vor. Dieser Hypothese steht die Aussage entgegen, dass in unbehandelten Weinkalli sowohl trans- als auch cis-Piceid konstitutiv vorkommen, Resveratrol in ungebundener Form jedoch nicht vorhanden ist. Unter identischen Extraktionsmethoden wird das Resveratrol-Aglykon bei gleichbleibendem Piceid-Gehalt erst durch eine 10- bis 24-stündige Elicitation deutlich akkumuliert. Gerade um eine Deaktivierung der Enzyme herbeizuführen, wird eine Extraktion mit Methanol durchgeführt. Daher ist es unwahrscheinlich, dass bei einem Gemisch aus Methanol:H<sub>2</sub>O von 8:2 wie bei JEANDET et al. (1997a) beschrieben, die  $\beta$ -Glucosidasen ihre Aktivität beibehielten.

Auch KRISA et al. (1999) stellten bei einer Behandlung von Wein-Zellsuspensionskulturen mit Methyljasmonat eine Induktion von Piceid, aber keine von Resveratrol fest. Somit besteht auch hier keine Korrelation zwischen beiden Verbindungen.

Sollte die Hypothese von JEANDET et al. 1997a stimmen, dass für das Vorhandensein von ungebundenem Resveratrol die Glucose vom Piceid aktiv abgespalten werden muss, könnte durch eine Behandlung der Weinkalli mit dem Hefefiltrat eine Induktion der  $\beta$ -D-Glucosidasen Expressierung ausgelöst worden sein, die dann ihrerseits eine DeGlycosilierung des Piceids hervorrufen hätte. Es ist auch denkbar, dass die  $\beta$ -D-Glucosidasen ihren Ursprung in den Hefezellen haben. Ob diese aber dann so thermostabil wären, um den Autoklavivorgang ohne Reduktion ihrer Aktivität zu überstehen, ist jedoch fraglich. Allerdings würde diese Hypothese auch das Vorhandensein von Piceid, bei gleichzeitigem Fehlen des Resveratrol-Aglykons, erklären. Für eine Beteiligung von  $\beta$ -D-Glucosidasen an dem Vorhandensein von ungebundenem Resveratrol sprechen auch die Ergebnisse von HAIN (1992). In dessen Untersuchungsreihe wurde ein Wein-Stilben-Synthase-Gen isoliert und in Tabak transferiert. Daraufhin akkumulierte der Tabak trans-Resveratrol und wies eine signifikante Resistenz gegen *Botrytis cinerea* auf. Im Gegensatz dazu akkumulierten transgene Luzernen Piceid. Scheinbar besaßen die transgenen Tabakpflanzen die Fähigkeit,  $\beta$ -D-Glucosidasen zu aktivieren, wohingegen die  $\beta$ -D-Glucosidase Aktivität von transgenen Luzernen vermindert zu sein schien. Diese Beobachtungen legen den Schluss nahe, dass  $\beta$ -Glucosidasen am Metabolismus zwischen Resveratrol und Piceid beteiligt sind und, dass sie in der lebenden Pflanze wirken und nicht das Ergebnis der Extraktion sind. |

Da die Akkumulation von Resveratrol mit der Resistenz gegen verschiedene pilzliche Organismen korreliert ist und in *in vitro*-Tests mit physiologischen Konzentrationen auf *Botrytis cinerea* toxisch wirkt (ADRIAN et al. 1998), kann man zwar Resveratrol als Phytoalexin bezeichnen, doch wird ihm nur eine geringe fungizide Wirkung zugesprochen

(JEANDET et al. 2002). Pterostilbene, die dimethylierten Derivate von Resveratrol, sind fünfmal aktiver als Resveratrol (LANGCAKE et al. 1979b).  $\epsilon$ -Viniferin weist eine fungizide Aktivität bezüglich der Sporenkeimung von *Botrytis* auf, die mit der von Pterostilben zu vergleichen ist (SANDRA et al. 1990).

#### 4.4.2.1 Nachweis der Resveratrol-Wirksamkeit mittels Transformationen

Die Fähigkeit Resveratrol-Derivate synthetisieren zu können, scheint nachweislich für die fungizide Wirkung ausschlaggebend zu sein. Dies zeigten transgene Alfalfa-Pflanzen mit ihrer Fähigkeit Piceid zu synthetisieren, was gleichzeitig zu einer signifikanten Reduktion der Größe, der durch *Phoma medicaginis* verursachten, Läsionen führte (HIPSKIND und PAIVA 2000). Sowohl bei transgenen Tabakpflanzen (STEIN und BLAICH 1985; HAIN et al. 1992, 1993), transgenen Alfalfa-Pflanzen (HIPSKIND and PAIVA 2000) als auch bei transgenen Weizen- und Bohnen-Kulturen (LECKBAND und LÖRZ 1998) resultierte die Fähigkeit zur Resveratrol- oder Piceid-Synthese zu einer erhöhten Resistenz gegen pilzliche Pathogene. Eine Ausnahme bildet die Übertragung eines Stilben-Synthase-Gens aus Wein in eine Apfelpflanze, die zwar zu einer Synthese von Piceid (SZANKOWSKI et al. 2003), jedoch nicht zu einer gesteigerten Resistenz gegenüber *Venturia inaequalis* führte. Und auch transgene Kiwipflanzen akkumulierten zwar sowohl Resveratrol als auch Piceid (KOBAYASHI et al. 2000; SZANKOWSKI et al. 2003), zeigten jedoch ebenfalls keine gesteigerte Resistenz gegenüber *Botrytis cinerea*.

Entweder wird das Resveratrol in Kiwipflanzen derivatisiert oder die Übertragung von nur einem Stilbensynthase-Gen führte zwar zur ersten Akkumulation von Resveratrol, die abwehrrrelevanter zweite Akkumulation blieb, durch das Fehlen des zweiten Gens, jedoch aus.

Ein Ausbleiben von hemmenden Effekten gegenüber *Venturia inaequalis* könnte auf eine mangelnde fungizide Wirkung von Piceid gegenüber Apfelschorf basieren.

#### 4.4.3 Fungizide Wirkungen weiterer Flavonoide

Auch anderen im Weinkallus vorkommenden Verbindungen werden fungizide Wirkungen nachgesagt. So weisen mono- und oligomere Catechine antioxidative Wirkungen auf und fungieren als Radikalfänger (FEUCHT et al. 1996). Durch ihre Fähigkeit zur Polymerisation und ihre Affinität zu Makromolekülen, wie Proteinen, Cellulose und Pektinen (TREUTTER 1991), tragen sie neben der Beteiligung an physikalischer Barrieren, wie der Bildung von Suberin und Lignin, auch direkt durch Hemmung pilzlicher Pektinasen und Cellulasen oder durch Hemmung der oxidativen Phosphorylierung, zur Pathogenabwehr bei. Außerdem fördern sie auch den hypersensitiven Zellkollaps, der dem Erreger die Lebensgrundlage

entzieht (TREUTTER 1991). Proanthocyanidine besitzen ebenfalls die Fähigkeit, Stilben-Oxidasen zu hemmen (PEZET et al. 1992).

Bei dem Gärvorgang von Wein spielen phenolische Säuren eine entscheidende Rolle bei der Eindämmung von Mikroorganismen, besonders von Bakterien (BACHMANN 1978). Eine fungizide Wirkung gegen Pilzparasiten der Rebe mit physiologisch vertretbaren Konzentrationen von Phenolcarbonsäuren, konnte jedoch noch nicht bestätigt werden.

Dennoch erfahren Weinkalluszellen durch Elicitation mit *Aureobasidium pullulans*-Hefefiltrat – wie auch durch eine UV-Bestrahlung von Trauben (KOLB et al. 2003) - eine Akkumulation der p-Cumarsäure.

#### **4.4.4 Hemmung des Infektionsverlaufs von *Botrytis cinerea* durch Hefefiltrat**

In Versuch 5 konnte gezeigt werden, dass eine Elicitation mit *Aureobasidium pullulans*-Hefefiltrat die Akkumulation verschiedener Phenylpropanoide bei gleichzeitiger Verzögerung des Infektionsverlaufs nach einer *Botrytis cinerea*-Inokulation, induzierte.

Da bei den meisten Untersuchungen nach Infektionen von *Vitis vinifera* mit dem Schimmelpilz *Botrytis cinerea*, die Metabolisierung von Stilbenen im Mittelpunkt stand, war auch in dieser Untersuchungsreihe, die Synthese von Resveratrol-Derivaten Hauptgegenstand der Betrachtung.

Obwohl sich in den Zellwänden von *Botrytis cinerea* Stoffe befinden, die die Bildung von Resveratrol induzieren könnten, konnten zu keinem Entnahmetermin nach *Botrytis*-Infektion ähnlich deutliche Induktionen beobachtet werden wie nach einer Elicitation mit Hefefiltrat (Abbildung 81). Der schnelle Infektionsverlauf nach der *Botrytis*-Inokulation zeigt, dass die Kalli der sonst *Botrytis*-toleranten Weinsorte „Nero“ im Gegensatz zu Pflanzen, nicht mit einer Resveratrol-Akkumulation zur Pathogenabwehr reagieren. Dass sie die Fähigkeit für diese Syntheseschritte besitzen, zeigt jedoch die Induzierbarkeit durch die Hefebehandlungen. Möglicherweise befinden sich die Rezeptoren für die Erkennung dieses Pathogens in Gewebetypen, wie zum Beispiel der Epidermis von Blättern oder Fruchtschalen, die in den kambialen Zellen der Kalluskultur nicht aktiviert waren.

Der Verlauf der *Botrytis cinerea*-Infektion in den Kalli resultierte in einer sichtbaren Zellzerstörung, bei der die Induktion von Resveratrol-Derivaten jedoch ausblieb. Daher kann auf einen Induktionsmechanismus geschlossen werden, der eine Elicitation durch endogene Faktoren ausschließt.

Eine *Botrytis*-Infektion führte auch nach einer Vorbehandlung mit den *Aureobasidium pullulans*-Hefefiltrat nicht zu einer sekundären Stoffakkumulation. Demnach war ausschließlich die Induktion durch eine Hefefiltratbehandlung für den verzögerten

Infektionsverlauf in Versuch 5 verantwortlich. Die vorherrschende Konzentration an Resveratrol-Derivaten reichte scheinbar jedoch nicht aus, um eine *Botrytis*-Infektion nachhaltig zu unterbinden. Da der Phenolgehalt der Sorte „Regent“ fünffach höher war als derjenige der Sorte „Nero“, sollte das Resistenzverhalten bei „Regent“ in künftigen Untersuchungen genauer betrachtet werden.

So ist es für das Verständnis von Resistenzmechanismen zwischen Wein und *Botrytis* wichtig zu wissen, ob ein stärkeres Induktionsvermögen mit daraus resultierenden höheren Konzentrationen von Resveratrol-Derivaten, wie es bei der Weinsorte „Regent“ gegeben ist, auch bei Kalluszellen zu einer nachhaltigen Eindämmung von *Botrytis cinerea*-Infektionen führen kann, oder ob gewebespezifische Gegebenheiten vorhanden sein müssen, um eine zufriedenstellende Pathogenabwehr zu gewährleisten.

#### **4.5 Stickstoff als weitere Einflussgröße auf den Sekundärstoffwechsel**

Die Induzierbarkeit der Kalli durch Hefefiltrat wurde deutlich von deren Stickstoffversorgung beeinflusst. Aufgrund der vielseitigen Einflussnahme von Stickstoff auf den Primär- und Sekundärstoffwechsel sind Interpretationen dieser komplexen Zusammenhänge in Kombination mit Induktionsmechanismen sehr gewagt. Es wird allgemein die Meinung vertreten, dass die Pflanze versucht, den Gehalt an freiem Phenylalanin im Gewebe möglichst gering zu halten und daher bei einem Stickstoff-Überschuss vermehrt Proteine zu bilden. Bei geringem Stickstoffangebot investiert die Pflanze vermehrt in phenolische Inhaltsstoffe (MARGNA 1977). Aber auch die Enzymaktivitäten, Vitamine, Phytohormone sowie DNS und RNS und damit auch die Transkriptionsvorgänge werden direkt durch Veränderungen in der Stickstoffverfügbarkeit beeinflusst und wirken so auf den Primär- und Sekundärstoffwechsel. Über diese Wirkmechanismen hat die Stickstoffversorgung indirekten Einfluss auf das Resistenzpotential von Pflanzen. Dies spiegelt sich in der verstärkten Stilben-Akkumulation bei gleichzeitigem Rückgang der *Botrytis*-Anfälligkeit (STEIN und BLAICH 1985; BAVARESCO et al. 1994) und des Mehltaubefalls (KELLER et al. 2003) in Folge von verminderter Stickstoffversorgung bei Weinreben wieder. Die Intensitäten der Wechselwirkungen sind stark sortenabhängig (KELLER et al. 2003).

## 4.5 Ausblicke

Es konnte gezeigt werden, dass das Kulturfiltrat des hefeähnlichen Pilzes *Aureobasidium pullulans* den Sekundärstoffwechsel von Weinkalluszellen der Sorten „Regent“ und „Nero“ eliciert. Dabei scheint die Elicitation spezifisch genug zu sein, um verschiedene Resveratrol-Derivate zu induzieren. Da vielen dieser Verbindungen fungizide Wirkungen zugesprochen werden, die sich besonders gegen Schimmelerreger wie *Botrytis cinerea* und *Penicillium* ssp. richten, wäre die Nutzung des Filtrates als Pflanzenschutzmaßnahme zur Resistenzinduktion im Weinanbau eine vielversprechende Perspektive, zumal diese Hefe als ein epiphytischer Bewohner von *Vitis vinifera* gilt.

Neben weiteren Aufreinigungen und Identifizierungen, besonders von Resveratrol-Derivaten, mittels exakter Methoden wie massenspektroskopischen Untersuchungen, sollte das Modellsystem Kalluskultur in einzelnen Faktoren modifiziert werden. So sollte die Medienzusammensetzung für die Kultur der Weinkallussorte „Nero“ derart optimiert werden, dass eine stärkere Synthese und Stoffakkumulation der Sekundärmetaboliten erfolgt.

Um eine bessere Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Versuchen zu erzielen, sollte eine Methode entwickelt werden, die die physiologische Aktivität der Kalluszellen messbar macht. Auch könnte die Vereinheitlichung der Vorkultur der Weinkalli und der Versuchsdauer zu homogeneren Ergebnissen führen.

Um den Einfluss von Stickstoff als weitere Einflussgröße genauer untersuchen zu können, sollten neben der Pufferung des pH-Werts im Medium auch feinere Dosierungen in der Stickstoffkonzentration eingesetzt werden. Um eine echte Mangelvariante zu erzielen, sollte dabei die Stickstoffkonzentration bis zur Verminderung der Biomassenproduktion, abgesenkt werden. Auch andere Kombinationen der Stickstoffformen wären denkbar.

Zur Ermittlung der Akkumulationsdynamik der verschiedenen Stoffgruppen, könnten kleinere Entnahmeintervalle bei der Probenahme dienlich sein. Eine Verminderung der Streuung durch eine gesteigerte Probenzahl ist in dieser Form der Versuchsdurchführung kaum zu bewerkstelligen, so dass eine Bestätigung der Versuchsergebnisse durch Versuchswiederholung durchgeführt werden sollte.

Um Wirksamkeitsvergleiche mit schon etablierten Hefepräparaten durchführen zu können, müsste die Konzentration, des hier verwendeten Filtrates von *Aureobasidium pullulans* mit der des käuflichen Präparates vergleichbar gemacht werden, was aufgrund nicht bekannter Herstellerbeimischungen nicht einfach möglich sein wird. Jedoch könnten, durch eine Vereinheitlichung der Hefeaufbereitung mittels Gefriertrocknung und anschließender Einwaage, homogenere Phenolakkumulationen nach der Elicitation mit *Aureobasidium pullulans* erzielt werden.

Diesbezüglich wäre es von größtem Interesse, die Wirkbestandteile in dem Hefefiltrat genauer zu charakterisieren.

Für die Erfassung von Wirkmechanismen in den Zellen nach der Elicitation sind Untersuchungen bezüglich der Genaktivierung für Enzyme wie PAL, Chalkonsynthase und Stilbensynthase von Ausschlag gebender Bedeutung. Auch die Aktivität von Peroxidasen ist, für eine mögliche aktive Polymerisation von Resveratrol zu den verschiedenen Viniferinen, eine wichtige Einflussgröße.

Um mögliche Abweichungen zwischen Pilz-toleranten (resistenten) und Pilz-anfälligen Weinsorten hinsichtlich Aktivierung von Resistenzmechanismen gegenüber stellen zu können, sollten weitere, auch anfällige, Weinsorten als Kalluskultur etabliert und in ein Versuchsprogramm aufgenommen werden. Dazu sollten Inokulationversuche mit *Botrytis cinerea* als Sekundärbehandlung nach Elicitation mit dem Hefefiltrat durchgeführt werden.

Eines der wichtigsten Anliegen dieser Untersuchung ist die Übertragbarkeit der Ergebnisse aus Kalluskulturen auf naturnahe Pflanzensysteme. Für eine Elicitation von Weinblättern oder Früchten muss ein Kontakt zwischen Wirkbestandteilen des Filtrates und der Pflanzenzelle erfolgen, was die Entwicklung einer geeigneten Formulierung voraussetzt. Erste Versuche an *in vitro* kultivierten Weinpflanzen der Sorte „Nero“ und Anwendungen an Freilandpflanzen, führten bislang nicht zu erkennbaren Induktionsreaktionen. Die Möglichkeiten, ob das Ausbleiben von Resveratrol-Akkumulationen durch einen fehlenden Kontakt zwischen Elicitor und Zelle oder durch einen Verdünnungseffekt im Gewebesystem Blatt, durch eine geringe Anzahl zur Resveratrolsynthese befähigter Zellen verursacht wird, könnten durch mikroskopische Untersuchungen eingegrenzt werden.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erzielten Erkenntnisse, bieten eine sehr gute Grundlage für die Entwicklung völlig neuer Ansätze eines effektiven Pflanzenschutzverfahrens. Die Verwendung von epiphytischen Mikroorganismen, aus dem Ökosystem der Weinrebe, als Induktor des Resistenzpotentials gegen Schimmelpilze, könnte besonders für den biologischen Weinanbau von Bedeutung sein und so eine umweltgerechte Produktion von qualitativ hochwertigem Obst unterstützen.

## 5 Zusammenfassung

Pilzliche Pathogene wie *Botrytis cinerea* und *Penicillium* ssp. rufen weltweit erhebliche Ernteverluste im Weinanbau hervor. Untersuchungsansätze für einen umwelt-, anwender- und gesundheitsfreundlichen Pflanzenschutz im Obstanbau weisen auf die mögliche Nutzung von nicht-pathogenen Mikroorganismen, wie zum Beispiel Hefen, zur Eindämmung von pilzlichen Erregern hin. Dabei liegt der Untersuchungsschwerpunkt in einem direkten Antagonismus zwischen Hefe und Pathogen, besonders in der Nacherntebehandlung.

Ferner steht immer häufiger die Beteiligung von phenolischen Verbindungen als wirkungsvoller Abwehrmechanismus gegen Pathogene im Mittelpunkt von Untersuchungen. In der vorliegenden Arbeit konnte durch Behandlungen mit einem Kulturfiltrat des nicht-pathogenen, hefeähnlichen Pilzes *Aureobasidium pullulans* sowohl eine Induktion von konstitutiven phenolischen Verbindungen als auch eine Neusynthese von abwehrrelevanten Resveratrol-Derivaten in Weinkalli, der als pilztolerant bekannten Sorten „Regent“ und „Nero“, hervorgerufen werden. Neben der Identifizierung der Strukturen von Phenylpropanoiden im Weinkallus lag der Schwerpunkt dieser Untersuchung in der Induzierbarkeit von potentiell resistenzfördernden Verbindungen durch Behandlungen mit dem Kulturfiltrat von *Aureobasidium pullulans*.

Die wichtigsten Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Behandlungen von Weinkalli der Sorten „Regent“ und „Nero“ mit einem Hefefiltrat von *Aureobasidium pullulans*, welches vor der Filtratgewinnung zum Abtöten der Hefezellen autoklaviert worden war, führte zu einer Akkumulation der gesamten Phenylpropanoide. Somit kann dieses Filtrat als Elicitor bezeichnet werden.
2. Neben konstitutiv vorkommenden Verbindungen wie mono- und oligomeren Catechinen, phenolische Säuren, Flavonolen und einige Resveratrol-Derivaten, die durch eine Elicitation mit Hefefiltrat eine Induktion erfuhren, wurde ferner eine Synthese von neuen, als abwehrrelevant geltenden Verbindungen erzielt, die den Resveratrol-Derivaten zugeordnet werden konnten.
3. Einige konstitutiv vorkommenden, potentiell an Resistenzreaktionen beteiligte Resveratrol-Derivate wurden identifiziert. Es handelt sich dabei vorwiegend um die Resveratrol-Glucoside cis- und trans-Piceid, die beide in vergleichbarer Konzentration vorkommen und die vorherrschenden konstitutiven Resveratrol-Derivate darstellen. Das Aglykon trans-Resveratrol kommt konstitutiv nur in sehr geringen Mengen im Weinkallus vor.



4. Eine Elicitation mit dem Hefefiltrat führte zu einer Neusynthese von Verbindungen, die als das Aglykon trans-Resveratrol und als weitere Resveratrol-Derivate identifiziert wurden. Es gibt Indizien, dass es sich bei diesen Derivaten um Pallidole und Viniferine handelt, die als resistenzrelevante Verbindungen gelten und fungizide Eigenschaften aufweisen.
5. Die Konzentration des *Aureobasidium pullulans*-Filtrates hatte keinen Einfluss auf die Induktionsintensität der Gesamt-Phenylpropanoide, schien jedoch Einfluss auf die Akkumulation von Resveratrol-Derivaten zu haben. Dabei führte eine Erhöhung der Elicitorkonzentration zu einer gesteigerten Stoffakkumulation, bei gleichzeitiger Abnahme von Flavonoiden.
6. Das als Vorstufe für weitere Derivate geltende Aglykon trans-Resveratrol erfuhr schon 10 Stunden nach einer Elicitation mit Hefefiltrat eine deutliche Akkumulation. Die anderen Resveratrol-Derivate akkumulierten zeitlich verzögert. Dabei hatte die Elicitorkonzentration keinen Einfluss auf die Synthesegeschwindigkeit von Resveratrol und dessen Derivaten. Auch verlief der erste Akkumulationsschub unabhängig von der Filtratkonzentration (Resveratrol: bis 10 Stunden nach Behandlung, die anderen Derivate: bis 24 Stunden nach Behandlung). Das weitere Akkumulationsverhalten war jedoch bei allen auf dem Resveratrol basierenden Verbindungen durch eine verminderte Elicitorkonzentration reduziert.
7. Die Stickstoffverfügbarkeit im Kulturmedium der Kalluskultur wirkte sich auf den Primärstoffwechsel nur geringfügig aus. Bezüglich des Sekundärstoffwechsels, führte eine verminderte und, in geringerem Maß, auch eine übermäßige Stickstoffversorgung der Weinkalli zu erhöhten Konzentrationen an Gesamtphenolen, Catechinen, Flavonolen, Anthocyanen und konstitutiven Resveratrol-Derivaten im Vergleich zu Kalli, die einer mittleren Stickstoffversorgung ausgesetzt waren. Die Konzentrationen der, als einfache Phenole bezeichneten, Verbindungen nahmen mit zunehmender Stickstoffverfügbarkeit im Medium zu, die Gehalte an Hydroxymitsäuren und Gallussäuren hingegen ab.
8. Die Wechselwirkungen der Einflussgrößen Stickstoffverfügbarkeit und Elicitation durch Hefefiltrat führten in den verschiedenen Stoffgruppen zu unterschiedlichen Akkumulationsverhalten, die in weiteren Untersuchungen noch deutlicher zugeordnet werden müssen. Es ist jedoch ersichtlich, dass eine verminderte Stickstoffverfügbarkeit zu einer schnelleren Synthese von Resveratrol und Resveratrol-Derivaten in Weinkalli führte.
9. Auf die genauere Charakterisierung der Wirkbestandteile des Filtrates von *Aureobasidium pullulans* wurde in dieser Untersuchung nicht eingegangen. Es konnte nur festgestellt werden, dass die elicitierenden Bestandteile hydrophobe

Eigenschaften besitzen. Die hydrophilen Bestandteile zeigten in keiner der Stoffgruppen eine deutliche Reaktion.

10. Eine Inokulation der Weinkalli mit einer *Botrytis cinerea*-Konidiensuspension führte zum Überwachsen der Weinkalli mit Pilzmycel, was innerhalb von 48 Stunden zum Verbräunen der Zellen führte. Eine *Botrytis*-Infektion brachte jedoch keine Akkumulation irgendeines Phenylpropanoids mit sich.
11. Durch eine Vorbehandlung mit dem Kulturfiltrat von *Aureobasidium pullulans* wurde das Mycelwachstum nach einer Inokulation mit *Botrytis cinerea* deutlich verzögert. Die Verzögerung der Pathogenausbreitung war begleitet von einer deutlichen Akkumulation an konstitutiven (ein p-Cumarsäure-Derivat, Catechine, cis/trans-Piceid) und neu synthetisierten Verbindungen (trans-Resveratrol, Pallidole, Viniferine).

Es konnte gezeigt werden, dass das Kulturfiltrat des hefeähnlichen Pilzes *Aureobasidium pullulans* als wirkungsvoller Elicitor in Weinkalluskulturen fungiert und eine Neusynthese von Resveratrol-Derivaten hervorruft. Durch die Veränderungen im Sekundärstoffwechsel scheint das Resistenzpotenzial der Weinkalluszellen positiv beeinflusst zu werden.

## 6 Literaturverzeichnis

- ABOU-HEILAH, A.N., 1985: Post harvest diseases of some fruits and their chemical control. *International Journal of Tropical Plant Diseases* 3, 193-196
- ADIKARAM, N.K.B., JOYCE, D.C., TERRY, L.A., 2002: Biocontrol activity and induced resistance as a possible mode of action for *Aureobasidium pullulans* against gray mould of strawberry fruit. *Australian Journal of Plant Physiology* 31, 223-229
- ADRIAN, M., JEANDET, P., BESSIS, R., JOUBERT, J.M., 1996: Induction of phytoalexin (resveratrol) synthesis in grapevine leaves treated with aluminum chloride (AlCl<sub>3</sub>). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 1979-1981
- ADRIAN, M., DAIRE, X., JEANDET, P., BREUIL, A.C., WESTON, L.A., BESSIS, R., BOUDON, E., 1997a: Comparisons of stilbene synthase activity (resveratrol amounts and stilbene synthase mRNAs levels) in grapevines treated with biotic and abiotic phytoalexin inducers. *American Journal of Enology and Viticulture* 48, 394-395
- ADRIAN, M., JEANDET, P., VENEAU, J., WESTON, L.A., BESSIS, R., 1997b: Biological activity of resveratrol, a stilbenic compound from grapevine, against *Botrytis cinerea*, the causal agent for gray mold. *Journal of Chemical Ecology* 23, 1689-1702
- ADRIAN, M., RAJAEI, H., JEANDET, P., VENEAU, J., BESSIS, R., 1998: Resveratrol oxidation in *Botrytis cinerea* conidia. *Phytopathology* 88, 472-476
- ADRIAN, M., JEANDET, P., BREUIL, A.C., LEVITE, D., DEBORD, S., BESSIS, R., 2000a: Assay of resveratrol and derivated stilbenes in wines by direct injection high performance liquid chromatography. *American Journal of Enology and Viticulture* 51, 37-41
- ADRIAN, M., JEANDET, P., DOUILLET-BREUIL, A.C., TESSON, L., BESSIS, R., 2000b: Stilbene content of mature *Vitis vinifera* berries in response to UV-C-elicitation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 6103-6105
- ALAN, E.F., HEPPLER, P.K., 1986: In : STUMPF, P.K. (Eds), *The Biochemistry of Plants*, New York Academic
- ALESSANDRO, M., MARCO S. DI, OSTI F., CESARI A., 2000: Bioassay on the activity of resveratrol, pterostilbene and phosphorous acid towards fungi associated with escape of grapevine. *Phytopathologia-Mediterranae* 39, 357-365
- ALLAN, D.L., COOK, B.D., ROSEN, C.J., 1994: Nitrogen form and solution pH effect on organic acid content of cranberry roots and shoots. *Hortscience* 29, 313-315
- ALT, D., SCHMIDLE, A., 1980: Untersuchungen über mögliche Resistenzfaktoren des Apfels gegen *Phytophthora cactorum*. *Angewandte Botanik* 54, 139-156
- ANDREWS, J.H., KENERLEY, C.M., 1980: Microbial populations associated with buds and young leaves on apple. *Canadian Journal of Botany* 58, 847-855
- ANONYM 2005: Enius AG, <http://schimmel-schimmelpilz.de/schimmelpilz/aureobasidium-pullulans.html>
- ANONYM 2005: Mold Inspector Laboratory International, <http://www.mold.ph/aureobasidium.htm>
- ANONYM 2004: NCBI Blastn 2.2.9 [Mai 01-2004]-Datenbank.

- ANONYM 2005: Merops- Die Peptidase-Datenbank
- HYPERLINKAPOSTOL, I., HEINSTEIN, H., LOW, P.S., 1989a: Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. Role in defense and signal transduction. *Plant Physiology* 90, 109-116
- APOSTOL, I., LOW, P.S., HEINSTEIN, P., 1989b: Effect of age and cell suspension cultures on susceptibility to a fungal elicitor. *Plant Cell Reports* 7, 692-695
- ARNAUD, 1910: *Aureobasidium*. In DOMSCH, K.H., GAMS, W., ANDERSON, T.H. (Eds.), *Compendium of Soil Fungi* Volume I, IHW-Verlag Reprint 1993
- ARRAS, G., 1996: Mode of action of an isolate of *Candida famata* in biological control of *Penicillium didigitatum* in orange fruits. *Postharvest Biology and Technology* 8, 191-198
- AYRAN, A., WILLSON, B., STRAUSS, C., WILLIAMS, P., 1987: The properties of glycosidases of *Vitis vinifera* and a comparison of their  $\beta$ -glucosidase activity with that of exogenous enzymes. An assessment of possible applications in ecology. *American Journal of Enology and Viticulture* 38, 182-188
- BACHMANN, O., 1978: Verbreitung von Phenolcarbonsäuren und Flavonoiden bei Vitaceen. *Vitis* 17 234-257
- BADERSCHNEIDER, B., WINTERHALTER, P., 2000: Isolation and characterization of novel stilbene derivatives from riesling wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 2681-2686
- BARANOWSKI, J.D., NAGEL, C.W., 1981: Isolation and identification of the hydroxycinnamic acid derivatives in white riesling wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 32, 5-13
- BARNES, E.H., WILLIAMS, E.B., 1961: The role of phloridzin in the host-parasite physiology of the apple scab disease. *Canadian Journal of Microbiology* 7, 525-534
- BARNETT, J.A., 1996: 'Yeast Identification Program', Version 4/1996 (ISBN 091314890)
- BASSE, C.W., BOLLER, T., 1992: Glycopeptide elicitors of stress responses in tomato cells N-linked glycans are essential for activity but act as suppressors of the same activity when released from the glycopeptides. *Plant Physiology Biochemistry* 98, 1239-1247
- BAUMGARTNER, D., ROTH, I., RUFFNER, H., 1998: Phenolische Inhaltsstoffe des Weinblattes. *Schweizer Zeitung Obst-Weinbau* 24/98, 606-608
- BAVARESCO, L., EIBACH, R., 1987: Investigations on the influence of N fertilizer on resistance to powdery mildew (*Oidium tucher*), downy mildew (*Plasmopara viticola*) and on phytoalexin synthesis in different grapevine varieties. *Vitis* 26, 192-200
- BAVARESCO, L., FREGONI, M., PETEGOLLI, D., 1994: Effect of nitrogen and potassium fertilizer on induced resveratrol synthesis in two grapevine genotypes. *Vitis* 33, 175-176
- BECKER, J., 2000: Induction of competence for elicitation of defense responses in cucumber hypocotyls requires proteasome activity. *Plant Journal* 21, 311-316
- BECKMANN, C.H., MUELLER, W.C., MACE, M.E., 1974: The stabilization of artificial and natural cell wall membranes by phenolic infusion and its relation to wilt disease resistance. *Phytopathology* 64, 1214-1220

- BENBOW, J.M., SUGAR D., 1999: Fruit surface colonization and biological control of postharvest diseases of pear by preharvest yeast application. *Plant Disease* 83, 839-844
- BENHAMOU, N., BÉLANGER, R.R., 1998: Induction of systemic resistance to *Pythium* damping-off in cucumber plants by benzothiadiazole: ultrastructure and cytochemistry of the host response. *Plant Journal* 14, 13-21
- BENHAMOU, N., NICOLE, M., 1999: Cell biology of plant immunization against microbial infection: The potential of induced resistance in controlling plant diseases. *Plant Physiology and Biochemistry* 37, 703-719
- BÉZIER, A., LAMBERT, B., BAILLIEUL, F., 2002: Study of defense-related gene expression in grapevine leaves and berries infected with *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* 108, 111-120
- BLAICH, R., 1977: Versuche zur künstlichen Mykorrhizabildung bei *Vitis riparia*. *Vitis* 16, 32-37
- BLAICH, R., RUSTER, D., 1979: Der Infektionszeitpunkt als Kriterium für parasitäres oder mykotrophes Verhalten von *Aureobasidium pullulans* auf *Vitis riparia*. *Vitis* 18, 21-30
- BLAICH, R., BACHMANN, O., 1980: Die Resveratrol-Synthese bei Vitaceen: Induktion und zytologische Beobachtungen. *Vitis* 19, 230-240
- BOEKHOUT, T., SCORZETTI, G., 1997: Differential killer toxin sensitivity patterns of varieties of *Cryprococcus neoformans*. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* 35, 147-149
- BORIE, B., JEANDET, P., PARIZE, A., BESSIS, R., ADRIAN, M., 2004: Resveratrol and stilbene synthase mRNA production in grapevine leaves treated with biotic and abiotic phytoalexin elicitors. *American Journal of Enology and Viticulture* 55, 60-64
- BOSTOCK, R.M., LINE, R.A., KUC, J.A., 1982: Factors affecting the elicitation of sesquiterpenoid phytoalexin accumulation by eicosantaeonic acids in potato. *Plant Physiology* 70, 1417-1424
- BOWLES, D.J., 1990: Defense-related proteins in higher plants. *Annuals. Revue of Biochemistry* 59, 873-907
- BOUSTED, C., SMALLWOOD, M., SMALL, H., BOWLES, D.J., WALKER, J., 1989: FEBS Letters, 244, 456-460
- BREHM, I., PREISIG-MÜLLER, R., KINDL, H., 1999: Grapevine protoplasts as transient expression system for comparison of stilbene synthase gene containing cGMP-responsive promoter elements. *Zeitschrift für Naturforschung* 54, 220-229
- BREUIL, A.C., JEANDET, P., ADRIAN, M., CHOPIN, F., PIRIO, N., MEUNIER, P., BESSIS, R., 1999: Characterization of a pterostilbene dehydrodimer produced by laccase of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 89, 298-302
- BULAT, S.A., MIRONENKO, N.V., 1992: Polymorphism of the yeastlike fungus *Aureobasidium pullulans* (De Bary) detected with universally primed-polymerase reaction: species divergence. *Genetics* 28, 19-30
- BUSAM, G., KASSEMAYER, H.H., MATERN, U., 1997a: Differential expression of chitinases in *Vitis vinifera* L. responding to systemic acquired resistance activators or fungal challenge. *Plant Physiology Rockville* 115, 1029-1038

- BUSAM, G., JUNGHANNS, K.T., KNEUSEL, R.E., KASSEMAYER, H.H., MATERN, U., 1997b: Characterization and expression of caffeoyl-coenzyme A 3-O-methyltransferase proposed for the induced resistance response of *Vitis vinifera* L. *Plant Physiology Rockville* 115, 1039-1048
- CALDERON, A.A., PEDRENO, M.A., ROSBARCELO, A., MUNOZ, R., 1990: Zymographic screening of plant peroxidase isoenzymes oxidizing 4-hydroxystilbenes. *Electrophoresis*, 11, 507-508
- CALDERON, A.A., ZAPATA, J.M., PEDRENO, M.A., MUNOZ, R., BARCELO, R.A., 1992: Levels of 4-hydroxystilbene-oxidizing isoperoxidases related to constitutive disease resistance in in vitro-cultured grapevine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 29,(2), 63-70
- CALVO, J., CALVENTE V., ORELLANO DE M.E., BENUZZI D., TOSETTI DE M.I.S., 2003: Improvement in the biocontrol of postharvest diseases of apples with the use of yeast mixtures. *Biosis Reviews*
- CANTOS, E., ESPIN J.C., TOMAS-BARBERAN F.A., 2002: Postharvest stilben-enrichment of red and white table grape varieties using UV-C irradiation pulses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 6322-6329 (ISSN 0021-8561)
- CANTOS, E., TOMAS, B.F.A., MARTINEZ, A., 2003: Differential stilbene induction susceptibility of seven red wine grape varieties upon post-harvest UV-C irradiation. *European Food Research and Technology* 217, 253-258
- CARANDO, S., TEISSEDE, P.L., WAFFO-TEGUO, P., CABANIS, J.C., DEFFIEUX, G., MERILLON, J.M., 1999: High-performance liquid chromatography coupled with fluorescence detection for the determination of trans-astringin in wine. *Journal of chromatography A* 849, 617-620
- CASTORIA, R., DE CURTIS, F., LIMA, G., PACIFICO, S., DE CICCIO, V., 1997: Extracellular fungal wall depolymerases and antagonism of an isolate of *Aureobasidium sp.* against postharvest pathogen. In: BERTOLINI, P., SIJMONS, P.C., GUERZONI, M.E., SERRA, F. (Eds), *Non Conventional Methods for the Control of Post-harvest disease and microbiological spoilage. Workshop Proceedings COST 914-COST 915, Bologna, Italy*, 105-110
- CASTORIA, R., CURTIS DE, F., LIMA, G., CAPUTO, L., PACIFICO, S., CICCIO DE, V., 2000: *Aureobasidium pullulans* (LS-30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits: study on its modes of action. *Postharvest Biology and Technology* 22, 7-17
- CASTORIA, R., CAPUTO, L., MORENA, V., CICCIO, D.E V., ELAD, Y., 2002: Biocontrol yeasts metabolize the mycotoxin patulin. *IOBC-WPRS Working Group "Biological Control of Fungal and Bacterial Plant Pathogens"* 25 (20), 41-44
- CELIMENE, C.C., SMITH, D.R., YOUNG, R.A., STANOSZ, G.R., 2001: In vitro inhibition of *Sphaeropsis sapinea* by natural stilbenes. *Crop Protection* 56, 161-165
- CERVONE, F., HAHN M.G., DE LORENZO, G., DARVILL, A., ALBERSHEIM, P., 1989: Hostpathogen interactions. XXXIII: A plant protein converts a fungal pathogenesis factor into an elicitor of plant defense responses. *Plant Physiology* 90, 542-548
- CHAND-GOYAL, T., SPOTTS, R.A., 1996a: Postharvest biological control of blue mold of apple and brown rot sweet cherry by natural saprophytic yeasts alone or in combination with low doses of fungicides. *Biological Control* 6, 253-259

- CHAND-GOYAL, T., SPOTTS, R.A., 1996b: Enumeration of bacterial and yeast colonists of apple fruits and identification of epiphytic yeasts on pear fruits in the Pacific Northwest United States. *Microbiological Research* 151, 427-432
- CHIRON, H., DROUET, A., LIEUTIER, F., PAYER, H.D., ERNST, D., SANDERMANN, H., 2000: Gene induction of stilbene biosynthesis in Scots pine in response to ozone treatment, wounding, and fungal infection. *Plant Physiology* 124, 865-872
- CHISAKI, N., 1997: Responses of secondary metabolism in plants to nutrient deficiency. *Soil Science and Plant Nutrition* 43 (special issue), 987-991
- CLARK, D.S., WALLACE, R.H., DAVID, J.J., 1954: Yeasts occurring on apples and in apple cider. *Canadian Journal of Microbiology* 1, 145-149
- COLGAN, R.J., BERRIE, A.M., XU, X.M., HARRIS, D.C., ROBERTS, A.L., EVANS, K., BARBARA, D.J., GESSLER, C., 1997: Reducing the reliance on post-harvest fungicides to control storage rots of apples and pears. *Proceedings of the 4th workshop on Integrated control of pome fruit diseases* 20(9) 69-76
- CONRAD, K. 2000a: Phytoalexin-Elicitierung und Bekämpfung von phytopathogenen Pilzen durch Extrakte aus Industriehefen. *Botanikertagung vom 17. - 22. Sept.*
- CONRAD, K., 2000b: Phytoalexin elicitation and protection against phytopathogenic fungi by extracts of industrial yeast. *Plant Physiology and Biochemistry* 38, 218
- CONRATH, U., CHEN, Z., MALAMY, J., DURNER, J., HENNING, J., SANCHEZ-CASAS, P., SILVA, H., RICIGLIANO, J., KLESSIG, D.F., 1996: The salicylic acid signal for the activation of plant disease resistance, induction, modification, perception and transduction. In: *LYR, H., RUSSEL, P.F., SISLER, H.D. (Eds), Modern fungicides and antifungal compounds, 11th Symposium. Intercept, Andover* 467-473
- CONRATH, U., PIETERSE, C.M.J., MAUCH-MANI, B., 2002: Priming in plant-pathogen interactions. *Trends in Plant Science* 7, 210-216
- CONSTABEL, F., EILERT, U., 1986: Elicitation of product accumulation. *IAPTC-Newsletter* 02-July
- COOK, D.W.M., LONG, P.G., GANESH, S., 1999: The combined effect of delayed application of yeast biocontrol agents and fruit curing for the inhibition of the postharvest pathogen *Botrytis cinerea* in kiwifruit. *Postharvest Biology and Technology* 16, 233-243
- COOKE, W.B., 1959: An ecological life history of *Aureobasidium pullulans* (de Bary) Arnaud. *Mycopath. Mycol. Appl.*, 12, 1-45
- CREELMAN, R.A., RIERNEY, M.L., MULLET, J.E., 1992: Jasmonic acid/methyl jasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyls and modulate wound gene expression. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 89, 4938-4941
- CREEMERS, P., 2001: Alternative methods for the control of cryptogamic diseases: resistance induced by natural products. *Fruit Belge* 69, 494, 201-209
- DECENDIT, A., MERILLON, J.M., 1996: Condensed tannin and anthocyanin production in *Vitis vinifera* cell suspension cell cultures. *Plant Cell Reports* 15, 762-765
- DECENDIT, A., RAMAWAT, K.G., WAFFO, P., DEFFIEUX G., BADFOC, A., MERILLON, J.M., 1996: Anthocyanins, catechins, condensed tannins, and piceid production in *Vitis vinifera* cell bioreactor cultures. *Biotechnology Letters* 18, 659-662

- DECENDIT, A., WAFFO-TEGUO, P., RICHARS, T., KRISA, S., VERCAUTEREN, J., MONTI, J.P., DEFFIEUX, G., MERILLON, J.M., 2002: Galloylated catechins and stilbene diglucosides in *Vitis vinifera* cell suspension cultures. *Phytochemistry* 60, 795-798
- DELAUNAY, J.C., CASTAGNINO, C., CHEZE, C., VERCAUTEREN, J., 2002: Preparative isolation of polyphenolic compounds from *Vitis vinifera* by centrifugal partition chromatography. *Journal of chromatography A* 964, 123-128
- DERCKX, W., CREASY, L.L., 1989: Influence of foseetyl-Al on phytoalexin accumulation in the *Plasmopara viticola*-grapevine interaction. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* 34, 203-213
- DIXON, R.A., DEY, P.M., LAWTON, M.A., LAMB, C.J., 1983: Phytoalexin induction in French bean. Intercellular transmission of elicitation. *Plant Physiology* 71, 251-256
- DIXON, R.A., LAMB, C.J., 1990: Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. *Annual Revue of Plant Physiology* 41, 339-367
- DIXON, R.A., HARRISON, M.J., PAIVA, N.L., 1994: The isoflavonoid phytoalexin pathway: from enzymes to genes to transcription factors. *Physiol. Plant* 93, 385-392
- DOMINGUEZ, C., GUILLEN, D.A., BARROSO, C.G., 2001: Automated solid-phase extraction for sample preparation followed by high-performance liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection for the analysis of resveratrol derivatives in wine. *Journal of chromatography A* 918, 303-310
- DOUILLET-BREUIL, A.C., JEANDET, P., ADRIAN, M., BESSIS, R., 1999: Changes in the phytoalexin content of various *Vitis spp.* in response to ultraviolet C elicitation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 4456-4461
- DROBY, S., CHALUTZ, E., WILSON, C.L., WISNIEWSKI, M.E., 1989: Characterization of the biocontrol activity of *Debaryomyces hansenii* in the control of *Penicillium digitatum* on grapefruit. *Canadian Journal of Microbiology* 35, 794-800
- DRÜGE, U., 2000: Influence of Pre-Harvest Nitrogen Supply on Post-Harvest Behavior of Ornamentals: Importance of Carbohydrate Status, Photosynthesis and Plant Hormones. *Gartenbauwissenschaften* 65, 53-64
- EBEL, J., 1986: Phytoalexin synthesis: the biochemical analysis of the induction process. *Annals of Rev. Phytopathology* 24, 235-264
- EBEL, J., COSIO, E.G., 1994: Elicitors of plant defense responses. *International Rev. of Cytology* 148, 1-36
- EDWARDS, R., DIXON, R., 1991: Isoflavone o-methyltransferase activities in elicitor-treated cell suspension cultures of *Medicago sativa*. *Phytochemistry* 30, 2597-2606
- EGGER, K., REICHLING, J., AMMANN-SCHWEIZER, R., 1976: Flavonol derivate in Formen der Gattung *Vitis*. *Vitis* 15, 24-28
- ELAD, Y., KOHL, J., FOKKEMA-NYCKLE, J., 1994: Control of infection and sporulation of *Botrytis cinerea* on bean and tomato by saprophytic yeasts. *Phytopathology* 84, 1193-1200
- ENGLISH, P.D., MAGLOTHIN, A., KEEGSTRA, K., ALBERSHEIM, P., 1972: A cell wall-degrading endopolygalacturonase secreted by *Colletotrichum lindemuthianum*. *Plant Physiology* 49, 293-297



- ESQUERRE-TUGAYE, M.T., BOTTIN, A., RICKAUER, M., SANCAN, J.P., FOURNIER, J., POUENAT, M.L., 1993: Ethylen in early signaling phenomena at the plant-microorganism interface. In: PECH, J.C., LATCHÉ, A., BALAGUÉ, C. (Eds) *Cellular and molecular aspects of the plant hormone ethylene*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht Boston London, 217-222
- ESTIARTE, M., FILELLA, I., SERRA, J., PENUELAS, J., 1994: Effects of nutrient and water stress on leaf phenolic content of peppers as susceptibility to generalist herbivore *Helicoverpa armigera* (Huber). *Oecologia-Berlin* 99, 387-391
- FAJARDO, J.E. 1998: Differential induction of proteins in orange flavedo by biologically based elicitors and challenged by *Penicillium digitatum* Sacc. *Biological Control* 13, 143-151
- FALCONI, C.J., MENDGEN, K., 1994: Epiphytic fungi on apple leaves and their value for control of the postharvest pathogens *Botrytis cinerea*, *Monilia fructigena* and *Penicillium expansum*. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 101, 38-47
- FEUCHT, W., SCHMID, P.P.S., CHRIST, E., 1985: Flavanole und Wundheilung nach Hagelschäden beim Baumobst. *Obst und Weinbau* 22, 249-250
- FEUCHT, W., TREUTTER, D., CHRIST, E., 1992: The precise localization of catechins and proanthocyanidins in protective layers around fungal infections. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 99, 404-413
- FEUCHT, W., TREUTTER, D., CHRIST, E., 1994: Accumulation of flavanols in yellowing beech leaves from forest decline sites. *Tree Physiology* 14, 403-412
- FEUCHT, W., TREUTTER, D., CHRIST, E., 1996: Flavanols in grapevine: *in vitro* accumulation and defense reactions in shoots. *Vitis* 35, 113-118
- FEUCHT, W., TREUTTER, D., KEUKENKAMP, I., 1998: Growth enhancement of grapevine callus by catechin on auxin-free media. *Vitis* 37, 67-71
- FILONOW, A.B., VISHNIAC, H.S., ANDERSON, J.A., JANISIEWICZ, W.J., 1996: Biological control of *Botrytis cinerea* in apple by yeasts from various habitats and their putative mechanisms of antagonism. *Biological Control* 7, 212-220
- FLEET, G.H., 2003: Yeast interactions and wine flavor. *International Journal of Food Microbiology* 86, 11-22
- FLIEGMANN, J., SCHRÖDER, G., SCHANZ, G.S., BRITSCH, L., SCHRÖDER, J., 1992: Molecular analysis of chalcone and dihydropinosylvin synthase from Scots pine (*Pinus silvestris*), and differential regulation of these and related enzyme activities in stressed plants. *Plant Molecular Biology* 18, 489-503
- FOKKEMA, N.J., LORBEER, J.W., 1974: Interactions between *Alternaria porrii* and the saprophytic mycoflora of onion leaves. *Phytopathology* 64, 1128-1133
- FOKKEMA, N.J., VAN DE LAAR, J.A.J., NELIS-BLOMBERG, A.L., SCHIPPERS, B., 1975: The buffering capacity of the natural mycoflora of rye leaves to infection by *Cochliobolus sativus*, and its susceptibility to benomyl. *Netherland Journal of Plant Pathology* 81, 176-186
- FOKKEMA, N.J., DEN HOUTER, J.G., KOSTERMANN, Y.J.C., NELIS, A.L., 1979: Manipulation of yeasts on field-grown wheat leaves and their antagonistic effect on *Cochliobolus sativus* and *Septoria nodorum*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 72, 19-29

- FRANKEL, E.N., 1995: Principal phenolics phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibition oxidation of human low-density lipoproteins. *Journal of Agriculture Food Chemistry* 43, 890-894
- FRIEDERICH, L., LAWTON, K., RUESS, W., MASNER, P., SPECKER, N., GUT RELLA, M., MEIER, B., DINCHER, S., STAUB, T., UKNES, S., MÉTRAUX, J.P., KESSMANN, H., RYALS, J., 1996: A benzothiadiazole derivate induced systemic acquired resistance in tobacco. *Plant Journal* 10, 61-70
- FUNK, C., GUGLER, K., BRODELIUS, P., 1987: Increased secondary products formation in plant cell suspension. *Phytochemistry* 26, 401-406
- GAMBORG, O.L., MILLER, R.A., OJIMA, K., 1967: Nutrient Requirement of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50, 151-158
- GOETZ, G., FKYERAT, A., METAIS, N., KUNZ, M., TABACCHI, R., PEZET, R., PONT, V., 1999: Resistance factors to gray mould in grape berries: identification of some phenolic inhibitors of *Botrytis cinerea* stilbene oxidase. *Phytochemistry* 52, 759-767
- GOLDBERG, D.M., NG, E., KARUMANCHIRI, A., YAN, J., DIAMANDIS, E.P., SOLEAS, G.J., 1995: Assay of resveratrol glucosides and isomers in wine by direct injection high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography A* 708, 89-98
- GOLUBEV, V.I., KUZNETSOVA, L.B., 1989: Formation and spectrum of action of mycocins of the basidiomycete yeast *Cryprococcus laurentii*. *Microbiology New York* 58, 794-798
- GÖRLACH, J., VOLRATH, S., KNAUFF-BETTER, G., HENGY, G., BECKHOVE, U., KOGEL, K.H., OOSTENDORF, M., STAUB, T., WARD, E., KESSMANN, H., RYALS, J., 1996: Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *Plant Cell* 8, 629-643
- GRABOWSKI, M., 1999: Research on utilization of chosen isolates of fungi in biological control of *Pezizula alba*. *Folia Horticulturae* 11, 29-35
- GRIFFIN, K.L., WINNER, W.E., STRAIN, B.R., 1996: Construction cost of loblolly and ponderosa pine leaves grown with varying carbon and nitrogen availability. *Plant, Cell and Environment* 19 729 - 738
- GROSSKOPF, D.G., FELIX, G., BOLLER, T., 1991: A yeast-derived glycopeptide elicitor and chitosan or digitonin differentially induce ethylene biosynthesis, phenylalanine ammonialyase and callose formation in suspension cultured tomato cells. *Journal of Plant Physiology* 138, 741-746
- GRUNDLACH, H., MÜLLER, M.J., KUTCHAN, T.M., ZENK, M.H., 1992: Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 2389-2393
- GUNIA, W., HINDERER, W., WITTKAMPF, U., BARZ, W., 1991: Elicitor induction of cytochrome P-450 monooxygenases in cell suspension cultures of chickpea *Cicer arietinum* L. and their involvement in pterocarpin phytoalexin biosynthesis. *Zeitschrift für Naturforschung (C)* 46, 58-66
- GUO, Z., LAMB, C., DIXON, R.A., 1997: Release and biological activity of diffusible signal compounds from elicited plant cells. *Journal of Plant Physiology* 151, 699-710
- GUO, Z., 1998: Potentiation of the oxidative burst and isoflavonoid phytoalexin accumulation by serine protease inhibitor. *Plant Physiology* 118, 1487-1494

- HAHN, M.G., BUCHELI, P., CERVONE, F., DOARES, S.H., O'NEILL, R.A., DARVILL, A., ALBERSHEIM, P., 1989: Roles of cell wall constituents in plant-pathogen interactions. In: Kosuge, T., Nester, E.W. (Eds.) *Plant-microbe interactions. Molecular and genetic perspectives* Band 3, Kap. 6 Mcgraw-Hill Publishing Company, New Yprk St. Louis San Fransisco, 131-181
- HAIN, R., 1992: Foreign phytoalexin expression in plants results in increased disease resistance. *Brighton Crop Protection Conference, Pest and Diseases 2* 757-766
- HAIN, R., REIF, H.J., KRAUSE, E., LANGEBAEDEL, R., KINDL, H., VORNAM, B., WIESE, W., SCHMELZER, E., SCHREIER, P.H., STÖCKER, R.H., STENZEL, K., 1993: Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. *Nature* 361, 153-156
- HAKULINEN, J., JULKUNEN-TIITTO, R., TAHVANAINEN, J., 1995: Does nitrogen fertilization have an impact on the trade-off between willow growth and defensive secondary metabolism? *Trees-Berlin* 9, 235-240
- HALL, R.D., YEOMAN, M.M. 1987: Intercellular and intracellular heterogeneity in secondary metabolite accumulation in cultures of *Catharanthus roseus* following cell line selection. *Journal of Experimental Botany* 38, 1391-1398
- HAMACHER, J., GIERSEPPEN, R., 1989: Histologisch-cytologische Veränderungen in Kirschrollblattvirus-infizierten und durch Luftschadstoffe geschädigten Betula-Arten. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienst* 41, 124-130
- HARBORNE, J.B., 1999: The comparative biochemistry of phytoalexin induction in plants. *Biochem. Syst. Ecol* 27, 335-367
- HASLAM, E., 1989: Plant polyphenols. *Cambride University Press, Cambridge*
- HE, D., ZHENG, X.D., YIN, Y.M., SUN, P., ZHANG, H.Y., 2003: Yeast application for controlling apple postharvest diseases associated with *Penicillium expansum*. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 44 211-216
- HIPSKIND, J.D., PAIVA, N.L., 2000: Constitutive accumulation of a resveratrol-glucoside in transgenic alfalfa increases resistance to *Phoma medicaginis*. *Molecular Plant Microbe Interact* 13, 551-562
- HIRASUNA, T.J., SHULER, M.L., LACKNEY, V.K., SPANSWICK, R.M., 1991: Enhanced anthocyanin production in grape cell cultures *Plant Science* 78, 107-120
- HISLOP, E.C., COX, T.W., 1969: Effects of captan on the nonparasitic microflora of apple leaves. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 52, 223-235
- HOLLOWCZAK, J., KUC, J., WILLIAMS, E.B., 1962: Metabolism of DL- an L-phenylalanine in *Malus* related to susceptibility and resistance to *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 52, 699-703
- HOOS, G., BLAICH, R., 1988: Metabolism of stilbene phytoalexins in grapevines: Oxidation of resveratrol in single-cell cultures. *Vitis* 27, 1-12
- HOYER, U., 2004: Untersuchungen zur Konkurrenz zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel bei Apfel (*Malus domestica*) um die Aminosäure Phenylalanin. *Diplomarbeit, Fachgebiet Obstbau, TU-München-Weihenstephan*

- HRAZDINA, G., BOREJSTA-WYSOCKI, W., LESTER, C., 1997: Phytoalexin production in an apple cultivars resistant to *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 87, 868 - 876
- HWANG, B.K., 1983: Contents of sugars, fruit acids, amino acids and phenolic compounds of apple fruits in relation to their susceptibility to *Botryosphaeria ribis*. *Phytopathologische Zeitschrift* 108, 1-11
- JACOBS, A.K., DRY, I.B., ROBINSON, S.P., 1999: Induction of different pathogenesis-related cDNAs in grapevine infected with powdery mildew and treated with etephon. *Plant Pathology* 48, 325-336
- JANISIEWICZ, W.J., TWORKOSKI, T.J., SHARER, C., 2000: Characterizing the mechanism of biological control of postharvest diseases on fruits with a simple method to study competition for nutrients. *Phytopathology* 90, 1196-1200
- JEANDET, P., BESSIS, R., GAUTHERON, B., 1991: The production of resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) by grape berries in different developmental stages. *American Journal of Enology and Viticulture* 42, 41-46
- JEANDET, P., BREUIL, A.C., ADRIAN, M., WESTON, L.A., DEBORD, S., MEUNIER, P., MAUME, G., BESSIS, R., 1997a: HPLC analysis of grapevine phytoalexins coupling photodiode array detection and fluorometry. *Anal Chem.* 69, 5172-5177
- JEANDET, P., BESSIS, R., ADRIAN, M., JOUBERT, J.M., YVIN, J.C., 1997b: Use of aluminum chloride as a resveratrol formation elicitor in plants. *French patent 95 13462*, PCT Int. Appl WO 97 18,715
- JEANDET, P., ADRIAN, M., BREUIL, A.C., SBAGHI, M., JOUBERT, J., WESTON, L.A., HARMON, R., BESSIS, R., 1998: Chemical stimulation of phytoalexin synthesis in plants as an approach to crop protection. *Recent Research Developments in Agricultural and Food Chemistry* Vol. 2 Pandalai, S.G., Ed.; Research Signpost: Trivandrom, India, 1998; pp 501-511
- JEANDET, P., ADRIAN, M., BREUIL, A.C., DEBORD, S., SBAGHI, M., JOUBERT, J., WESTON, L.A., HARMON, R., BESSIS, R., 1999: Potential use of phytoalexin induction in plants as a basis for crop protection. *Modern Fungicides and Antifungal Compounds* Vol. 2; Lyr, H., Russel, P.E., 1999; pp 349-356
- JEANDET, P., ADRIAN, M., BREUIL, A.C., SBAGHI, M., DEBORD, S., WESTON, L.A., HARMON, R., BESSIS, R., 2000: Chemical induction of phytoalexin synthesis in grapevines: Application to the control of gray mould (*Botrytis cinerea* Pers.) in the vineyard. *Acta Horticulturae* 528, 591-596
- JEANDET, P., DOUILLET-BREUIL, A.C., BESSIS, R., DEBORD, S., SBAGHI, M., ADRIAN, M., 2002: Phytoalexins from the Vitaceae: Biosynthesis, Phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 2731-2741
- KAWALLECK, P., PLESCH, G., HALBROCK, K., SOMSSICH, I.E., 1992: Induction by fungal elicitor of a adenosyl-L-methionine synthase and s adenosyl-L-homocysteine hydrolase mRNAs in cultured cells and leaves of *Petroselinum crispum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 4713-4717
- KELLER, M., HRAZDINA, G., 1998: Interaction of nitrogen availability during bloom and light intensity during veraison: Effects on anthocyanidin and phenolic development during grape ripening. *American Journal of Enology and Viticulture* 49, 341 - 349

- KELLER, M., ROGIERS, S.Y., SCHULZ, H.R., 2003: Nitrogen and ultraviolet radiation modify grapevines' susceptibility to powdery mildew. *Vitis* 42, 87-94
- KITAMURA, Y. , 1998: Induction of furanocoumarin biosynthesis in *Glehnia littoralis* cell suspension cultures by elicitor treatment. *Phytochemistry* 48, 113 - 117
- KLESSIG, D.F., MALAMY, J., 1994: The salicylic acid signal in plants. *Plant Mol. Biol.* 26, 1439-1458
- KLOPPER, J.W., TUZUN, S., LIU, L., WIE, G., 1993: Plant-growth promoting rhizobacteria as inducers of systemic resistance. In: Lumsden, R.D. und J.L. Waughn (Eds.): *est management: Biologically based technologies. ACS Conf. Proc. Series, ACS Press* 156-165
- KOBAYASHI, S., DING, C.K., NAKAMURA, Y., NAKAJIMA, I., MATSUMOTO, R., 2000: Kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) transformed with a *Vitis vinifera* stilbene synthase gene produce piceid (resveratrol-glucoside). *Plant Cell Report* 19, 904-910
- KOLB, C.A., KOPECKY, J., RIEDERER, M., PFUENDEL, E.E., 2003: UV screening by phenolics in berries of grapevine (*Vitis vinifera*). *Functional Plant Biology* 30, 1177-1186
- KORTEKAMP, A., ZYPRIAN, E., 2003: Characterization of *Plasmopara*-resistance in grapevine using *in vitro* plants. *Journal of Plant Physiology* 160, 1393-1400
- KRISA, S., LARRONDE, F., BUDZINSKI, H., DESCENDIT, A., DEFFIEUX, G., MERILLON, J.M., 1999a: Stilbene production by *Vitis vinifera* cell suspension cultures: Methyljasmonate induction and <sup>13</sup>C biolabeling. *Journal of Nat. Prod.* 62, 1688-1690
- KRISA, S., VITRAC, X., LARRONDE, F., DECENDIT, A., DEFFIEUX, G., MERILLON, J.M., 1999b: Obtaining *Vitis vinifera* cell cultures producing higher amounts of malvidin-3-O-β-Glucoside. *Biotechnology Letters* 21, 497-500
- LAMB, C.J., LAWTON, M.A., DRON, M., DIXON, R.A., 1989: Signals an transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack. *Cell* 56, 215-224
- LANDRAULT, N., LARRONDE, F., DELAUNAY, J.C., CASTAGNINO, C., VERCAUTEREN, J., MERILLON, J.M., GASC, F., CROS, G., TEISSEDRE, P.L., 2002: Levels of stilbene oligomers and astilbin in french varietal wines and in grapes during noble rot development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 2046-2052
- LANGCAKE, P., PRYCE, R.J., 1976: The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiol. Plant Pathology* 9, 77-86
- LANGCAKE, P., PRYCE, R.J.A., 1977 a: A new class of Phytoalexins from grapevines. *Experientia* 33, 151-152
- LANGCAKE, P., PRYCE, R.J., 1977 b: The production of resveratrol by grapevines in response to ultraviolet irradiation. *Phytochemistry* 16, 1193-1196
- LANGCAKE, P., PRYCE, R.J., 1977c: Oxidative demerization of 4-hydroxystilbenes *in vitro*: Production of a grapevine phytoalexin mimic. *Journal Chem.Soc.Chem.Commun.* 208-210
- LANGCAKE, P., CORNFORD, C.A., PRYCE, R.J., 1979: Identification of pterostilbene as a phytoalexin from *Vitis vinifera* leaves. *Phytochemistry* 18, 1025-1027

- LANGCAKE, P., MCCARTHY, W.V., 1979: The relationship of resveratrol production to infection of grapevine leaves by *Botrytis cinerea*. *Vitis* 18 244-253
- LANGCAKE, P., 1981: Disease resistance of *Vitis spp.* And the production of the stress metabolites resveratrol,  $\epsilon$ -viniferin,  $\alpha$ -viniferin and pterostilbene. *Physiol. Plant Pathology* 18, 213-226
- LANZ, T., SCHRÖDER, G., SCHRÖDER J., 1990: Differential regulation of genes for resveratrol synthase in cell cultures of *Arachis hypogea*. *Planta* 181, 169-175
- LARRONDE, F., KRISA, S., DECENDIT, A., CHEZE, G., DEFFIEUX, G., MERILLON, J.M., 1998: Regulation of polyphenol production in *Vitis vinifera* cell suspension cultures by sugars. *Plant Cell Report* 17, 946-950
- LARRONDE, F., GAUDILLERE, J.P., KRISA, S., DECENDIT, A., DEFFIEUX, G., MERILLON, J.M., 2003: Airborne methyljasmonate induces stilbene accumulation in leaves and berries of grapevine plants. *American Journal of Enology and Viticulture* 54, 63-66
- LAWTON, K.A., FRIEDERICH, L., HUNT, M., WEYMANN, K., DELANEY, T., KESSMANN, H., STAUB, T., RYALS, J., 1996: Benzothiadiazole induces disease resistance in *Arabidopsis* by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. *Plant Journal* 10, 71-82
- LECKBAND, G., LÖRZ, H., 1998: Transformation and expression of a stilbensynthase gene of *Vitis vinifera* L. in barley and wheat for increased fungal resistance. *Theor. Appl Genet* 96, 1001-1012
- LEIBINGER, W., BREUKER, B., HAHN, M., MENDGEN, K., 1997: Control of postharvest+L424 pathogens and colonization on the apple surface by antagonistic microorganisms in the field. *Phytopathology* 87, 1103-1110
- LEMANCEAU, P., ALABOUVETTE, C., 1993: Suppression of *Fusarium* wilts by fluorescent *Pseudomonas* mechanisms and applications. *Biocontrol Science and Technologies* 3, 219-234
- LEVINE, A., TENHAKEN, R., DIXON, R., LAMB, C., 1994: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79, 583-593
- LIMA, C., IPPOLITO, A., NIGRO, F., SALERNO, M., 1997a: Effectiveness of *Aureobasidium pullulans* and *Candida oleophila* against postharvest strawberry rots. *Postharvest Biol. Technol.* 10, 169-178
- LIMA, G., DE CURTIS, F., CASTORIA, R., DE CICCIO, V., 1997b: Integrated control of postharvest diseases of "Annurca" apples by pre-storage application of yeasts and benomyl. In: Bertolini, P., Sijmons, P.C., Guerzoni, M.E., Serra, F. (Eds.), *Non Conventional Methods for the Control of Post-harvest disease and microbiological spoilage. Workshop Proceedings COST 914-COST 915, Bologna, Italy* 121-126
- LIMA, G., DE CURTIS, F., CASTORIA, R., DE CICCIO, V., 1998: Activity of the yeasts *Cryptococcus laurentii* and *Rhodotorula glutinis* against post-harvest rots on different fruits. *Biocontrol Science and Technology* 8, 257 - 267
- LIMA DE, M.T.R., WAFFO-TEGUO, P., TEISSEDE, P.L., PUJOLAS, A., VERCAUTEREN, J., CABANIS, J.C., MERILLON, J.M., 1999a: Determination of stilbenes (trans-astringin, cis-

- and trans-piceid, and cis- and trans-resveratrol) in portuguese wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 2666-2670
- LIMA, G., ARRU, S., DE CURTIS, F., ARRAS, G., 1999b: Influence of antagonist, host fruit and pathogen on the biological control of postharvest fungal disease by yeasts. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 23, 223 - 229
- LIMA, G., ARRU, S., CURTIS DE, F., ARRAS, G. 1999c: Influence of antagonist, host fruit and pathogen on the biological control of postharvest fungal diseases by yeasts. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 23, 223-229
- LIMA, G., DE CURTIS, F., CASTORIA, R., DE CICCIO, V., 2003: Integrated control of apple postharvest pathogens and survival of biocontrol. *European Journal of Plant Pathology* 109, 341-349
- LISWIDOWATI, F., MELCHIOR, F., HOHMANN, F., SCHWER, B., KINDL, H., 1991: Induction of stilbene synthase by *Botrytis cinerea* in cultured grapevine cells. *Planta* 183, 307-314
- LOCK, J., PRICE, A.H., 1994: Evidence that disruption of cytosolic calcium is critically important in oxidative plant stress. *Proc. Roy. Soc. Edinburgh* 102, 261-264
- LUX-ENDRICH, A., TREUTTER, D., FEUCHT, W., 2000: Influence of nutrient and carbohydrate supply on the phenol composition of apple shoot cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 00 1. 7. 2000
- LYR, H., 1965: On the toxicity of oxidized polyphenols. *Phytopathology* 52, 229-249
- MACE, M.E., BELL, A.A., STIPANOVIC, R.D., 1978: Histochemistry and identification of flavanols in *Verticillium* wilt resistance and susceptible cotton. *Physiology and Plant Pathology*, 13, 143-146
- MANACHINI, P., PARINI, C., FORTINA, M.G., 1988: Pectic enzymes from *Aureobasidium pullulans* LV 10. *Enzyme and Microbial Technology* 10, 682-685
- MARBACH, I., HAREL, E., MAYER, A.M., 1984: Molecular properties of extracellular *Botrytis cinerea* laccase. *Phytochemistry* 23, 2713-2717
- MARGNA, U., 1977: Control at a level of substrate supply an alternative in the regulation of phenylpropanoid accumulation in plant cells. *Phytochemistry* 16, 419-426
- MARTINS, E.M.F., MORAES, W.B.C., 1996: Development of *Hemileia vastatrix* in coffee plants with genetic or induced resistance. *Journal of Phytopathology* 144, 519-526
- MATHIEU, Y., JOUANNEAU, J.P., THOMINE, S., LAPOUS, D., GUERN, J., 1994: Cytosolic protons as secondary messengers in elicitor-induced defense responses. *Biochemical Society Symposium* 60, 113-130
- MATTESON-HEIDENREICH, M.C., CORRAL-GARCIA, M.R., MOMOL, E.A., BURR, T.J., 1997: Russet of apple fruit caused by *Aureobasidium pullulans* and *Rhodotorula glutinis*. *Plant Disease* 81, 337-342
- MAYER, U., 1995: Einfluss des Phenolstoffwechsels beim Apfel (*Malus domestica*) auf das Resistenzpotential gegen Apfelschorf (*Verturia inaequalis*). *Dissertation, Fachgebiet Obstbau, TU München-Weihenstephan*

- MCMAHON, H., ZOECKLEIN, B.W., FUGELSANG, K., JASINSKI, Y., 1999: Quantification of glycosidase actives in selected yeasts and lactic acid bacteria. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 23, 198-203
- MELCHIOR, F., KINDL, H., 1990: Grapevine stilbene synthase cDNA only slightly differing from chalcone synthase cDNA is expressed in *Escherichia coli* into a catalytically active enzyme. *FEBS Letters* 268, 17-20
- MENKE, F.L.H., 1999a: Involvement of the octadecanoid pathway and protein phosphorylation in fungal elicitor induced expression of terpenoid indole alkaloid biosynthetic genes in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiology* 119, 1289 - 1296
- MENKE, F.L.H., 1999b: A novel jasmonat- and elicitor-responsive element in the periwinkle secondary metabolite biosynthetic gene Str interacts with a jasmonate- and elicitor-inducible AP2-domain transcription factor, ORCA2. *EMBO European Molecular Biology Organization Journal* 18, 4455 - 4463
- MERCIER, J., WILSON, C.L., 1994: Colonization of apple wounds by naturally occurring microflora and introduced *Candida oleophila* and their effect on infection by *Botrytis cinerea* during storage. *Biological control: Theory and Applications in Pest Management* 4, 138-144
- MILEK, D.M., CADEZ, N., MOZINA, S.S., RASPOR, P., 2003: Injuries of grape berries has impact on biodiversity of yeast population isolated from grape berry surfaces. *FEMS Congress of European Microbiologists Abstract Book 2003*, 203
- MORALES DEL, R., 1972: On the variability of chlorogenic acid concentration. *Oecologia-Berlin* 9, 289-300
- MORALES, M., ALCANTARA, J., BARCELO, A., 1997: Oxidation of trans-resveratrol by a hypodermal peroxidase isoenzyme from Gramy rouge grape (*Vitis vinifera*) berries. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48, 33-38
- MURASHIGE, T., SKOOG, F., 1962: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiolol. Plant* 15, 473-497
- MUSSA, A.Y., RANDHAWA H.S., KHAN Z.U., 2000: Decaying wood as a natural habitat of melanin-forming (Mel+) variant of *Cryptococcus laurentii*. *Current Science* 79, 1471-1474
- NIKFARDJAM, M.P., SCHMITT, K., RÜHL, E.H.-, PATZ, C.D., DIETRICH, H., 2000: Untersuchungen rebsortenreiner Traubensäfte auf Gehalt an Resveratrol-Derivaten. *DGQ 2000*
- NÜRNBERGER, T., NENNSTIEL, D., JABS, T., SACKS, R., HAHLBROCK, K., SCHEEL, D., 1994: High affinity of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. *Cell* 78, 449-460
- NÜRNBERGER, T., 1999: Signal perception in plant pathogen defense. *Cellular and Molecular Life Sciences* 55, 167-182
- OKU, H., 1994: In: Plant pathogenesis and disease control. *Lewis Publishers, Boca Raton Ann Arbor London Tokyo*
- ONG, B.Y., NAGEL, C.W., 1978: High-pressure liquid chromatography analysis of hydroxycinnamic acid-tartaric acid esters and their glucose esters in *Vitis vinifera*. *Journal of chromatography A* 157, 345-355



- PANAGOPOULOS, I.C., LEVISON, B.S., JOHNSTON, C.G., 2002: Identification and comparison of indigenous yeast on grapes located within the Lake Erie Appellation District by sequencing PCR amplified rDNA. *Abstract of the General Meeting of the American Society for Microbiology* 102: 317
- PAUL, B., MASIH, I., DEOPUJARI, J., CHARPENTIER, C., 1999: Occurrence of resveratrol and pterostilbene in age-old darakchasa, an ayurvedic medicine from India. *Journal of Ethnopharmacology* 68, 71-76 20 .
- PAXTON, J.D., 1991: Fungal elicitors of plant phytoalexins. In: Keeler, R.F., Tu, A.T.(Hrsg.) *Handbook of natural toxins. Toxicology of plant and fungal compounds, Band 6, Kap. 21. Marcel Dekker Inc., New York Basel Hing Kong, 439-457*
- PELTONEN, S., MANNONEN, L., KARJALAINEN, R., 1997: Elicitor-induced changes of phenylalanine ammonia-lyase activity in barley cell suspension cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 50, 185-193
- PENTA-CORTES, H., PRAT, S., SANCHEZ-SERRANO, J.J., WILLMITZER, L., 1989 : The wound-induced expression of the proteinase inhibitor II gene in potato and tomato plants is mediated by abscisic acid. NATO Int. Symposium of Signal Perception and Transduction in Higher Plants, Toulouse, 9-13
- PENA-NEIRA, A., DUENAS, M., DUARTE, A., HERNANDEZ, T., ESTRELLA, I., LOYOLA, E., 2004: Effects of ripening and of plant vegetative vigor on the phenolic composition of grapes (*Vitis vinifera*) cv. Carbernet Sauvignon in the Maipo Nalley (Chile). *Vitis* 43, 51-57
- PETEREK, S., 2004: Phenolische Inhaltstoffe der Birne und ihre Bedeutung in der Resistenz gegen Feuerbrand. *Dissertation, Fachgebiet Obstbau, TU München*
- PEZET, R., PONT, V., 1988: Mise en évidence de pterostilbene dans les grappes de *Vitis vinifera*. *Plant Physiology Biochemistry* 26, 603-607
- PEZET, R., PONT, V., CUENAT, P., 1989: Ultrastructural observations of pterostilbene fungitoxicity in dormant conidia of *Botrytis cinerea*. *Journal of Phytopathology* 129, 19-30
- PEZET, R., PONT, V., HOANG VAN, K., VERHOEFF, K., MALATHRAKIS, N.E., WILLIAMSON, B., 1992: Enzymatic detoxification of stilbenes by *Botrytis cinerea* and inhibition by grape berries proanthocyanidins. *Recent advances in Botrytis research. Proceedings of the 10th International Botrytis Symposium* 8 87-89
- PEZET, R., PONT, V., CUENAT, P., 1994: Method to determine resveratrol and pterostilbene in grape berries and wines using high-performance liquid chromatography and highly sensitive fluorimetric detection. *Journal of chromatography A* 663, 191-197
- PEZET, R., VIRET, O., PERRET, C., TABACCHI, R., 2003: Latency of *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. and biochemical studies during growth and ripening of two grape berry cultivars, respectively susceptible and resistant to gray mould. *Journal of Phytopathology* 151 208-214
- PEZET, R., PERRET, C., JEAN-DENIS, J.B., TABACCHI, R., GINDRO, K., VIRET, O., 2003: d-Viniferin, a resveratrol dihydrodimer: one of the major stilbenes synthesized by stressed grapevine leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 5488-5492
- PICINELLI, A., DAPENA, E., MANGAS, J.J., 1995: Polyphenolic pattern in apple tree leaves in relation to scab resistance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43, 2273-2278

- PISLEWSKA, M., BEDNAREK, P., STOBIECKI, M., ZIELINSKA, M., WOJTASZEK, P., 2002: Cell wall-associated isoflavonoids and  $\beta$ -glucosidase activity in *Lupinus albus* plants responding to environment stimuli. *Plant, Cell and Environment* 25:29-40
- PIZZI, A., CAMERON, F.A., 1986: Flavonoid tannins - Structural wood components for drought-resistance mechanisms of plants. *Wood Science Technology* 20, 119-124
- PREISIG, C.L., KUC, J.A., 1985: Arachidonic acid-related elicitors of the hypersensitive response in potato and enhancement of their activities by glucans from *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 236, 379-389
- PREISIG-MÜLLER, R., SCHWEKENDIEK, A., BREHM, I., REIF, H.J., KINDL, H., 1999: Characterization of a pine multigene family containing elicitor-responsive stilbene synthase genes. *Plant Molecular Biology* 39, 221-229
- PRELL, H.H., 1996: Interaktionen von Pflanzen und phytopathogenen Pilzen. Parasitierung und Resistenz, Genetik und molekulare Phytopathologie. *Gustav Fischer Verlag, Jena Stuttgart*
- PRITCHARD, S. PETERSON, C., RUNION, B., PRIOR, S., ROGERS, H., 1997: Atmospheric CO<sub>2</sub> concentration, N availability, and water status affect patterns of ergastic substance deposition in longleaf pine (*PINUS PALUSTRIS* Mill.) foliage. *Trees-Berlin* 11, 494 - 503
- PRYCE, R.J., LANGCAKE, P. 1977: a-Viniferin: an antifungal resveratrol trimer from grapevines. *Phytochemistry* 16, 1452-1454
- QIN, G.Z., TIAN S.P., 2004: Biocontrol of postharvest diseases of jujube fruit by *Cryptococcus laurentii* combined with a low dosage of fungicides under different storage conditions. *Plant Disease*
- RAA, J., 1968: Polyphenols and natural resistance of apple leaves against *Venturia inaequalis*. *Neth. J. Plant. Pathology* 74, 37-45
- RAPP, A., ZIEGLER, A., 1973: Bestimmung der Phenolcarbonsäuren (Hydroxybenzoesäuren und Hydroxyzimtsäuren) in Rebblättern, Weintrauben und Wein mittels Mikro-Polyamid-Dünnschichtchromatographie. *Vitis* 12 226-236
- RASKIN, I., 1995: Jasmonates, salicylic acid and brassinolides: Salicylic acid. In: *Davies, P.J. (Hrsg.) Plant hormones. Physiology, biochemistry and molecular biology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht Boston London* 188-205
- REGLINSKI, T., LYON, G.D., NEWTON, A.C., 1994: Induction of resistance mechanisms in barley by yeast-derived elicitors. *Annals of Applied Biology* 124, 509-517
- REGLINSKI, T., LYON, G.D., NEWTON, A.C., 1995: The control of *Botrytis cinerea* and *Rhizoctonia solani* on lettuce using elicitors extracted from yeast cell walls. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 102, 257-266
- REMOND, J.C., MAROIS, J.J., MACDONALD, J.D., 1987: Biological control of *Botrytis cinerea* on roses with epiphytic microorganisms. *Plant Disease* 71, 799-802
- RENNER, U., HELM, H.U., 2000: Untersuchungen zur Stickstoffdüngung verschiedener Apfelsorten. *Erwerbsobstbau* 42 166 - 171

- REPKA, V., FISCHEROVA, I., SILHAROVA, K. 2001: Biological activity of the elicitor released from mycelium of a grapevine isolate of the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*. *Vitis* 40, 205-212
- REVILLA, E., RYAN, J.M. 2000: Analysis of several phenolic compounds with potential antioxidant properties in grape extracts and wines by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection without sample preparation. *Journal of chromatography A* 881, 461-469
- RIDE, J.P., 1992: Recognition signals and initiation of host responses controlling basic incompatibility between fungi and plants. In: Callow, J.A. und Green, J.R. (Eds.) *Perspectives in plant cell recognition*. Cambridge University Press, Cambridge, 213-237
- RIST, D.L., ROSENBERGER, D.A., 1995: A storage decay of apple fruit caused by *Aureobasidium pullulans*. *Plant Disease* 79, 425
- ROBERTS, R.G., 1990: Postharvest Biological control of gray mold of apple by *Cryptococcus laurentii*. *Phytopathology* 80, 526-530
- RÖMMELT, S., 2001: Beteiligung phenolischer Verbindungen an der induzierten Resistenz von Apfel (*Malus domestica*) gegen Feuerbrand (*Erwinia amylovora*). *Dissertation, Fachgebiet Obstbau, TU München-Weihenstephan*
- RON, M., 2000: High-resolution linkage analysis and physical characterization of the EIX-responder locus in tomato. *Theoretical and Applied Genetics* 100, 184 - 189
- ROSS, F.A., 1961: Systemic acquired resistance induced by localized virus infection in plants. *Virology* 14, 340-358
- ROOS, W., 1998: Shifts of intracellular pH distribution as a part of the signal mechanism leading to the elicitation of benzophenanthridine alkaloids. *Plant Physiology* 118, 349 - 364
- ROVERATI, D.S., TEIXEIRA, A.R.R., MORAES, W.B.C., 1989: *Bacillus thuringiensis* - a new perspective for an induced protection to coffee leaf rust. *Journal of Phytopathology* 126, 149-159
- RÜHMANN, S., LESER, C., BANNERT, M., TREUTTER, D., 2002: Relationship between growth, secondary metabolism, and resistance of apple. *Plant Biology* 4, 137-143
- RÜHMANN, S., TREUTTER, D., 2003: Effect of N-nutrition in apple on the response of its secondary metabolism to prohexadion-Ca treatment. *European Journal of Horticultural Science* 68, 152-159
- RUPPRICH, N., HILDEBRAND, H., KINDL, K., 1980: Substrate specificity in vivo and in vitro in the formation of stilbenes. Biosynthesis of rhaponticin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 200, 72-78
- RYUGO, K., OKUSE, I., FUJI, Y., 1990: Correlation between fire blight resistance and phenolic levels in pears. *Deckerts, T. ed. 5th International Workshop on Fire Blight, 1989 June 19-22, Diepenbeek, Belgium, Acta Horticulturae* 273, 335-338
- SANDRA, R., DA SILVA, PASCHOLATI, S.F., 1990: *Saccharomyces cerevisiae* protects maize plants, under greenhouse conditions against *Colletotrichum graminicola*. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 99, 159-167

- SCALBERT, A., 1992:: Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* 30, 3875-3883
- SCHENA, L., IPPOLITO, A., ZAHAVI, T., COHEN, L., NIGRO, F., DROBY, S., 1999: Genetic diversity and biocontrol activity of *Aureobasidium pullulans* isolates against postharvest rots. *Postharvest Biology and Technology* 17, 189-199
- SCHENA, L., SIALER, M.F., GALLITELLI, D., 2002: Molecular detection of strain L47 of *Aureobasidium pullulans*, a biocontrol agent of postharvest diseases. *Plant Disease* 86, 54-60
- SCHMELZER, E., JAHNEN, W., HAHLBROCK, K., 1988: In situ localization of light induced chalcone synthase mRNA, chalcone synthase, and flavonoid end products in epidermal cells of parsley. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 2989-2993
- SCHMIDT, A., 1999: Hydroxyzimtsäureamide in Zellkulturen von Kartoffel: Isolierung und Charakterisierung eines ThT cDNA-Klons aus *Solanum tuberosum*. *Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät der Martin -Luther-Universität Halle-Wittenberg*
- SCHOLZ, K.P., HELM, H.U., 2000: Die Stickstoffernährung beim Apfel, 1. Teil: Grundlagen der N-Versorgung. *Erwerbsobstbau* 42 192 - 200
- SCHÖPPNER, A., KINDL, H., 1984: Purification of a stilbene synthase from induced cell suspension of peanut. *Journal of Biological Chemistry* 259, 6806-6811
- SCHRÖDER, G., BROWN, J.W.S., SCHRÖDER, J., 1988: Molecular analysis of resveratrol synthase cDNA: Genomic clones and relationship with chalcon synthase. *European Journal of Biochemistry* 197, 161-169
- SCHUBERT, R., FISCHER, R., HAIN, R., SCHREIER, P.H., BAHNWEG, G., ERNST, D., SANDERMANN, H., 1997: An ozone-responsive region of the grapevine resveratrol synthase promoter differs from the basal pathogen-responsive sequence. *Plant Molecular Biology* 34, 417-426
- SCHULZ, J.C., BALDWIN, I.T., 1982: Oak leaf quality declines in response to defoliation by gypsy moth larvae. *Science* 217, 149-151
- SCHWEIZER, P., MÉTRAUX, J.P., 1996: Pilz-, Bakterien- und Virusbefall. In: Brunolig, C., Rügsegger, A., Brändle, R. (Eds.) *Stress bei Pflanzen*, Kap. 4.5, Paul Haupt, Bern Stuttgart Wien, 325-343
- SGARBI, E., FORNASIERO, R.B., LINS, A.P., BONATTI, P.M., 2003: Phenol metabolism is different affected by ozone in two cell lines from grape (*Vitis vinifera*) leaf. *Plant Science* 165, 951-957
- SHARP, J.A., MCNEIL, M., ALBERSHEIM, P., 1984: The primary structure of one elicitor active and seven elicitor-inactive hexa( $\beta$ -D-glucopyranosyl)-D-glucitols isolated from the mycelial walls of *Phytophthora megasperma* f.sp. *Glycinea*. *Journal of Biological Chemistry* 259, 11321-11326
- SHIMOMURA, H., SASHISA, Y., ADACHI, T., 1988: Phenylpropanoid glucose esters from *Prunus buergeriana*. *Phytochemistry*, 27, 641-644
- SIEMANN, E.H., CREASY, L.L., 1992: Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 43, 49-52

- SIEROTZKI, H., GESSLER, C., 1993: Flavan-3-ol content and the resistance *Malus x domestica* to *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint.. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 42, 291-297
- SINGLETON, V.L., TIMBERLAKE, C.F., LEA, A.G.H., 1978: The phenolic cinnamates of white grapes and wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 29, 403-410
- SKINNER, 1950: *Cryptococcus laurentii* . In BARNETT, J.A., RAYNE, R.W., YARROW, D. (Eds.) : *Yeasts characteristics and identification*. CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS CAMBRIDGE NEW YORK PORT CHESTER MELBOURNE SYDNEY 1990, 223
- SPARVOLI, F., MARTIN, C., SCIENZA, A., GAVAZZIO, G., TONELLI, C., 1994: Cloning and molecular analysis of structural genes involved in flavonoid and stilbene biosynthesis in grape (*Vitis vinifera* L.). *Plant Molecular Biology* 24, 743-755
- STANGE, R.N., 1992: Resistance: the role of the hypersensitive response and phytoalexins. In: Ayres, P.G.(Eds.) *Pests and pathogens. Plant responses to foliar attack* Band 4. Bios Scientific Publishers, Oxford, 39-55
- STASWICK, P.E., 1995: Jasmonates, salicylic acid and brassinolides: Jasmonate activity in plants. In: Davies, P.J. (Eds.) *Plant hormones. Physiology, biochemistry and molecular biology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht Boston London 179-187
- STEIN, U., HOOS, G., 1984: Induktions- und Nachweismethoden für Stilbene bei Vitaceen. *Vitis* 23, 179-194
- STEIN, U., BLAICH, R., 1985: Untersuchungen über Stilbenproduktion und Botrytisanfälligkeit bei *Vitis*-Arten. *Vitis* 24 75 - 87
- SZANKOWSKI, I., BRIVIBA, K., FLESCHHUT, J., SCHÖNHERR, J., JACOBSEN, H.J., KIESECKER, H., 2003: Transformation of apple with the stilbene synthase gene from grapevine and a PGIP gene from kiwi. *Plant Cell Report* 22 141-149
- SZÖKE, L., GYÖNGYÖS, PÁL-KONZMA, 1997: Pilzresistente Rebsorten aus Ungarn. *Schweizer Zeitschrift für Obst und Weinbau* 19, 466-467
- THALER, J.S., FIDANTSEF, A.L., DUFFEY, S.S., BOSTOCK, R., 1999: Trade-offs in plant defense against pathogens and herbivores: a field demonstration of chemical elicitors of induced resistance. *Journal of Chemical Ecology* 25, 1597-1609
- TREUTTER, D. , FEUCHT, W., 1988: Accumulation of the flavonoid prunin in *Prunus avium*/P. *cerasus* grafts and is possible involvement in the process of incompatibility. *Acta Horticulture* 227, 74-78
- TREUTTER, D., 1989: Chemical reaction detection of catechins and proanthocyanidins with 4-dimethylaminocinnamaldehyde. *Journal of Chromatography A* 467, 185-193
- TREUTTER, D., FEUCHT, W., 1990: Accumulation of flavan-3-ols in fungus-infected leaves of Rosaceae. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 97, 634-641
- TREUTTER, D., 1991: Bedeutung von Catechinen und Proanthocyanidinen für Obstanbauer und Verbraucher: Eine Studie über die Analytik, das Vorkommen und die pflanzenphysiologische, phytopathologische und ernährungsphysiologische Bedeutung der kondensierten Tannine und ihrer monomeren Vorstufen. *Habilitationsschrift, TU-München-Weihenstephan*

- TREUTTER, D., SANTOS-BUELGA, C., GUTMANN, M., KOLODZIEJ, H., 1994: Identification of flavan-3-ols and procyanidins by high-performance liquid chromatography and chemical reaction detection. *Journal of Chromatography A* 667, 290-297
- VANCE, C.P., KIRK, T.K., SHERWOOD, R.T., 1980: Lignification as a mechanism of disease resistance. *Annual Reviews* 18, 259-288
- VANETTEN, H., SANDROCK, R.W., WASMANN, C.C., SOBY, S.D., MCKLUSKEY, K., WANG, P., 1995: Detoxification of phytoanticipins and phytoalexins by phytopathogenic fungi. *Canadian Journal of Botany* 73, 518-525
- VERCESI, A., MINERVINI, G., BISIACH, M., 1982: *Aureobasidium pullulans* on *Vitis vinifera* leaves. *Rivista di Patologia Vegetale* 18, 77-81
- VIDHYASEKARAN, P., 1997: In: Fungal pathogenesis in plants and crops. Molecular biology and host defense mechanisms. *Marcel Dekker, New York Basel Hong Kong*
- VILLEGAS, M., 2000: Effects of sodium orthovanadate on benzoephenanthridine alkaloid formation and distribution in cell suspension cultures of *Eschscholtzia californica*. *Plant Physiology and Biochemistry* 38, 233 - 241
- VITAL, M.J.S., ABRANCHES, J., HAGLER, A.N., MENDONCA-HAGLER, L.C., 2002: Mycocinogenic yeasts isolated from Amazon soils of the Maraca Ecological Station, Roraima-Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 33, 1517-8382
- VITRAC, X., LARRONDE, F., KRISA, S., DECENDIT, A., DEFFIEUX, G., MERILLON, J.M., 1999: Sugar sensing and Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin requirement in *Vitis vinifera* cells producing anthocyanins. *Phytochemistry* 53, 659-665
- VITRAC, X., CASTAGNINO, C., WAFFO-TEGUO, P., DELAUNAY, J.C., VERCAUTEREN, J., MONTI, J.P., A., DEFFIEUX, G., MERILLON, J.M., 2001a: Polyphenols newly extracted in red wine from southwestern France by centrifugal partition chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 5934-5938
- VITRAC, X., KRISA, S., DECENDIT, A., VERCAUTEREN, J., NÜHRICH, A., MONTI, J.P., DEFFIEUX, G., MERILLON, J.M., 2001b: Carbon-14 biolabelling of wine polyphenols in *Vitis vinifera* cell suspension cultures. *Journal of Biotechnology* 95, 49-56
- VITRAC, X., MONTI, J.P., VERCAUTEREN, J., DEFFIEUX, G., MERILLON, J.M., 2002: Direct liquid chromatographic analysis of resveratrol derivatives and flavanonols in wines with absorbance and fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta* 458, 103-110
- WAAGE, S.K.P.A., GRIMLEY, E., 1984: A biologically-active procyanidin from *Machaerium floribundum*. *Phytochemistry* 23, 2785-2787
- WAFFO-TEGUO, P.W., DECENDIT, A., KRISA, S., DEFFIEUX, G., VERCAUTEREN, J., MERILLON, J.M., 1996a: The accumulation of stilbene glycosides in *Vitis vinifera* cell suspension cultures. *Journal of Natural Products* 59, 1189-1191
- WAFFO-TEGUO, P., DECENDIT, A., VERCAUTEREN, J., DEFFIEUX, G., MERILLON, J.M., 1996b: Trans-Resveratrol-3-O- $\beta$ -glucoside (piceid) in cell suspension cultures of *Vitis vinifera*. *Phytochemistry* 42, 1591-1593
- WAFFO-TEGUO, P., FAUCONNEAU, B., DEFFIEUX, G., HUGUET, F., VERCAUTEREN, J., MERILLON, J.M., 1998: Isolation, identification, and antioxidant activity of three stilbene glucosides newly extracted from *Vitis vinifera* cell cultures. *Journal of Natural Products* 61, 655-657

- WAFFO-TEGUO, P., LEE, D., CUENDET, M., MERILLON, J.M., PEZZUTO, J.M., KINGHORN, A.D., 2000: Two new stilbene dimer glucosides from grape (*Vitis vinifera*) cell cultures. *Journal of Natural Products* 64, 136-138
- WARREN, J.M., ALLEN, H.L., BOOK, F.L., 1999: Mineral nutrition, resin flow and phloem phytochemistry in loblolly pine. *Tree Physiology* 19, 655 - 663
- WATERHOUSE, A.L., LAMUELA-REVENTOS, 1994: The occurrence of piceid, a stilbene glucoside, in grape berries. *Phytochemistry* 37, 571-573
- WIE, G., KLOEPPER, J.W., TUZUN, S., 1994: Induced systemic resistance to cucumber diseases and increase plant growth by plant-growth promoting rhizobacteria under field conditions. In: *Ryder, M.H., Stephens, P.M., Bowen, G.D. (Eds.): Improving plant productivity with rhizosphere bacteria, CSIRO Division of soils, Glen Osmond, Australia*, 70-71
- WIESE, W., VORNAM, B., KRAUSE, E., KINDL, H., 1994: Structural organization and differential expression of three stilbene synthase genes located on a 13 kb grapevine DNA fragment. *Plant Molecular Biology* 26, 667-677
- WILLIAMSON, M.A., FOKKEMA, N.J., 1985: Phyllosphere yeasts antagonize penetration from appressoria and subsequent infection of maize leaves by *Colletotrichum graminicola*. *Neth. Journal of Plant Pathology* 91, 265-276
- WILSON, C.L., WISNIEWSKI, M.E., 1994: Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables - theory and practice. *CRC Press, Boca Raton, FL*.
- WINK, M., LEHMANN, P., 1996: Wounding- and elicitor-induced formation of colored chalcones and flavans (as phytoalexins) in *Hippeastrum x hortorum*. *Botanica Acta* 109, 412-421
- WISNIEWSKI, M., BILES, C.L., DROBY, S., MCLAUGHLIN, R., WILSON, C.L., CHALUTZ, E., 1991: Mode of action of postharvest biocontrol yeast, *Pichia guilliermondii*. I: characterization of attachment to *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 39, 245-258
- WITT DE, P.J.G.M., SPIKEMANN, G., 1982: Evidence for the occurrence of race- and cultivar-specific elicitors of necrosis in intercellular fluids of compatible interactions between *Cladodportum fulvum* and tomato. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 21, 1-11
- WOJTASZEK, P., 1997: Differential secretion and accumulation of isoflavonoids in *Lupinus albus* in response to fungal elicitor and CuCl<sub>2</sub>. *Plant Physiology and Biochemistry* 35, 129 - 135
- YALPANI, N., SILVERMANN, P., WILSON, T.M.A., KLEIR, D.A., RASKIN, E., 1991: Salicylic acid is a systemic signal an an inducer of pathogenesis-related proteins in virus-infected tobacco. *Plant Cell* 3, 809-818
- YAMAGUCHI, T., KUROSAKI, F., SUH, D.Y., SANKAWA, U., NISHIOKA, M., SHIBUYA, M., EBIZUKA, Y. 1999: Cross-reaction of chalcone synthase and stilbene synthase overexpressed in *Escherichia coli*. *FEBS Letters* 460, 457-461
- YOSHIKAWA, M., KEEN, N.T., WANG, M.C., 1983: A receptor on soybean membranes for a fungal elicitor of phytoalexin accumulation. *Plant Physiology Biochemistry* 73, 497-506

- YUROLOVA, N.A., MOKROUSOV, I.V., DE HOOG, G.S., 1995: Intraspecific variability and exopolysaccharide production in *Aureobasidium pullulans*. *Antonie van Leeuwenhoek* 68, 57-63
- YURLOVA, N.A., DE HOOG, G.S., 1997: A new variety of *Aureobasidium pullulans* characterized by exopolysaccharide structure, nutritional physiology and molecular features. *Antonie van Leeuwenhoek* 72, 141-147
- ZHANG, J., TAKAHASHI, K., KONO, Y., SUZUKI, Y., TAKEUCHI, S., SHIMIZU, T., YAMAGUCHI, I., CHIJIMATSU, M., SAKURAI, A., SATO, Y., KITAMURA, H., 1990: Bioactive condensed tannins from bark: Chemical properties, enzyme inhibition and anti-plant-viral activities. *Journal of Pesticid Science* 15, 585-592
- ZHANG, H.Y., ZHENG, X.D., XI, Y.F., 2003: Biocontrol of postharvest blue mould rot of pear by *Cryptococcus laurentii*. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 78, 888 - 893
- ZHENG, X., ZHANG, H., XI, Y., 2004: Effects of *Cryptococcus laurentii* Skinner on biocontrol of postharvest decay of *arbutus* berries. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 45, 55-60
- ZINSER, C., JUNGBLUT, T., HELLER, W., SEIDLITZ, H.K., SCHNITZLER, J.P., ERNST, D., SANDERMANN, H., 2000: The effect of ozone in Scots pine (*Pinus silvestris* L.): Gene expression, biochemical changes and interactions with UV-B radiation. *Plant Cell Environment* 23, 975-982
- ZOUBENKO, O., UCKUN, F., HUR, Y., CHET, I., TUMER, N., 1997: Plant resistance to fungal infection induced by nontoxic pokeweed antiviral protein mutants. *Nature Biotechnology* 15: 992-996



**Lebenslauf**

- Persönliche Daten: Susanne Rühmann geb. Gundermann  
Geboren am 22.01.1968 in Löhne/Obernbeck (Westf.)  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig  
Geburt 1. Kind 09/1992  
Geburt 2. Kind 07/1998
- Schulbesuch: 1974-1978 Grundschule in Minden/Westf.  
1978-1987 Gymnasium in Minden/Westf.  
Abschluss: allgemeine Hochschulreife
- Praktika: 02/1988-05/1988 Praktikum im Zierpflanzenbau in Minden/Westf.
- Ausbildung: 08/1988-07/1990 Ausbildung als Gärtnerin im Zierpflanzenbau in  
Minden/Westf.  
Abschluss: Gesellenprüfung
- Studium: 09/1987-01/1988 Studium der Mathematik und Biologie für Lehramt  
Sekundarstufe I  
10/1990-07/1996 Studium der Gartenbauwissenschaften an der  
Technischen Universität München-Weihenstephan  
Abschluss: Dipl.-Ing. agr. Univ.
- berufliche  
Tätigkeiten: 11/1996-06/1998 wissenschaftliche Mitarbeiterin im Fachgebiet für  
Obstbau der TU-München-Weihenstephan  
06/1998-05/1999 Mutterschaftsurlaub  
seit 05/1999 wissenschaftliche Mitarbeiterin im Fachgebiet für  
Obstbau der TU-München-Weihenstephan