

Forschungsprojekt Nr. 1296

GZ 21.210/53-II/1/03

**Molekulare und biochemische Untersuchungen der
Resistenzmechanismen von Apfel gegen Feuerbrand
(*Erwinia amylovora*)**

1. 8. 2003 - 31. 7 .2006

Endbericht

Zusammenfassung

Neben den Catechinen und Proanthocyanidinen werden die Dihydrochalcone Phloretin und Phloridzin beim Apfel in Zusammenhang mit Krankheitsresistenzen in der Literatur diskutiert. Zur Klärung der Biosynthese dieser Substanzen wurden cDNAs kloniert, heterolog exprimiert und in Enzymtests auf ihre Aktivität geprüft. Es konnte gezeigt werden, dass die Chalconsynthase (CHS) des Apfels neben der Biosynthese der Flavonoide auch die Bildung des Dihydrochalcon Phloretin katalysiert. Weiters wurde unter anderem die Dihydrochalcon 2'-O-Glucosyltransferase kloniert, die Phloretin zum Phloretin 2'-O-Glucosid (Phloridzin) umwandelt.

In enzymatischen Untersuchungen wurde die konstitutive Aktivität von Phenylpropanoidstoffwechsel-Enzymen in verschiedenen Apfelsorten bzw. Naturformen untersucht und mit der Feuerbrandresistenz korreliert. Dabei konnten auffällige Unterschiede bei der Flavonolsynthase (FLS), der Flavonoid 3-O-Glucosyltransferase (F3GT) und der Dihydrochalcon 2'-O-Glucosyltransferase (DHC2'GT) festgestellt werden, die schlüssige Hinweise auf Resistenzmechanismen geben.

In drei Infektionsversuchen *in vitro* und im Glashaus (2005 und 2006) in den Quarantänekabinen der AGES wurde die Enzymaktivität ausgewählter Kandidatengene im zeitlichen Verlauf nach der Infektion mit dem Phytobakterium *Erwinia amylovora* untersucht. Auch hier konnten Unterschiede zwischen den einzelnen Sorten im zeitlichen Verlauf festgestellt werden, wobei wiederum die FLS, F3GT, DHC2'GT und auch die Peroxidase besonders auffällig waren.

Differentiell exprimierte Gene der Feuerbrand-resistenten Wildapfelsorte (*Malus robusta*) und der anfälligen Kulturapfelsorte Idared wurden aus vier cDNA-SSH Bibliotheken isoliert. Durch Screening von Microarrays wurden aus den 4.000 isolierten Klonen zehn Genfragmente identifiziert, die sich signifikant in ihrer Expression unterscheiden. Die Genfragmente zeigten eine hohe Homologie zu Genen aus dem Bereich von Trockenstress, Stoffwechselphysiologie (Hormonhaushalt), Proteinaseinhibitoren, aber auch nicht zuordenbaren Genen.

Expressionslevel-Analysen ausgewählter Kandidatengene wie auch vom PR-1 (Pathogen Related) mittels real time-PCR zeigten, dass die Genexpression in *M. robusta* in allen Versuchsvarianten nach *Erwinia*-Inokulation relativ stabil und ungestört verläuft, während bei Idared im zeitlichen Verlauf starke Schwankungen beobachtet werden konnten. Dies lässt auf konstitutive Abwehrmechanismen bei *M. robusta* schließen, die keine geeigneten Bedingungen für die Vermehrung und Ausbreitung von *Erwinia* zulassen. Dies konnte durch den quantitativen Nachweis des Phytobakteriums untermauert werden, wo im Vergleich zur Sorte Idared in *M. robusta* signifikant niedrigere Bakterienkonzentrationen gemessen wurden.

Der Gehalt an Salicylsäure als endogener Faktor in Pflanzen-Pathogen-Interaktionen und als Schlüsselement der Pflanzenabwehr wurde ebenfalls untersucht: In *M. robusta* sind fünffache Salicylsäuregehalte als in Idared vorhanden. *M. robusta* reagiert außerdem wesentlich schneller auf eine *Erwinia*-Infektion als die anfällige Sorte Idared.

Auf der Suche nach QTLs, welche in Verbindung zur Feuerbrandresistenz von Apfel stehen, wurden zwei Genkarten der elterlichen Linien von Idared und *M. robusta* 5 mit SSRS, AFLPs, AFLP-RGAs und RAPDs polymorphen Markern erstellt. Die Idared Karte beinhaltet in 16 Kopplungsgruppen 152 loci auf einer Gesamtlänge von 977 cM. Die *M. robusta* 5 Karte enthält in 15 Kopplungsgruppen 158 loci auf einer Gesamtlänge von 796 cM. Eine putative Region, welche in Verbindung mit Feuerbrandresistenz steht, wurde identifiziert. Eine Genkarte mit einem Locus für Resistenz, die aus *M. robusta* 5 stammt, konnte erstellt werden. Es handelt sich dabei um ein dominantes Hauptgen, über dessen Natur aber noch nichts weiter bekannt ist. Das Resistenzgen liegt auf Chromosom 3, leider ist der Abstand zu den benachbarten molekularen Markern verhältnismäßig groß. Diese Marker können auf ihre (begrenzte) Eignung für die Selektion geprüft werden.

Abstract

Apart from catechins and proanthocyanidins, the dihydrochalcones phloretin and phloridzin (phloretin 2'-O-glucoside) are assumed to play an important role in the pathogen defence of apple. The biosynthesis of dihydrochalcones was up to now unknown. To elucidate this major pathway in apple leaves, we isolated cDNA clones which are potentially involved in the dihydrochalcone biosynthesis and investigated the recombinant enzymes obtained by heterologous expression. We were able to show that the chalcone synthase of apple, which is the key enzyme in the flavonoid biosynthesis, also catalyzes the formation of the dihydrochalcone phloretin. In addition, a dihydrochalcone 2'-O-glucosyltransferase was isolated and characterized for the first time, which catalyzes the conversion of phloretin into phloridzin.

In-depth studies on various apple cultivars and wild types were performed to elucidate the possible correlation of their fire blight resistance with the formation of constitutively expressed polyphenols. Distinct differences could be observed for flavonol synthase (FLS), flavonoid 3-O-glucosyltransferase (F3GT) and dihydrochalcone 2'-O-glucosyltransferase (DHC2'GT), which allow novel and conclusive explanations for disease resistance mechanisms.

A series of infection trials, which were performed on *in vitro* plants and greenhouse trees (2005 and 2006), investigated the gene expression and corresponding activities of selected flavonoid enzymes after infection with *Erwinia amylovora*. Again, distinct differences between susceptible and resistant plants were observed after infection, which were particularly striking for FLS, F3GT, DHC2'GT and – interestingly - also for peroxidase.

Differentially expressed genes of the fire blight resistant wild type *Malus robusta* and the susceptible apple cultivar Idared were isolated from four cDNA SSH-libraries. Screening of microarrays, which were developed during the project, identified ten particular gene fragments from a pool of 4000 isolated clones, which showed a significantly different gene expression. Some of the gene fragments showed high homology to genes involved in the reaction to drought stress or proteinase activity or

which are responsible for hormonal balance. However, the nature of a few others remains unclear.

The analysis of the expression of selected candidate genes including PR1 by real time PCR showed that the gene expression of *M. robusta* remains quite stable and unchanged after infection with *Erwinia amylovora*, while the susceptible Idared shows distinct fluctuations. This indicates a constitutively present defence mechanism, which impedes the reproduction and diffusion of *Erwinia* in the plant. This assumption could be confirmed by the quantitative determination of the pathogen in the plant tissue, which showed significantly lower bacteria concentrations in *Malus robusta* compared to *Malus domestica* cv. Idared.

Furthermore, the concentration of salicylic acid in apple tissues was investigated, since salicylic acid plays an important part as endogenous factor in the plant-pathogen interaction and as a key element in plant defence. *M. robusta* showed five times higher concentrations of salicylic acid than *Malus domestica* cv Idared. In addition, the resistant *M. robusta* was able to react more rapidly to an *Erwinia* infection than the susceptible Idared.

To identify QTLs for fire blight resistance in apple, we designed two genetic maps of the parental lines Idared (susceptible) and *Malus robusta* 5 (resistant) using AFLPs, SSR, RAPDS and AFLP-RGAs polymorphic markers. The Idared map contains 152 loci at a total length of 977 cM organised in 16 linkage groups, and the *Malus robusta* map 158 loci at a total length of 796 cM divided in 15 linkage groups. We have detected a chromosomal region that is harbouring a locus for fire blight resistance. However, its nature is still unknown. Unfortunately, all possible known molecular markers are not located in close neighbourhood. These markers will be evaluated for their suitability for selection.

Inhaltsverzeichnis

1	CHEMISCHE UND ENZYMATISCHE UNTERSUCHUNGEN	1
1.1	BIOSYNTHESE DER DIHYDROCHALCONE	1
1.1.1	CHALCONSYNTHASE	2
1.1.2	BIOSYNTHESE VON PHLORIDZIN	6
1.1.2.1	Möglicher Zusammenhang zwischen der Dihydrochalcon 2'-O-Glykosyltransferase-Aktivität und der Krankheitsresistenz	20
1.1.2.2	Transgene Apfelpflanzen	22
1.1.3	BIOSYNTHESE VON P-DIHYDROCUMAROYL-CoA AUS P-CUMAROYL-CoA	25
1.1.3.1	Mögliche Beteiligung der Acyl-CoA-Oxidase an der Bildung von p-Dihydrocumaroyl-CoA	25
1.1.3.2	Untersuchungen zur Biosynthese von p-Dihydrocumaroyl-CoA aus p-Cumaroyl-CoA	27
1.1.3.3	Herstellung von C ¹⁴ -markierten CoA-Estern	30
2	INFEKTIONSVERSUCHE	32
2.1	VERSUCH 2005	32
2.1.1	MOLEKULARBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN	33
2.1.2	ENZYMATISCHE UNTERSUCHUNGEN	40
2.2	ENZYMATISCHE UNTERSUCHUNGEN VERSCHIEDENER APFELSORTEN BZW. NATURFORMEN	49
2.3	VERSUCH 2006	62
2.3.1	MOLEKULARBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN	62
2.3.2	BIOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN	73
2.4	IN VITRO - VERSUCH	80
2.4.1	MOLEKULARBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN	80
2.4.2	BIOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN	88
2.5	NACHWEIS UND QUANTIFIZIERUNG VON <i>ERWINIA AMYLOVORA</i> (EA)	91
3	DIFFERENTIELLES SCREENING	97
3.1	APFEL-CDNA-SSH-BIBLIOTHEK (MITTELS CLONTECH PCR-SELECT TM cDNA SUBTRACTION KIT, SOWIE SMART cDNA LIBRARY CONSTRUCTION KIT)	97
3.1.1	ERGEBNISSE DES 3. BERICHTSJAHRHS	100
3.2	KREUZUNG, SOWIE KARTIERUNG MIT AFLPs UND MIKROSATELLITENMARKER	106

3.3	MIKROSATELLITEN - MARKER	107
3.3.1	AUSTESTUNG DER MULTIPLEX PCR UND ZUSAMMENSTELLUNG DER MULTIPLEXGRUPPEN	109
3.3.2	MULTIPLEX - PCR VON ALLEN INDIVIDUEN UND ERSTE ERGEBNISSE	110
3.3.3	ANWENDUNG EINES SCAR (SEQUENCE CHARACTERIZED AMPLIFIED REGION) MARKERS LINKED MIT PL1	111
3.4	SALIZYLSÄURE ALS POTENTIELLER PATHOGENITÄTSFAKTOR, ANALYSE DES GEHALTS VON SALIZYLSÄURE IN <i>MALUS ROBUSTA</i> UND <i>IDARED</i>	125
4	LITERATUR	130

1 Chemische und enzymatische Untersuchungen

1.1 Biosynthese der Dihydrochalcone

Der Gehalt an Catechin und Proanthocyanidinen spielt eine große Rolle im Zusammenhang mit der Krankheitsresistenz gegenüber dem Erreger des Schorfs. Auch wird die Beteiligung der Dihydrochalcone Phloretin und Phloridzin in der Literatur in Zusammenhang mit der Schorfresistenz diskutiert, wobei sich die Arbeiten zum Teil widersprechen, sodass kein klares Bild vorliegt. Picinelli *et al.* (1995) weist darauf hin, dass das Verhältnis des Gehalts von Dihydrochalconen zum Gehalt an Flavan 3-olen (Catechin, Epicatechin und Proanthocyanidine) als Maßzahl für die Schorfresistenz herangezogen werden kann. Da die meisten Re-Sorten sowie die gegen Feuerbrand resistenten Naturformen eine Mehrfachresistenz aufweisen, stellte sich die Frage, inwieweit die Biosynthese der Dihydrochalcone das Resistenzverhalten beeinflusst. Im Gegensatz zur Biosynthese der Flavonoide ist über die Biosynthese der Dihydrochalcone nur wenig bekannt. Es war daher notwendig, im Rahmen dieses Projekts die Biosynthese dieser Substanzgruppe näher zu untersuchen.

Aufgrund der im 1. Forschungsjahr mit aus Apfelblättern gewonnenen Rohextrakten durchgeführten Untersuchungen wurde folgender Biosyntheseweg postuliert (Abbildung 1.1). Im 2. und 3. Forschungsjahr wurden diese Untersuchungen fortgesetzt. Einerseits sollte der postulierte Biosyntheseweg auf seine Richtigkeit geprüft werden, andererseits sollten die für die einzelnen Biosyntheseschritte verantwortlichen cDNAs isoliert werden, um sie für nachfolgende Expressionsstudien nutzen zu können.

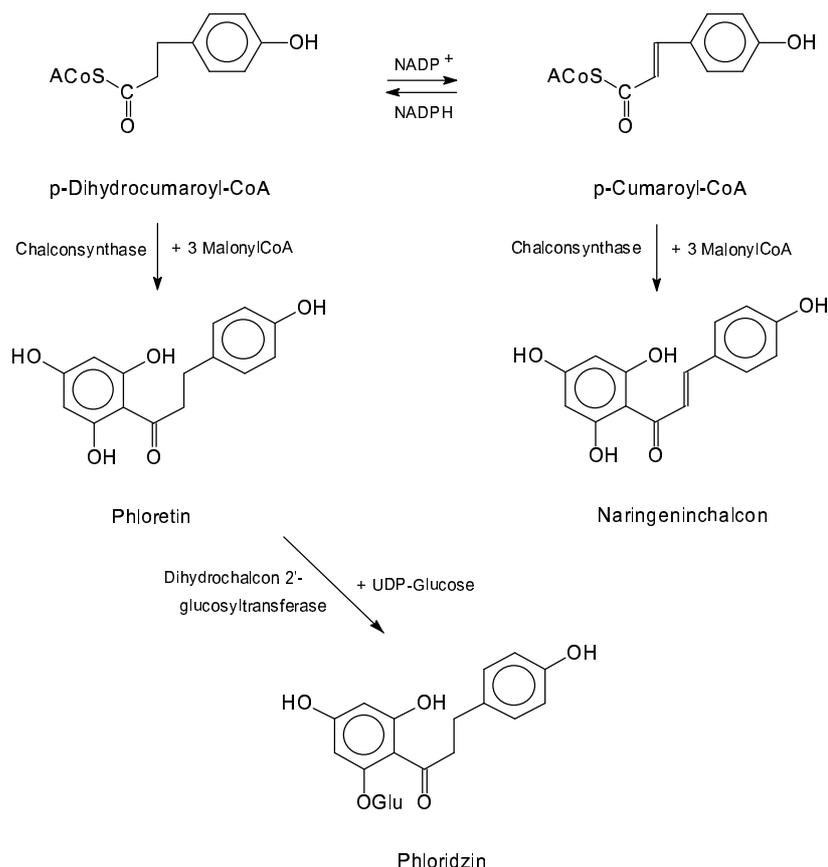


Abb. 1.1: Biosyntheseweg, der zu dem Dihydrochalcon Phloretin bzw. Naringeninichalcon führt

1.1.1 Chalconsynthase

Isolierung der CHS-cDNA

mRNA aus der Sorte 'Rewena' wurde mit dem μ MACS mRNA Isolation Kit (Miltényi Biotec) isoliert. Die anschließende Synthese der cDNA erfolgte mit der Superscript II RNase H⁻ Reverse Transcriptase (Invitrogen) und dem oligo(dT)-Ankerprimer GACCACGCGTATCGATGTCGAC(T)₁₆V. Zur Amplifikation der full-size *chs* wurden aus nicht codierenden 5'- und 3'-Bereichen einer bekannten *chs* (NCBI GenBank accession no. AB074485; C. Honda, pers. Mitt.) die Primer CHSF und CHSR abgeleitet (Tabelle 1.1). Die Primer MCHSfor und MCHSrev liegen am Beginn und am Ende des codierenden Bereichs der *chs* und dienen der Umklonierung vom Hefeexpressionsvektor pYES2.1 in den Bakterienexpressionsvektor pTrc2His.

Expressionssystem	Primer in 5'-3'-Orientierung
<i>S. cerevisiae</i> InvSc1	forward: CHSF: CGATCGGATATACAGAAAAAATG
pYES2.1-Vektor, ohne His-Tag	reverse: CHSR: CCACAAGATATACCGGTGG
<i>E. coli</i> TOP10	forward: MCHSfor: ATG GTTACAGTCGAGGAAGTTC
pTrc2His-Vektor, mit His-Tag	reverse: MCHSrev: AGCCGTTAAACCCACGCTG
<i>E. coli</i> TOP10	forward: MCHSfor: ATG GTTACAGTCGAGGAAGTTC
pTrc2His, ohne His-Tag	reverse: CHSR: CCACAAGATATACCGGTGG

Tabelle 1.1: Für die Klonierung und Expression der *chs* verwendeten Primer und Expressionssysteme. (ATG Start-Codon)

Die in der PR-PCR (Expand High Fidelity PCR System, Roche; 1,5 min. 94 °C; 30 x (0,5 min. 94 °C; 1 min. spez. annealing Temperatur; 2 min. 72 °C); 7 min. 72 °C) amplifizierte Fragmente wurden mittels TOPO-T/A-Klonierungs-Technologie in die entsprechenden Plasmide (pYES2.1/V5-His-TOPO und pTrcHis2-TOPO, Invitrogen) ligiert. Die pYES2.1-Konstrukte zur heterologen Expression der *chs*-cDNA in Hefe wurden in *E. coli* TOP10F' subkloniert (pYES2.1/V5-His-TOPO Expression Kit, Invitrogen), wobei mittels Colony-PCR entsprechende Klone selektiert wurden, welche die *chs*-cDNA in richtiger Orientierung im Plasmid enthielten. Plasmide eines positiven Klons wurden in den Hefeexpressionsstamm *S. cerevisiae* INVSc1 transformiert (S. c. EasyComp Transformation Kit, Invitrogen). Die heterologe Expression und Proteinisolierung erfolgte nach einer modifizierten Methode von Urban *et al.* (1997).

Die pTrcHis2-Konstrukte zur heterologen Expression in *E. coli* (*chs* mit/ohne His-Tag) wurden in chemisch kompetente *E. coli* TOP10 (pTrcHis2-TOPO Expression Kit, Invitrogen) transformiert. Nach der Selektion positiver Klone mit der *chs* in richtiger Orientierung im Plasmid erfolgte die heterologe Expression nach Anleitung im Manual.

Ergebnisse

Die aus jungen Apfelblättern klonierte Chalconsynthase (*Malus-chs1*) besteht aus 1176 bp (391 AS) und zeigt auf Aminosäureebene die höchste Homologie zu

bekannten CHS-Sequenzen aus *Malus*, *Rhododendron*, *Rubus* und *Fragaria*, *Rosa*, etc. (Abb. 1.2).

>Malus-chs1

ATGTTTACAGTCGAGGAAGTTTCGCAAGGCTCAACGGGCGGAGGGTCCAGCCACAGTCATGGCCATCGGGACAGCA
 ACTCCTTCCAACGTGTGGATCAGGCTACCTACCCCGACTACTACTTTTCGTATCACCAACAGCGAGCACAAAGGTT
 GAGCTCAAAGAAAAATTCCAGCGCATGTGCGACAAATCTATGATCAAGAAACGTTATATGTACTTGACTGAAGAA
 ATTTTAAAAGAGAACCCAAGTGTGTGCGAGTACATGGCTCCTTCAATTGATGCAAGGCAGGACATGGTGGTTGTG
 GAAGTCCCAAAACTTGGCAAAGAGGCTGCCACCAAAGCCATCAAGGAATGGGGACAGCCCAAGTCCAAAATCACC
 CACTTGGTCTTTTGCACCACCAGCGGTGTCGACATGCCTGGAGCCGACTACCAACTCACCAAGCTCTTGGGCCTC
 CGCCCCTCCGTCAAGCGCCTTATGATGTACCAACAAGGGTGTCTCGCCGGTGGGACGGTCTCCGTTTGGCCAAG
 GACTTGGCCGAAAACAACAAGGGTGCACGTGTTCTTGTGTGTGCTCTGAGATCACCGCGTTACCTTCCGAGGG
 CCTAGTGACACCCACCTTGATAGTCTTGTGGGCCAAGCTTTGTTTGGCGACGGTGCAGCGGCCGTCATCATTGGT
 GCGGATCCAGTGCCCGAAGTCGAGAAGCCCTTGTGTTGAATTGGTGTGCGCGGCACAAACCATTCTCCCGACAGT
 GATGGGGCTATCGACGGACATCTCCGTGAAGTAGGGCTTACATTTACCTTCTCAAGGATGTTCCCGGGCTTATT
 TCGAAGAACATCGAAAAGAGCCTTAACGAGGCCTTCAAGCCTATTGGGATTTCCGACTGGAACCTCGCTCTTCTGG
 ATTGCACACCCAGGTGGCCCTGCTATTCTGGACCAAGTAGAGGCCAAGTTAGCACTGAAGCCGGAGAAACTAGAA
 GCAACAAGGCAAGTGTGTGCGATTACGGTAACATGTGAGTGCCTGTGTGCTTTTTATTTTGGACGAGGTCAGG
 AGGAAGTCCGCCGAGAAAGGACTCAAAACGACCGGGGAGGGACTGGAGTGGGGTGTGCTTTTTCGGATTTGGGCC
 GGCCTCACGGTGGAGACCGTCGTGCTTACAGCGTGGGTTTAACGGCTTGA

MVTVEEVRKAQRAEGPATVMAIGTATPSNCVDQATYPDYYFRITNSEHKVELKEKFQRMCDKSMIKKRYMYLTEE
 ILKENPSVCEYMAPSIDARQDMVVVEVPKLGKEAATKAIKEWGPKSKI THLVFCTTSGVDMPGADYQLTKLLGL
 RPSVKRLMMYQQGCFAGGTVLRRLAKDLAENNKGARVLVVCSEITAVTFRGPSDTHLDSL VGQALFGDGAAAVIIG
 ADPVPEVEKPLFELVSAAQTILPDSGDAIDGHLREVGLTFHLLKDVPGLISKNIEKSLNEAFKPIGISDWNLSLFW
 IAHPGGPAILDQVEAKLALKPEKLEATRQVLSDYGNMSSACVLFILDEVRRKSAEKGLKTTGEGLEWGVLFVGFV
 GLTVETVVLHVSGLTA*

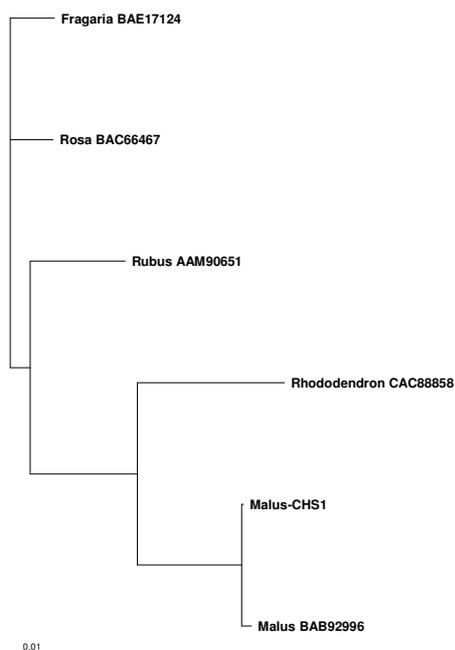
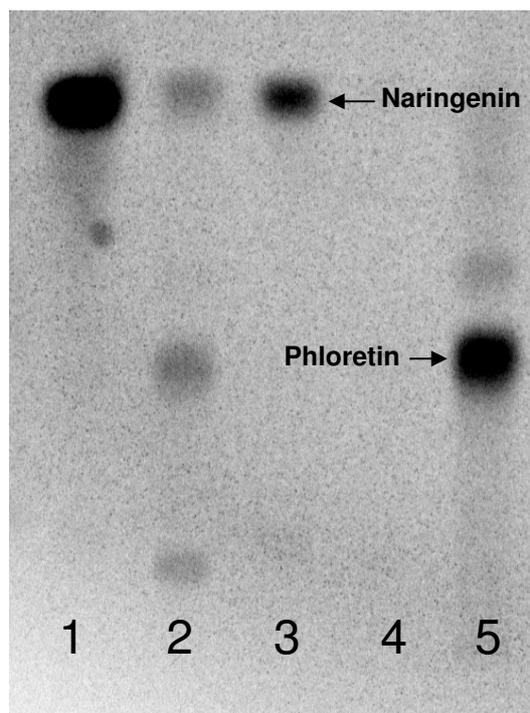


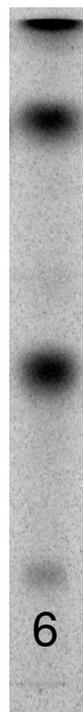
Abb. 1.2: Phylogramm verschiedener CHS-Sequenzen incl. NCBI GenBank accessions No.

Die Ergebnisse der CHS-Enzymtests mit der heterolog in Hefe und Bakterien exprimierten *chs* sind in Abbildung 1.3 dargestellt: Ein His-Tag am Ende der Aminosäuresequenz wirkt sich negativ auf die Enzymaktivität aus. p-Cumaroyl-CoA wie auch p-Dihydrocumaroyl-CoA werden von der CHS in die entsprechenden Produkte Naringenin und Phloretin umgesetzt.

A (heterologe Expression in *E. coli*)



B (heterologe Expression in *S. cerevisiae*)



- 1: ohne His-Tag, pC-CoA
- 2: ohne His-Tag, pDHC-CoA
- 3: mit His-Tag, pC-CoA
- 4: mit His-Tag, pDHC-CoA
- 5: Phloretin (Standard)
- 6: pDHC-CoA

Abb. 1.3: Dünnschichtchromatogramm der Enzymtests mit heterolog in *E. coli* exprimierter *Malus-chs* mit/ohne His-Tag (A) und heterolog in *S. cerevisiae* exprimierter *Malus-chs* (B) mit den Substraten p-Cumaroyl-CoA/p-Dihydrocumaroyl-CoA und Malonyl-CoA.

Durch diese Untersuchungen konnte erstmals eindeutig gezeigt werden, dass die Apfel-CHS nicht nur an der Biosynthese der Flavonoide, sondern auch an der Biosynthese der Dihydrochalcone beteiligt ist.

1.1.2 Biosynthese von Phloridzin

Phloridzin ist das 2'-O-Glucosid des Phloretins. Das für die Glucosylierung verantwortliche Enzym war bislang unbekannt. Bei Verwendung von Phloretin und

(C¹⁴)-UDP-Glucose konnte mit Enzympräparationen aus Apfelblättern die Bildung von (C¹⁴)-Phloridzin eindeutig nachgewiesen werden.

Dies ist in Zusammenhang mit der Krankheitsresistenz insofern von Interesse, als von anderen Forschern gezeigt werden konnte, dass es bei schorffresistenten Sorten während der Blattentwicklung zu einer Abnahme des Phloridzin-Gehalts kommt, wogegen es bei anfälligen Sorten zu einer Zunahme an Phloridzin kommt. Dies könnte mit der Enzymaktivität der Glucosyltransferase zusammenhängen. Bei einer geringeren Aktivität kommt es zu einer langsameren Umwandlung des Phloretins zu Phloridzin. Das im Cytoplasma verbleibende frei vorliegende Phloretin kann durch die Polyphenoloxidase und Peroxidase zum o-Chinon umgewandelt werden. Das gebildete o-Chinon besitzt aufgrund seiner großen chemischen Reaktionsfähigkeit bakterizide bzw. fungizide Eigenschaften.

Klonierungsstrategie

Da Glykosyltransferasen im Allgemeinen eine geringe Substrat-, jedoch eine hohe Positionsspezifität zeigen, könnten entweder die konservierten Bereiche der Chalcon 2'-O-Glykosyltransferase oder die konservierten Bereiche der Flavonoid 5-O-Glykosyltransferase (Position 5 bei den Flavonoiden entspricht der Position 2' bei Chalconen (Abb. 1.4)) für die Ableitung entsprechender Primer herangezogen werden.

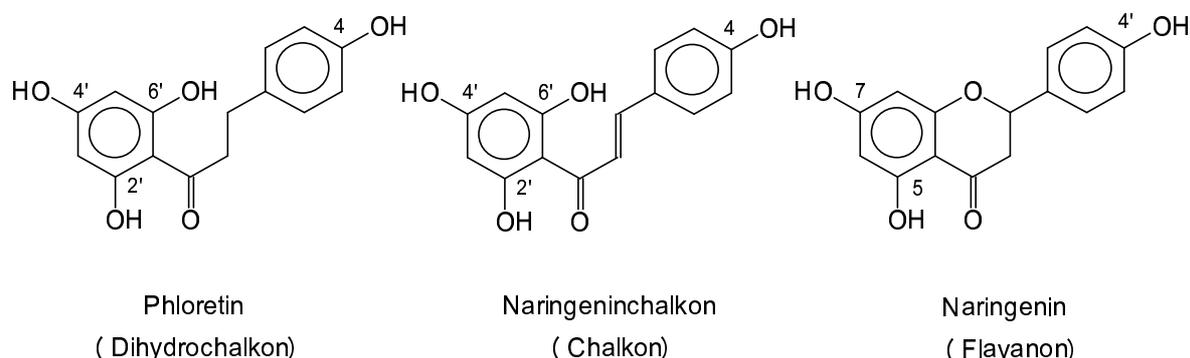


Abb. 1.4: Nomenklatur der Dihydrochalcone, Chalcone und Flavanone

Mittels RT-PCR unter Zuhilfenahme der abgeleiteten Primer wäre die Amplifizierung der Dihydrochalcon 2'-O-glucosyltransferase möglich. Eine endgültige Verifizierung

erfolgt durch heterologe Expression und Bestimmung der Substratspezifität unter Verwendung des heterologen Proteins.

Klonierungsversuch die Dihydrochalcon 2'-O-glucosyltransferase mithilfe von aus Flavonoid 5-O-glucosyltransferasen abgeleiteten Primern zu klonieren

Dabei wurde in der öffentlichen Genbank (NCBI) eine 426 bp lange Sequenz von *Malus* verwendet (GenBank accession no. AY347843), die eine hohe Homologie zu bekannten *f5gts* aufwies und von der für das 3'-RACE der Primer Mal5GT5.3 (GGTGTAGTCAAGTGGCGGTTCTC) abgeleitet wurde. Aus der Sorte 'Rewena' wurde mRNA isoliert (µMACS mRNA Isolation Kit, Miltenyi Biotec) und mit der Superscript II RNase H⁻ Reverse Transcriptase (Invitrogen) sowie dem Primer GRoligo(dT) anchor short (CGCTACGTAACGGCATGACAGTG(T)₂₀VN) in sscDNA umgeschrieben. Durch PCR (Taq DNA-Polymerase, Promega; 1,5 min. 94 °C; 40 x (0,5 min. 94 °C; 1 min. spez. annealing Temperatur; 2 min. 72 °C); 10 min. 72 °C) mit dem genspezifischen Primer Mal5GT5.3 und dem unspezifischen Anker-Primer 3RGT (ACGTAACGGCATGACAGTGTTTTTT) amplifizierte Fragmente wurden mittels TOPO-T/A-Klonierungs-Technologie in den Vektor pCR2.1 ligiert, in *E. coli* TOP10 transformiert (pCR2.1 TOPO TA Cloning and Expression Kit, Invitrogen), selektiert und sequenziert. Die Sequenzinformation wurde zum Primerdesign (M5GT3.4 TAGACACCTAGCCGCGTAGTTGCCA und M5GT3.5 GCTTAAACCCATCGTTCGTACCCATCAGAGAA) für das 5'-RACE (Clontech) genutzt. Die 5'-RACE-PCR-Produkte wurden wiederum in den Vektor pCR2.1 ligiert, in *E. coli* TOP10 transformiert, selektiert und sequenziert. Aus der Sequenzinformation vom 3'- und 5'-RACE wurde in einer PR-PCR (Expand High Fidelity PCR System, Roche; 1,5 min. 94 °C; 30 x (0,5 min. 94 °C; 1 min. spez. annealing Temperatur; 2 min. 72 °C); 7 min. 72 °C) mit den Primern M5GTfor_full2 (forward, CCATGGTGCAACACCGCTTTC) und M5GT3.1 (reverse, CCAACCGCTCATAATAGATATGTCATTC) die putative full-size *f5gt* amplifiziert und in *E. coli* TOP10F' subkloniert (pYES2.1/V5-His-TOPO Expression Kit, Invitrogen). Plasmide eines positiven Klons wurden in den Hefeexpressionsstamm *S. cerevisiae* INVSc1 transformiert (S. c. EasyComp Transformation Kit, Invitrogen). Die heterologe Expression und Proteinisolierung erfolgte nach einer modifizierten Methode von Urban *et al.* (1997).

Aufgrund der Sequenzinformation wurden Primer zur Umklonierung der Glucosyltransferase vom Hefeexpressionsvektor pYES2.1 in den Bakterienexpressionsvektor pTrc2His abgeleitet. Die Klonierung und Expression (mit/ohne His-Tag) erfolgte wie bei der *chs* beschrieben.

Ergebnisse

Die Ergebnisse der enzymatischen Untersuchungen mit *Malus*-Rohextrakt und der heterolog in Hefe exprimierten Glucosyltransferase sind in Abbildung 1.5, 1.6 und 1.7 dargestellt.

Wie man aus dem Chromatogramm (Abb. 1.5) erkennen kann, besitzt das mit dem heterologen Protein hergestellte Phloretin-Glucosid einen etwas höheren R_f -Wert als Phloridzin, und die Umsatzraten sind nur sehr gering. Wurden statt des Dihydrochalcon Phloretin hingegen die Flavonone Naringenin und Eriodictyol, die Flavone Apigenin und Luteolin bzw. die Flavonole Kämpferol und Quercetin als Substrat verwendet, konnte die Bildung der entsprechenden 7-O-Glucoside beobachtet werden (Abb. 1.6 und 1.7). Heterolog in Bakterien exprimierte Glucosyltransferase (mit/ohne His-Tag) waren nicht aktiv. Es kann daher angenommen werden, dass sich aufgrund der Positionsspezifität das Phloretin 4'-O-

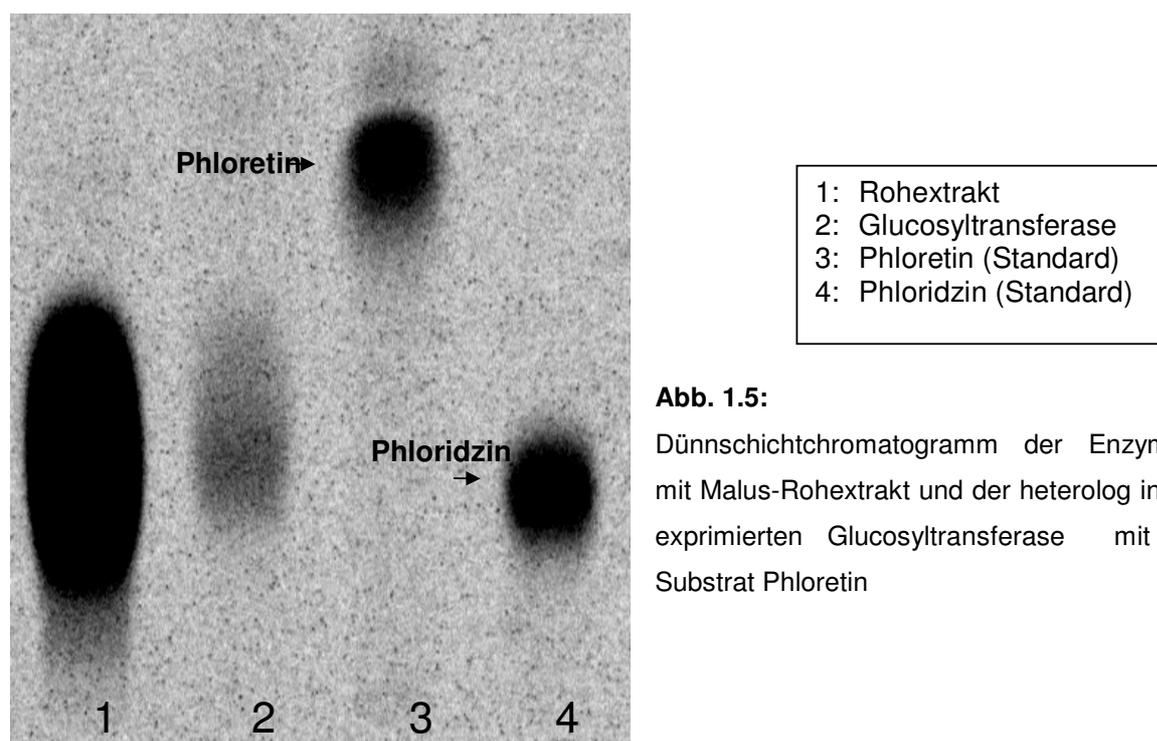


Abb. 1.5:

Dünnschichtchromatogramm der Enzymtests mit *Malus*-Rohextrakt und der heterolog in Hefe exprimierten Glucosyltransferase mit dem Substrat Phloretin

glucosid gebildet hat. Bei der isolierten Glucosyltransferase - cDNA handelt es sich daher nicht um einen cDNA-Klon der Dihydrochalcon 2'-O-glucosyltransferase, sondern um einen cDNA-Klon der Flavonoid 7-O-glucosyltransferase.

Die aus jungen Apfelblättern klonierte Flavonoid 7-O-Glykosyltransferase besteht aus 1446 bp (481 AS) und zeigt auf Aminosäureebene die höchste Homologie zu einer Monoterpen-Glykosyltransferase (EuMtGT) aus *Eucalyptus perriniana*, einer „Anthocyanin 5-O-glucosyltransferase-like protein“ (NTGT2) aus *Nicotiana tabacum*, einer „cold-induced glucosyl transferase“ (SolGT) aus *Solanum soganandinum* und einer Anthocyan 5-O-Glykosyltransferase (Pet5GT) aus *Petunia x hybrida*. Die Homologie zu F7GTs oder F3GTs sind hingegen vergleichsweise gering (Abb. 1.8)

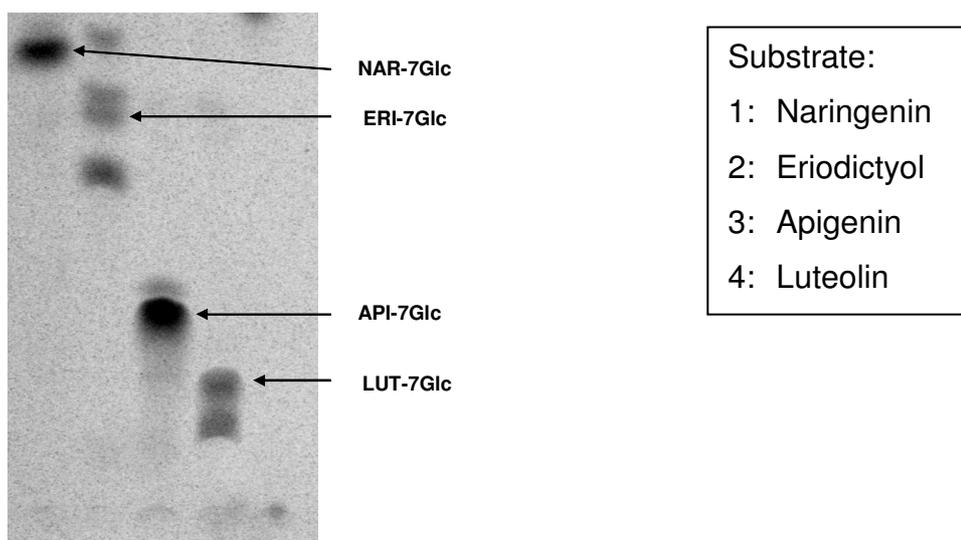


Abb. 1.6: Dünnschichtchromatogramm der Enzymtests mit der heterolog in Hefe exprimierten Glucosyltransferase mit den Substraten Naringenin, Eriodictyol, Apigenin und Luteolin

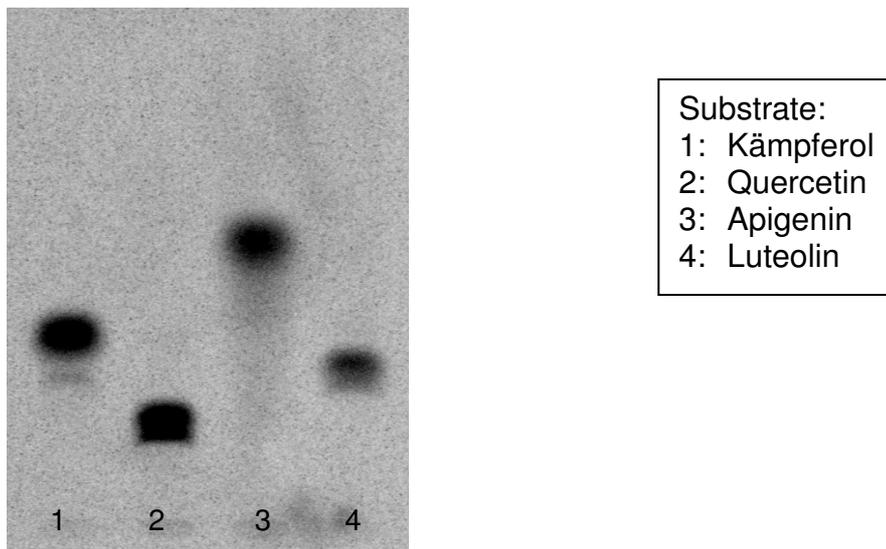


Abb. 1.7: Dünnschichtchromatogramm der Enzymtests mit der heterolog in Hefe exprimierten Glucosyltransferase mit den Substraten Kämpferol, Quercetin, Apigenin und Luteolin

>Malus-f7gt

ATG GTGCAACACCGCTTTCTACTCGTCACATTTCCAGCTCAAGGCCACATCAACCCTTCCCT
 CCAATTCGCCAAGCGCCTTATCAACACTACAGGTGCGCATGTCACCTACGTTACTAGTCTGT
 CAGCCCATCGCCGTATAGGCAATGGCTCAATTCAGATGGATTGACCTATGCGCCCTTCTCT
 GATGGGTACGACGATGGGTTTAAGCCCGGCGACAACGTCGACGACTACATGTCAGAGCTGCG
 GCGCCGCGGAGTACAAGCCATTACCGACCTTGTAGTCGCAAGTGCAAACGAGGGTCACCCTT
 ACACTTGCCTAGTCTACTCATTACTTCTCCCTTGGTCGGCAGGGATGGCACATGAACTTAC
 CTCCCAAGCGTGCTGCTTTGGATTAGCCAGCCACGGTTTTTCGACATCTACTACTATTACTT
 TAACGGGTACAAAGATCTCATCCGGGATAATACTAGTTCTGGTACGAACAATGTCCTTCCAT
 GTTCAATAGAATTACCAGTTTTGCCATTATCTTTCAAGCCGAGACCTTCCCTCCTTCATG
 GTGGATACAAATCCGTACAATTTGCCCCTCCCGTTGTTTCAAGAACAGATGGAGCTGTTGGA
 AAGAGAAACCAATCCGACCATTCTAGTCAACACGTTTCGATGCACTAGAGCCGGAAGCCTTAA
 AAGCAATTGACAAGTACAACCTTGATTGGAGTTGGGCCATTGATTCCGTCCGCTTTCTTGAC
 GGCAAGGATCCATCGGACAAGTCATTTGGAGGCGATCTTTTCCAAAATCAAAGGACTCTTC
 ATACCTCGAGTGGCTGAACTCGAAGCCAGAAGGGTCGGTGATTTATGTGTCCTTCGGAAGCA
 TTTCTGTGTTGGGAAAGGCCCAAATGGAGGAAATCGCAAAGGGTTGTTGGATTGCGGCCTT
 CCGTTCCTTGTGGTTATTAGAGATAAGGTCGGCAAGAAGGGAGACGATAACGAGGCCAAGAA
 AGAAGAAGAGATGTTGAGGTGCAGAGAGGAATTGGAAGAGCTCGGGATGATAGTGCCGTGGT
 GTAGTCAAGTGGAGGTTCTCTCTAGTCCTTCGTTGGGTTGCTTTGTGACACATTGTGGGTGG
 AATTCAAGTTTGGAGAGCTTGGTTTTAGGGGTGCCCGTGGTGGCGTTTCTCAGTGGACGGA

CCAAGGGACGAATGCCAAGTTGATAGAGGACTATTGGAAGACAGGAGTGAGGGTGACACCAA
 ATGAGGAGGGGATAGTTACGGGTGAGGAGCTCAAGAGGTGCTTGGATTTGGTATTGGGAAGT
 GGGGAGATTGGTGAAGACGTGAGAAGGAATGCTAAGAAATGGAAAGATTTGGCAAGAGAGGC
 TGTGAGTGAAGGGGACTCTTCGGACAAGAATCTCAGGGCTTTCTTGGATCAGATCAAGGTTT
 TAAAAGATGCTAGGCAC**TAG**

MVQHRFLLVTFPAQGHINPSLQFAKRLINTTGAVTYVTSLSAHRRINGNSIPDGLTYAPFS
 DGYDDGFKPGDNVDDYMSELRRRGVQAITDLVVASANEGHPYTCLVYSLLLPWSAGMAHELH
 LPSVLLWIQPATVFDIYYYYFNGYKDLIRDNTSSGTNNVLPCSI ELPGLPLSFTSRDLPSFM
 VDTNPYNFALPLFQEQMELLERETNP TILVNTFDALEPEALK AIDKYNLIGVGPLIPSAFLD
 GKDP SDKSFGGDLFQKSKDSSYLEWLNSKPEGSVIYVSFGSISVLGKAQMEEIAKGLLDCGL
 PFLWVIRDKVGKKGDDNEAKKEEMLRCREELEELGMIVPWC SQVEVLSSPSLGC FVTHCGW
 NSSLESLSVSGVPVVAFPQWTDQGTNAKLI EDYWK TGVRVTPNEEGIVTGEELKRCLDLVLGS
 GEIGEDVRRNAKKWKDLAREAVSEG DSSDKNLRAFLDQIKVLKDARH*

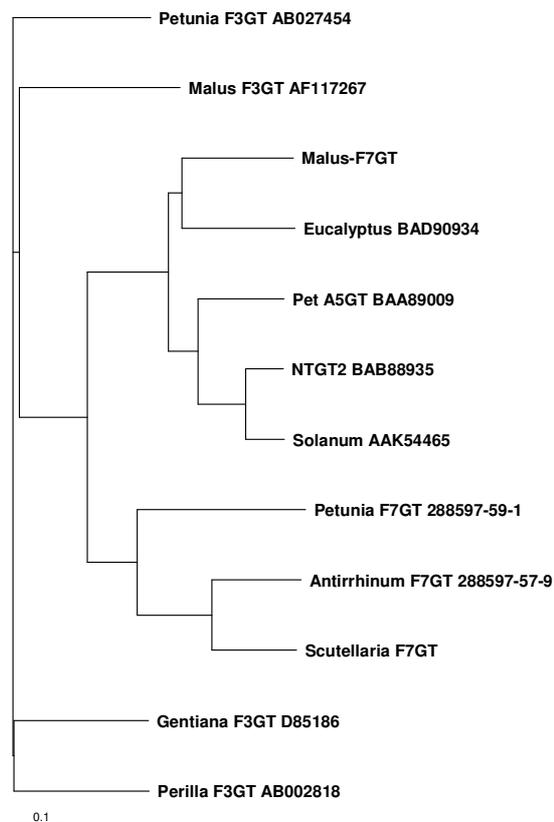


Abb. 1.8: Phylogramm verschiedener Glykosyltransferase-Sequenzen incl. NCBI GenBank accession no. oder Patentregistrierungsnummern

Klonierungsversuch die Dihydrochalcon 2'-O-glucosyltransferase mithilfe von aus Chalcon 2'-O-Glykosyltransferasen abgeleiteten Primern zu klonieren

Die EST-Datenbank der öffentlichen GenBank (NCBI) wurde nach *Malus*-Sequenzen durchsucht, die eine hohe Homologie zu bekannten Chalcon 2'-O-Glykosyltransferasen (*c2'gt*) aufweisen. Eine Auswahl von etwa 200 potentiellen Fragmenten konnte durch Verwandtschafts-Phylogramme (ClustalW, <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) auf wenige ESTs eingeschränkt werden. mRNA aus der Sorte 'Rebella' wurde mit dem µMACS mRNA Isolation Kit (Miltenyi Biotec) isoliert, die anschließende Synthese der cDNA erfolgte mit der Superscript II RNase H⁻ Reverse Transcriptase (Invitrogen) und dem oligo(dT) SMART-Primer AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T)₂₃VN.

M2'GT3/6

Aus dem *Malus* EST mit der NCBI GenBank accession no. CV881952 wurden die Primer M2GT5.1 (GTCCGTTTAATACGTAGTTCAAATTAAGC) und M2GT5.2 (GAAGAACATGACTATATTTATGTCTCTGGT) abgeleitet. M2GT5.1 führte gemeinsam mit dem Primer GTmotifRnew (GTGARTMGARTTCCANCCRCARTG; abgeleitet aus der konservierten Glykosyltransferase-Aminosäuresequenz HCGWNS) mittels PCR (1,5 min. 94 °C; 40 x (0,5 min. 94 °C; 1 min. spez. annealing Temperatur; 2 min. 72 °C); 10 min. 72 °C) zur Amplifikation von Fragmenten einer *c2'gt*. Nach Ligation in den Vektor pCR2.1, Transformation in *E. coli* TOP10 und Selektion und Sequenzierung wurden aus der Sequenzinformation die forward Primer M2GT5.3 (ATGTGCGAAGAAAGTAGAAAGCAGAAAC) und M2GT5.4 (CATGCTCCACCTTCCAATTCTTC) abgeleitet. In drei nested touch-down-PCRs konnte mit den forward Primern M2GT5.2, M2GT5.3, M2GT5.4 und dem reverse Primer SMART-NUP (AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT) ein 3'-Fragment der putativen *c2'gt* amplifiziert werden. Nach Klonierung und Sequenzierung wurde aus der Sequenzinformation im nicht codierenden 3'-Bereich der reverse Primer M2GTfullR1 (GTAGAACTAAAACATATAAATTACAAGCTG) abgeleitet. Mit den Primern M2GT5.2 und M2GTfullR1 konnte eine full-size *c2'gt* amplifiziert werden.

M2'GT4/3

Aus dem Malus EST mit der NCBI GenBank accession no. CO902984 wurde der forward Primer M2F2 (GTGTTTTGGAAGCATGGGAAGTTTC) abgeleitet und gemeinsam mit dem reverse Primer SMART-NUP für das 3'-RACE verwendet. PCR-amplifizierte Fragmente wurden in pCR2.1 ligiert, in *E. coli* TOP10 transformiert, selektiert und sequenziert. Aus der Sequenzinformation wurde für das 5'-RACE (Clontech) der PrimerM2F2_race1 (GCTCTAGCGCGCACGCTATCTCTTTTCACC) abgeleitet. 5'-RACE-Fragmente wurden aus dem Gel ausgeschnitten, eluiert, in den Vektor pCR2.1 ligiert, in *E. coli* TOP10 transformiert, selektiert und sequenziert. Zur Amplifikation der full-size *c2'gt* mittels PR-PCR wurden aus den 3'- und 5'-RACE Sequenzinformationen die Primer M2F2_fullF (CAGCTATTCATTGCCATTTCTCAAAGATG) und M2F2_fullR (CGTAAAATAAGCGAGGAGAATATAAAAGCC) abgeleitet.

Ergebnisse

M2'GT3/6

Die aus jungen Apfelblättern klonierte Dihydrochalcon 2'-O-Glykosyltransferase M2'GT3/6 besteht aus 1491 bp (496 AS) und zeigt auf Aminosäureebene die höchste Homologie zu einer Triterpen-Glykosyltransferase aus *Medicago turnculata* sowie bekannten Chalcon 2'-O-Glykosyltransferasen (Abbildung 1.9).

>Malus-dhc2'gt3/6

```
ATGTGCGAAGAAAGTAGAAAGCAGAAACCAGAAAGAGTGAAAGAACAACCGAGAAAGATGAA
GAAAGTGGAACCTCGTGTTTCATCCCATCACCAGGAGCAGGCCACCATCTACCAACGCTGCAAT
TCGTTAAGCGTTTGATCGATCGCAACGACAGAATTTGATCACCATTCTTGCCATCCAGTCA
TACTTCCCAACTACTCTAAGTTCATACACAAAATCGATTGCAGCCTCAGAACCCCGAATCCG
ATTCATTGATGTCCCACAACCTCAAGATCGACCTCCGCAAGAGATGTACAAGTCACGAGCAC
AAATCTTCTCTTTTACATTGAGAGTCACGTCCCCAGTGTCAAGAAAATCATACCAACCTC
GTCTCCTCTAGTGCTAATAGTTCAGATTCGATTCGTGTTGCTGCTTTGGTAGTTGATTTATT
CTGTGTGTCCATGATTGATGTGGCCAAAGAACTCAATATTCCTTCTTATCTTTTCCTGACAA
```

GCAATGCAGGATATCTAGCTTTCATGCTCCACCTTCCAATTCCTTCATGAAAAAACCAGATT
 GCTGTTGAAGAATCCGATCCCGATTGGTCAATCCCAGGTATTGTCCACCCGGTTCCTCCAAG
 AGTTTTGCCTGCGGCTTTGACAGATGGTAGGCTCTCCGCTTACATCAAGTTGGCTTCAAGAT
 TTAGAGAGACTAGAGGCATTATAGTAAACACATTTGTAGAGTTAGAGACACATGCTATCACA
 TTGTTTTCCAATGACGACCGAGTCCCTCCAGTGTACCCAGTCGGGCCAGTGATCGACCTGGA
 TGACGGTCAGGAACATTCCAACCTAGACCAGGCACAGCGGACAAGATCATCAAATGGCTTG
 ATGACCAGCCTCAGAAATCTGTTGTGTTTTGTGTTTTGGTAGCATGGGAAGCTTTGGGGCA
 GAGCAAGTCAAGGAAATAGCTGTAGGGCTTGAACAAAGTGGGCAGAGGTTTTTATGGTCCCT
 GCGCATGCCGTCACCCAAAGGCATAGTCCCAAGTGATTGCTCAAATCTTGAAGAAGTTTTGC
 CAGATGGGTTCTTGGAGAGGACCAATGGGAAGAAAGGGTTGATATGTGGGTGGGCCCCACAG
 GTGGAGATCCTGGCCCACAGTGCAACCGGAGGGTTCTTGTGCGCACTGCGGGTGGAACTCGAT
 ATTGGAGAGCTTGTGGCATGGCGTCCCTATTGCGACGTGGCCCATGTATGCAGAGCAGCAAC
 TCAATGCTTTTAGGATGGTGAGGGAGTTGGGGATGGCGTTGGAGATGAGGCTGGATTACAAG
 GCAGGCAGCGCTGATGTGGTGGGGGCGGACGAGATTGAGAAGGCTGTGGTTGGTGTGATGGA
 GAAGGATAGTGAGGTGAGGAAGAAGGTGGAAGAGATGGGAAAGATGGCTAGAAAAGCTGTGA
 AGGATGGAGGGTCTTCATTTGCTTCTGTTGGGAGATTTATTGAGGATGTGATTGGTCAGAAT
 TAG

MCEESRKQKPERVKEQPRKMKKVELVFIPSPGAGHHLPTLQFVKRLIDRNDRISITILAIQS
 YFPTLLSSYTKSIAASEPRIRFIDVPQPQDRPPQEMYKSRAQIFSLYIESHVPSVKKIITNL
 VSSANSSDSIRVAALVVDLFCVSMIDVAKELNIPSYLFLTSNAGYLAFMLHLPILHEKNQI
 AVEESDPDWSIPGIVHPVPPRVLPAAALTDGRLSAYIKLASRFRETRGIIIVNTFVELETHAIT
 LFSNDDRVPVYPVGPVIDLDDGQEHSLDQAQRDKIIKWLDDQPQKSUVFLCFGSMGSFGA
 EQVKEIAVGLEQSGQRFLWSLRMPSPKGIVPDCSNLEEVLPDGFLERTNGKKGLICGWAPQ
 VEILAHSATGGFLSHCGWNSILESLWHGVP IATWPMYAEQQLNAFRMVRELGMALERMALDYK
 AGSADVVGADIEKAVVGVMEKDSEVRKKVEEMGKMARKAVKDGSSSFASVGRFIEDVIGQN

*

M2'GT4/3

Die aus jungen Apfelblättern klonierte Dihydrochalcon 2'-O-Glykosyltransferase M2'GT4/3 besteht aus 1416 bp (471 AS) und zeigt auf Aminosäureebene die höchste Homologie zu bekannten Chalcon 2'-O-Glykosyltransferasen (Abb. 1.9).

>Malus-dhc2'gt4/3

ATGAAGAGACCAGCACAACTAGTGTTTCGTTCCCGCCCCAGGCATCGGCCACATCGTATCAAC
 GGTCGAGATGGCAAAGCAACTCGCTGCTCGGGACGACCAACTGTTTATCACAGTCCTCGTCA
 TGAAGCTTCCCTACGCCCAACCATTCACCAACACTGATTCTTCAATCTCTCACCGCATCAAC
 TTCGTCAACCTCCCCGAAGCCCAACCGGACAAACAAGACATTGTCCCAATCCCGGGTCTT
 CTTCAGAATGTTTCGTTCGAAAATCACAAATCTCACGTCAGAGACGCCGTTATCAACGTA
 CCGAGTCAGATCAGTCTGAGTCGACGTCGAAGCCTCGGCTTGCCGGGTTTCGTGCTCGACATG
 TTTTCCGCAAGCCTAATTGACGTGGCCAACGAATTTAAGGTTCCCTCCTACCTGTTCTTAC
 CTCCAACGCTTCGGCTCTTGCACTTATGTCCATTTTCAATCGCTTCGTGACGAGGGGGCA
 TAGATATAACTGAGTTGACGAGCTCAACCGCTGAGTTGGCCGTCCCGAGTTTCATCAACCCT
 TACCCTGCCGCAGTCTTGCCCTGGTTCGCTTCTGGACATGGAGAGCACCAAATCAACCCTCAA
 CCACGTCAGCAAGTATAAACAAACCAAGGGCATTTTGGTAAATACATTCATGGAGCTAGAAT
 CGCATGCTCTTCATTATCTTGATTCTGGTGATAAAAATCCCACCCGTGTATCCAGTGGGACCC
 TTATTGAACCTCAAAGTAGTGATGAAGATAAGGCCTCGGATATCTTGAGGTGGCTTGATGA
 TCAGCCTCCTTTCTCGGTCGTGTTTCTGTGTTTTGGAAGCATGGGAAGTTTCGGTGAGGCC
 AGGTGAAAGAGATAGCGTGCGCGCTAGAGCACAGCGGACATCGGTTTTTGTGGTCCCTTCGC
 CGGCCCCACCTCAAGGCAAGAGAGCTATGCCAAGCGACTACGAGGATCTAAAGACAGTCTT
 GCCCGAAGGGTTTCTTGATCGGACGGCTACGGTTGGGAAGGTGATTGGTTGGGCCCCGCAAG
 CGGCCATCCTAGGCCATCCGGCAACCGGAGGGTTTGTATCACATTGCGGGTGGAAATTCTACG
 TTGAAAGTTTATGGAATGGCGTGCCGATTGCCGCATGGCCATTGTACGCGGAGCAAACCT
 GAATGCCTTTCAATTGGTGGTGGAGTTGGGATTGGCAGTGGAGATTAAGATGGATTATCGGA
 GGGACAGCGACGTGGTGGTGGAGCGCAGAAGACATAGAAAGAGGGATAAGGCGAGTGATGGAG
 CTTGACAGTGATGTAAGGAAAAGAGTGAAGGAGATGAGTGAAAAGAGCAAGAAAGCCTTGGT
 GGATGGTGGTTCTTCTTACTCTTCATTAGGGCGTTTTATTGATAAAAATT TAA

MKRPAQLVFPAPGIGHIVSTVEMAKQLAARDDQLFITVLVMKLPYAQPFTNTDSSISHRIN
 FVNLPEAQPKQDIVPNPGSFFRMFVENHKSHVRDAVINVLPESDQSESTSKPRLAGFVLDM
 FSASLIDVANEFKVPSYLFFTSNASALALMSHFQSLRDEGGIDITELTSSTAELAVPSFINP
 YPAAVLPGSLDMESTKSTLNHVSKYKQTKGILVNTFMELESHALHYLDSGDKIPPVYPVGP
 LLNLKSSDEDKASDILRWLDDQPPFSVFLCFGSMGSFGEAQVKEIACALEHSGHRFLWSLR
 RPPPQGKRAMPSDYEDLKTIVLPEGFLDRTATVGKVI GWAPQAAILGHPATGGFVSHCGWNST

LES LWNGVPIAAWPLYAEQNLNAFQLVVELGLAVEIKMDYRRSDVVSVAEDIERGIRRVME
 LDSDVRKRVKEMSEKSKKALVDGGSSYSSLGRFIDKI*

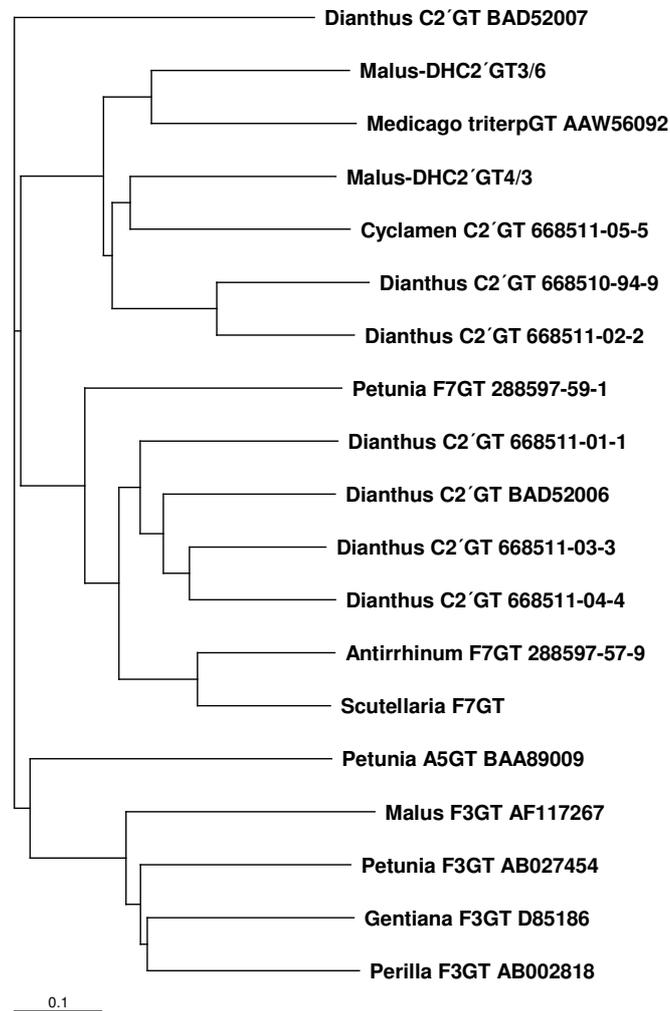
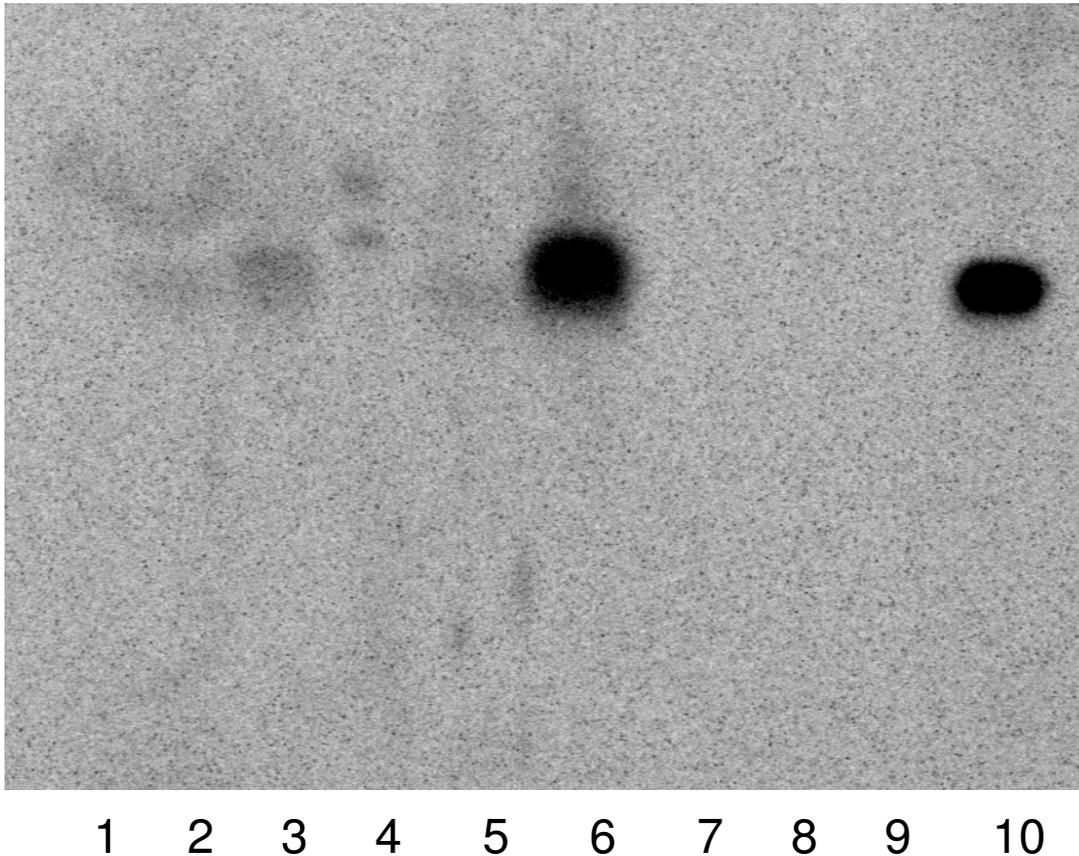


Abb. 1.9: Phylogramm von *Malus-DHC2'GT3/6* und *Malus-DHC2'GT4/3* mit verschiedenen Glykosyltransferase-Sequenzen incl. NCBI GenBank accession no. oder Patentregistrierungsnummern

Untersuchungen zur Substratspezifität

Die Ergebnisse der 2'-O-Glykosyltransferase-Enzymtests mit den heterolog in Hefe exprimierten *dhc2'gts* M2'GT3/6 und M2'GT4/3 sind in Abbildung 1.10 dargestellt: Phloretin wird von beiden Klonen als Substrat akzeptiert, die Aktivität mit den 6'-Hydroxychalconen Naringenin-chalcon bzw. Eriodictyolchalcon ist vergleichsweise

gering bzw. nicht vorhanden. Darüber hinaus ist die Glucosyltransferase in der Lage auch andere Flavonoide (Abb. 1.11) zu glucosylieren.



Substrate: NAR-Chal: Naringeninchalcon; ERI-Chal: Eiodictyolchalcon;

- | | |
|--------------------------|----------------------------|
| 1: M2'GT3/6, NAR-Chalcon | 6: M2'GT4/3, Phloretin |
| 2: M2'GT3/6, ERI-Chalcon | 7: ohne Enzym, NAR-Chalcon |
| 3: M2'GT3/6, Phloretin | 8: ohne Enzym, ERI-Chalcon |
| 4: M2'GT4/3, NAR-Chalcon | 9: ohne Enzym, Phloretin |
| 5: M2'GT4/3, ERI-Chalcon | 10: Phloridzin (Standard) |

Abb. 1.10: Dünnschichtchromatogramm der Enzymtests mit heterolog in *S. cerevisiae* exprimierten *Malus-dhc2'gts* M2'GT3/6 und M2'GT4/3 mit den Substraten Naringeninchalcon, Eriodictyolchalcon und Phloretin

Es kann aufgrund der hohen Umsatzraten und der Übereinstimmung des R_f -Werts des gebildeten Glucosids mit dem R_f -Wert von Phloridzin davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem cDNA-Klon M2'GT4/3 um einen cDNA-Klon der

Dihydrochalcon 2'-O-Glucosyltransferase handelt. Ein endgültiger Produktnachweis erfolgt durch HPLC.

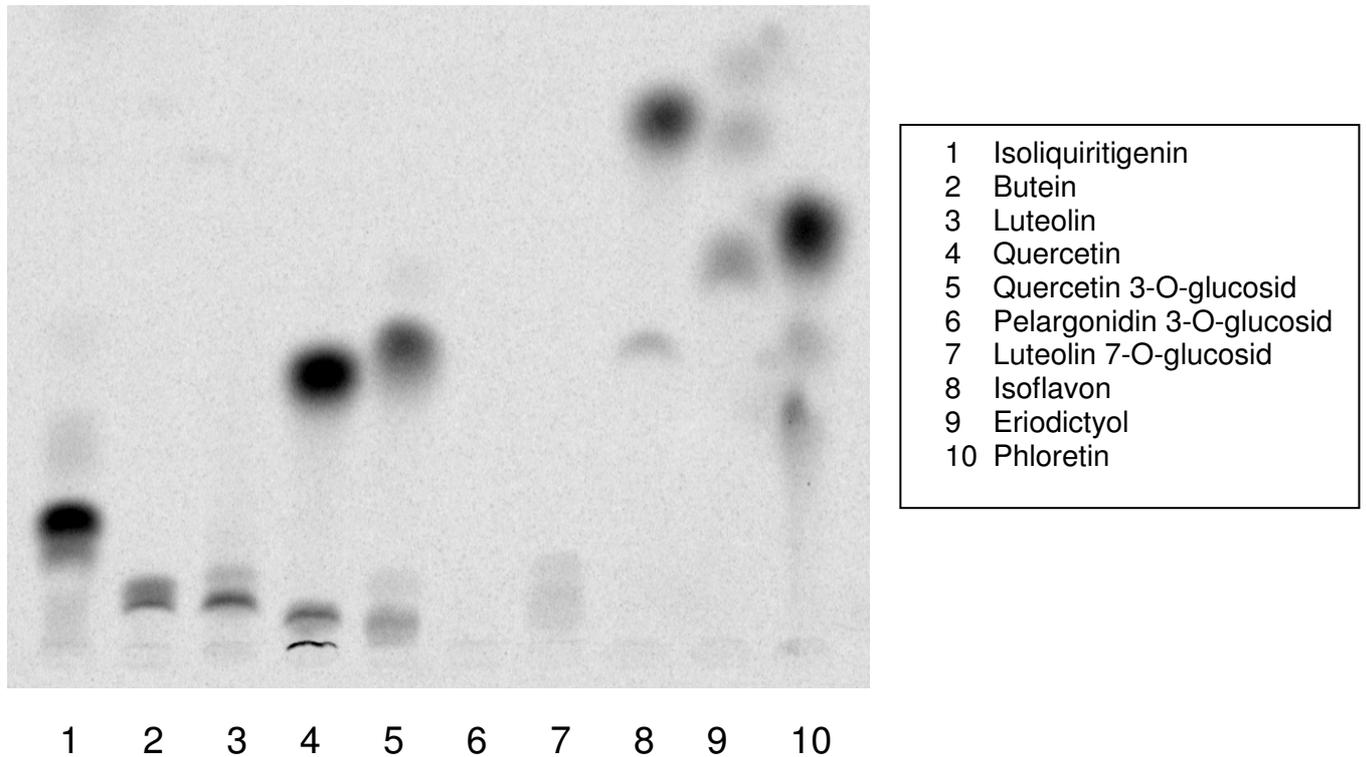


Abb. 1.11: Dünnschichtchromatogramm der Enzymtests mit heterolog in *S. cerevisiae* exprimierten *Malus-dhc2'gt* M2'GT3/6 und M2'GT4/3 mit verschiedenen Flavonoiden als Substrate

Wie man aus der Abbildung 1.10 erkennen kann, wird Phloretin von der Glucosyltransferase mit hohen Umsatzraten in Gegenwart von UDP-Glucose in Phloridzin umgewandelt. Eine eindeutige Identifikation dieses Reaktionsprodukts erfolgte nicht nur durch Cochromatographie mit der Standardsubstanz Phloridzin sondern auch durch HPLC unter Verwendung eines Radioaktivitätsdetektors kombiniert mit einem Photodiodenarray. Neben dem Hauptprodukt Phloridzin bilden sich noch zwei weitere Produkte, deren Identifikation in Zusammenarbeit mit Univ.-Prof. Dr. Schwab (TU-München) durchgeführt werden soll. Relativ gute Substrate sind neben Phloretin das 6'-Deoxychalcon Isoliquiritigenin, das Flavonol Quercetin und dessen 3-O-glucosid sowie Isoflavon (Abb. 1.11). Eine eindeutige Identifikation der gebildeten Flavonoid-Glucoside war bisher noch nicht möglich.

Obwohl die Glucosyltransferase auch andere Flavonoide glucosylieren kann, kann aufgrund der hohen Umsatzrate bei Verwendung von Phloretin als Substrat

angenommen werden, dass die Glucosyltransferase auch *in vivo* für die Phloridzin-Bildung verantwortlich ist.

1.1.2.1 Möglicher Zusammenhang zwischen der Dihydrochalcon 2'-O-Glykosyltransferase-Aktivität und der Krankheitsresistenz

Den konstitutiv und präinfektionell vorhandenen Metaboliten kommt eine wichtige Bedeutung als Postinhibitoren zu. Hierbei handelt es sich um Metabolite, die durch Hydrolyse und Oxidation aus bereits vorhandenen, nichttoxischen Substraten gebildet werden. Es wird beispielsweise beschrieben, dass Phloridzin in Apfelblättern einen Beitrag zur Resistenz gegen *Venturia inaequalis* leistet. Das Phloridzin wird in den Vakuolen der Zellen akkumuliert. Während des Wachstums des Schorfpilzes in der Wirtspflanze kommt es zu Veränderungen an den Wirtszellen, wodurch das Glykosid Phloridzin mit β -Glykosidasen und Polyphenoloxidasen bzw. Peroxidasen in Kontakt kommt. Es entsteht ein sehr instabiles, hochwirksames *o*-Chinon.

Diese *o*-Chinone können mit SH- oder NH₂-Gruppen von Enzymen des eindringenden Pathogens reagieren (1,4-Addition), was zur Schädigung oder zum Abtöten des Krankheitserregers führt (Elstner *et al.*, 1996).

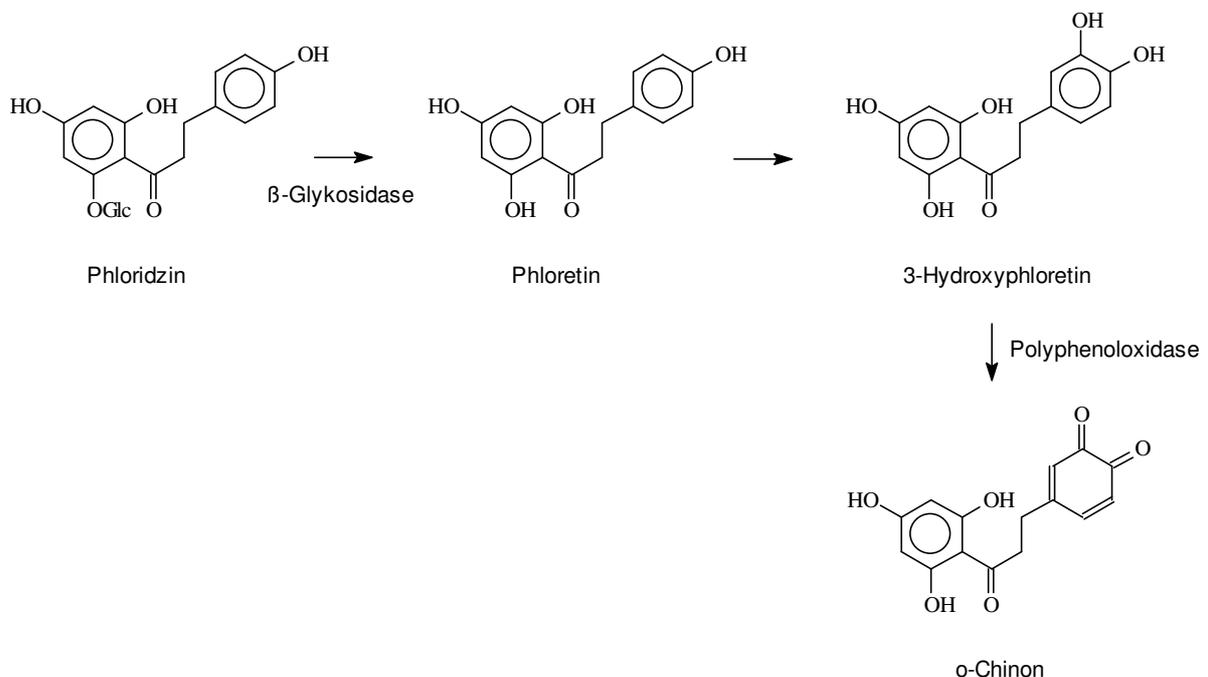


Abb. 1.12: Umwandlung von Phloridzin in *o*-Chinon (nach Elstner *et al.*, 1996)

Wie bereits im Bericht beschrieben wurde, wird das Phloridzin durch Übertragung eines Glucose-Rests von UDP-Glucose auf Phloretin gebildet. Katalysiert wird diese Reaktion von der im Zytoplasma befindlichen Dihydrochalcon 2'-O-Glykosyltransferase. Das gebildete Phloridzin wird anschließend ausgeschleust und in der Vakuole akkumuliert. Im Zytoplasma befinden sich aber auch die Peroxidase- und Polyphenoloxidase-Isoenzyme, die in Konkurrenz zur Dihydrochalcon 2'-O-Glykosyltransferase stehen und das Phloretin in die o-Chinone umwandeln.

Es kann daher folgende Arbeitstheorie postuliert werden:

Weist die Dihydrochalcon 2'-O-Glykosyltransferase eine hohe Enzymaktivität auf, so wird die Phloridzin-Bildung sehr rasch erfolgen und der Pool an freiem Phloretin ist im Zytoplasma gering. Den Peroxidase- und Polyphenoloxidase-Isoenzymen stehen daher nur sehr geringe Mengen an Phloretin zur Verfügung, und die Menge an gebildeten o-Chinonen, die zur Pathogenabwehr beitragen, ist entsprechend klein. Ist jedoch die Aktivität der Dihydrochalcon 2'-O-Glykosyltransferase gering, kann das gebildete Phloretin nur langsam ins Phloridzin umgewandelt werden, der Pool an freiem Phloretin ist entsprechend groß, und es entstehen daher größere Mengen an o-Chinon infolge der Oxidation, katalysiert von den Peroxidase- und Polyphenoloxidase-Isoenzymen. Dies müsste dazu führen, dass die Pflanzen widerstandsfähiger gegen Krankheitserreger werden. Die in Zusammenhang mit der Schorfresistenz bei Apfel durchgeführten Untersuchungen von Hrazdina (2003) decken sich mit der postulierten Arbeitstheorie. So weist die schorfresistente Sorte „Liberty“ im Vergleich zur anfälligen Sorte „McIntosh“ einen höheren Gehalt an Phloretin und einen geringeren Gehalt an Phloridzin in den Blättern auf. Darüber hinaus kommt es während des Wachstums der Blätter bei der schorfresistenten Sorte „Liberty“ zu keiner Zunahme an Phloridzin, während der Gehalt dieser Verbindung bei der anfälligen Sorte „McIntosh“ mit zunehmendem Blattalter zunimmt.

Um den Einfluss der Dihydrochalcon 2'-O-Glykosyltransferase (DHC2'GT) zu testen, sollte in der resistenten Apfelart *Malus robusta* die Dihydrochalcon 2'-O-Glykosyltransferase (dhc2'gt: Klon M2'GT4/3) überexprimiert und in der anfälligen

Apfelsorte 'Idared' durch „silencing“ abgeschaltet werden, wodurch sich das Resistenzverhalten ändern sollte.

1.1.2.2 Transgene Apfelpflanzen

Überexpressions-Experimente

Zur Überexpression wurde die *dhc2'gt* in die binären Plasmide pBI121 (Abb. 1.13) bzw. pBI121+208+ Ω kloniert. Die Überexpression im transformierten Pflanzengewebe wird durch den CaMV 35S-Promotor (cauliflower mosaic virus) gewährleistet. Das Plasmid pBI121+208+ Ω besitzt im Vergleich zum Plasmid pBI121 zusätzlich enhancer-Sequenzen für eine nochmals verstärkte Überexpression des Transgens.

Zur Klonierung wurde die Methode der „sticky-end-PCR“ verwendet. Durch diese Methode wurden DNA-Stränge mit überhängenden Enden (sticky ends) erzeugt, die komplementär zu Schnittstellen der Restriktionsenzyme (hier: Xba I und Sac I) sind. Die überhängenden Enden dienen zur Klonierung in die mit Xba I und Sac I geschnittenen pBI-Vektoren.

Dazu wurden in zwei PR-PCR-Ansätzen (Pfu-Polymerase, Promega; 1,5 min. 94 °C; 30 x (0,5 min. 94 °C; 1 min. 61 °C; 2 min. 72 °C); 7 min. 72 °C) full-size-Sequenzen der *dhc2'gt* amplifiziert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung und anschließender Elution aus dem Gel wurden beide Eluate vermischt, 5 min. bei 95 °C denaturiert und 5 min. bei Raumtemperatur wieder renaturiert. Dadurch entstanden im Gemisch statistisch zu 25 % passende full-size-Sequenzen mit überhängenden Enden.

Die Fragmente wurden wie folgt in die Xba I- und Sac I-geschnittenen Plasmide ligiert:

1. 13 μ l Plasmid
2. 4 μ l sticky end *dhc2'gt*
3. 1 μ l T4 DNA-Ligase

4. Inkubation bei 4 °C über Nacht
5. 65 °C für 10 min
6. 10 µl der Reaktion wurden für die Transformation in kompetente *E. coli* TOP10 (Invitrogen) verwendet.

Nach erfolgreicher Klonierung wurden die inserts der Plasmide sequenziert und die Identität der *dhc2'gt* bestätigt.

Primer in 5'-3'-Orientierung

PCR1	forward: 2gtVL: CTAGAATGAAGAGACCAGCACA ACTAGTG
	reverse: 2gtHL: AGCTGCC CCCCCAACCCAATTAATTTTATC
PCR2	forward: 2gtVK: AATGAAGAGACCAGCACA ACTAGTG
	reverse: 2gtHK: GCCCCCAACCCAATTAATTTTATC

Tabelle 1.2: Primerkombinationen zur Erzeugung von sticky-end-Sequenzen. Farblich markiert sind die zu den Schnittstellen der Restriktionsenzyme komplementären Sequenzabschnitte.

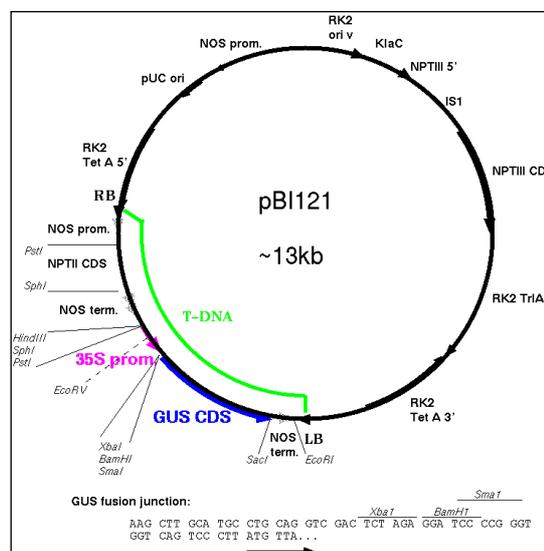


Abb 1.13: Das binäre Vektorplasmid pBI121 für Überexpressionsstudien.

(aus: http://www.umanitoba.ca/afs/plant_science/COURSES/39-768/102/pBI121.gif)

Silencing-Experimente

Für die Silencing-Experimente soll die innovative neue Methode des RNA-induzierten Gensilencings verwendet werden. Grundlage ist dabei die Interferenz von künstlich

gebildeten doppelsträngigen RNA-Fragmenten mit der mRNA aus dem Pflanzengewebe. Die Konstruktion der dafür notwendigen „hairpin-Kassette“ mithilfe des Plasmids pHANNIBAL (<http://www.pi.csiro.au>) ist in Abbildung 1.14A und 1.14B dargestellt. Die hairpin-Kassette wird anschließend wie bei den Überexpressions-Experimenten in das binäre Plasmid pBI121 inkloniert. Die Identität der *dhc2'gt* sowie die Integrität der hairpin-Kassette wird vor der Pflanzentransformation durch Sequenzierung überprüft.

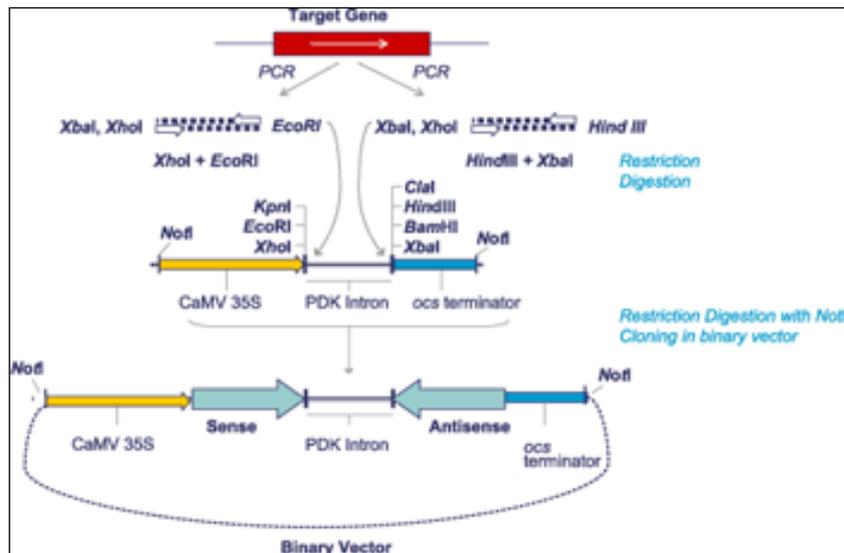


Abb. 1.14A: Überblick über die Konstruktion des Silencing-Plasmids mit einer hairpin-Kassette. (aus: <http://www.pi.csiro.au>).

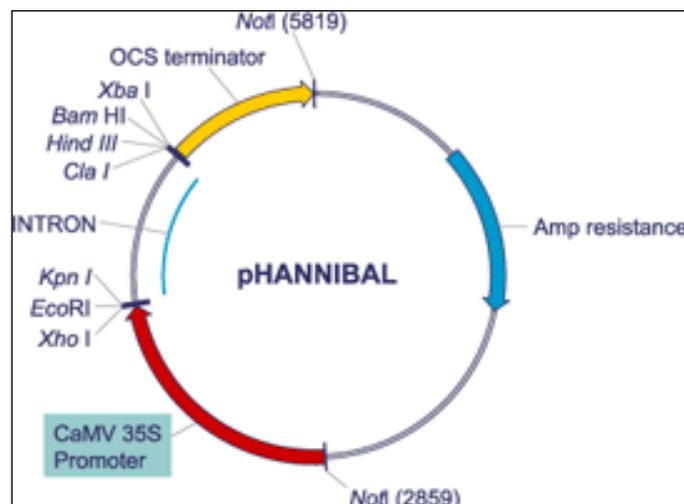


Abb. 1.14B: pHANNIBAL Plasmid für Silencing-Experimente (aus: <http://www.pi.csiro.au>)

Transformation der Apfelpflanzen

Derzeit werden die Überexpressions-Plasmide in Kooperation mit der Bundesanstalt für Züchtungsforschung (Prof. Viola Hanke, Dresden - Pillnitz) mittels *Agrobacterium tumefaciens* in die entsprechenden Apfelpflanzen übertragen. Die transgenen Pflanzen werden in weiterer Folge auf ihr Resistenzverhalten geprüft werden.

1.1.3 Biosynthese von p-Dihydrocumaroyl-CoA aus p-Cumaroyl-CoA

1.1.3.1 Mögliche Beteiligung der Acyl-CoA-Oxidase an der Bildung von p-Dihydrocumaroyl-CoA

Die Entstehung von p-Cumaroyl-CoA aus p-Dihydrocumaroyl-CoA, sowie die umgekehrte Reaktion könnte durch Enzyme des Fettsäurestoffwechsels katalysiert werden, was durch einen ähnlichen Reaktionsmechanismus erklärt werden kann. Ein vielversprechendes Kandidatengemisch ist die Mittelkettige Acyl-CoA-Oxidase. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Enzymtests mit Rohextrakten einer *Arabidopsis*-Mutante durchgeführt, die eine Mutation im *acx3*-Gen (Rylott *et al.*, 2003) aufweist. Diese Mutante akkumuliert mittelkettige Fettsäuren (Rylott *et al.*, 2003). Samen der *Arabidopsis acx3*-Mutante (zur Verfügung gestellt von Dr. Johanna Cornah, York) wurden laut Protokoll von Wilfried Rozhan, Wien zur Keimung gebracht und unter Standardbedingungen (14 h Licht, 22 °C) bis zur beginnenden Blüte herangezogen, geerntet, schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

1. Oberflächensterilisation der Samen in 1 ml Sterilisationslösung (10 mg Bayrochlor, 100 µl Wasser, 900 µl Ethanol (95 %))
2. Überstand entfernen und 3 x mit 95 %igem Ethanol waschen
3. Über Nacht trocknen.
4. Auf Agar-Närmadium aussäen (2,2 g/l MS-Pulver (Duchefa M0231.0050), 10 g/l Saccharose, 7 g/l Agar-Agar, pH mit KOH auf 5,8 einstellen, autoklavieren und in Petrischalen gießen)

Als Kontrolle wurde die *Arabidopsis*-Linie 'Lansberg Erecta' verwendet. Die Rohextrakte wurden wie bei der Präparation der Rohextrakte aus Apfelblättern nach Halbwirth *et al.* (2002) hergestellt.

Enzymtest mit den *Arabidopsis*-Rohextrakten

In Enzymtests sollte p-Dihydrocumaroyl-CoA in p-Cumaroyl-CoA umgewandelt und der enzymatische Umsatz durch die weitere Bildung von Phloretin bzw. Naringenin durch die Chalconsynthase/Chalconisomerase mit Malonyl-CoA beurteilt werden.

Der Enzymansatz enthielt in 100 µl:

- 65 µl Tris/HCl-Puffer 0,1 M + 0,4 % Ascorbat, pH 7,0
- 5 µl ¹⁴C-Malonyl-CoA
- 5 µl p-Dihydrocumaryol-CoA
- 5 µl NADP⁺ (0,83 mg/100 ml)
- 20 µl Rohextrakt

Der Ansatz wurde bei 30 °C 30 min. inkubiert, mit 10 µl Essigsäure angesäuert und mit 200 µl Ethylacetat extrahiert. Die Oberphase wurde auf eine Cellulose-DC-Platte aufgetragen und in 30 %iger Essigsäure dünnschichtchromatographisch getrennt.

Ergebnisse und Schlussfolgerungen

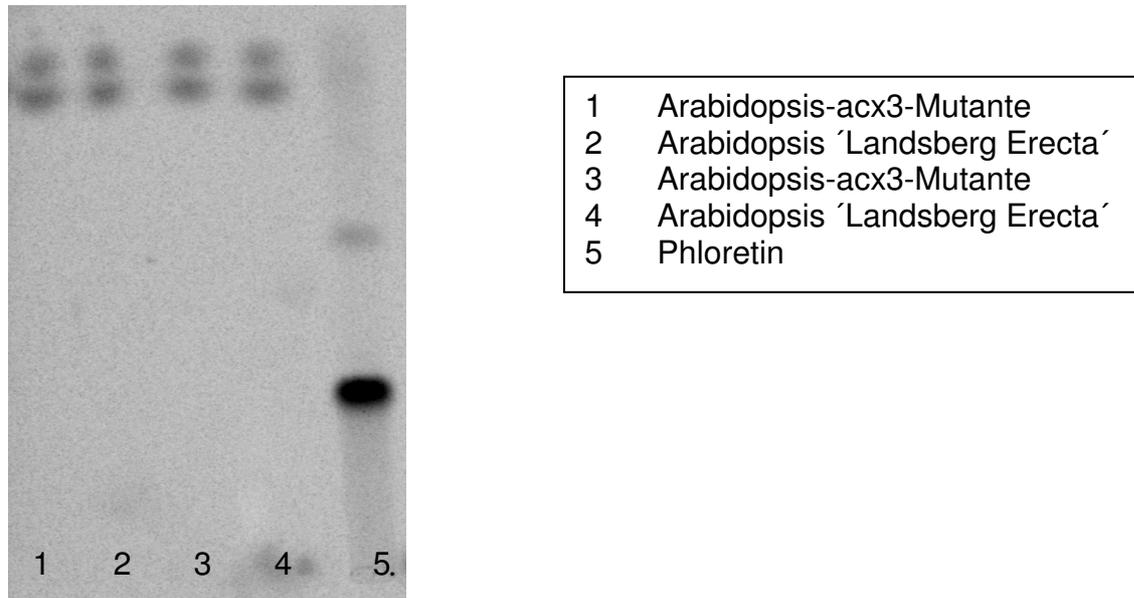


Abb. 1.15: Enzymtests mit Rohextrakten der *Arabidopsis-acx3*-Mutante

Mit Rohextrakten der *acx3*-Mutante als auch mit Proteinpräparationen des Wildtyps konnten p-Dihydrocumaroyl-CoA zu p-Cumaroyl-CoA umwandeln werden, was durch das Fehlen von Phloretin als Produkt erkennbar wurde (Phloretin sollte durch die ebenfalls im Rohextrakt vorhandene Chalconsynthase/Chalconisomerase gemeinsam mit Malonyl-CoA entstehen).

Deshalb scheint die Beteiligung der Mittelkettigen Fettsäure-Oxidase für die Biosynthese von p-Cumaroyl-CoA aus p-Dihydrocumaroyl-CoA (sowie die umgekehrte Reaktion) nicht von Bedeutung zu sein und wird deshalb im Apfel nicht weiter untersucht.

1.1.3.2 Untersuchungen zur Biosynthese von p-Dihydrocumaroyl-CoA aus p-Cumaroyl-CoA

Material und Methoden

Zur Klonierung des Gens, welches für den Reduktionsschritt von Cumaroyl-CoA zum p-Dihydrocumaroyl-CoA verantwortlich ist, wurden molekularbiologische und biochemische Methoden verwendet: Neben der klassischen Herangehensweise über

Sequenzinformationen (Nucleinsäure- und Aminosäuresequenzen) wurde eine aufwändige aber viel versprechende biochemische Alternative von Akashi *et al.* (2003) angewendet, bei der eine funktionell exprimierte cDNA-library gescreent wird. Prinzipiell wird dabei die gesamte, repräsentative cDNA-library in Fraktionen geteilt, funktionell exprimiert und mit sensitiven Enzymtests jene Fraktionen mit der gewünschten Enzymaktivität selektiert. „Aktive“ Fraktionen werden in mehreren solchen Schritten so weit verdünnt, bis letztendlich ein einziger Klon mit der gewünschten Aktivität selektiert ist. Dieser kann durch Sequenzierung weiter analysiert werden.

Für die beschriebene Methode wurde mRNA aus jungen Blättern der Apfelsorte Rebella mit dem μ MACS mRNA Isolation Kit (Miltenyi Biotec) isoliert und mit dem λ -ZAP-cDNA-Library-Kit (Stratagene) eine cDNA-library laut Protokoll des Herstellers konstruiert. Anschließend wurden pBluescript Phagemide aus den Uni-ZAP XR-Vektoren (Phagen) ausgeschnitten (*in vivo* mass excision). Damit standen *E.coli*-Klone mit Phagemiden zur Verfügung, die einen repräsentativen Querschnitt an Malus-cDNAs enthielten. Die Fraktionierung und Enzymtests wurden wie nachfolgend beschrieben durchgeführt.

In dieser Arbeit wurde diese Methode zunächst mit der Flavanon 3-Hydroxylase (FHT) durchgeführt, um die Schlagkraft und das Potential dieser Methode zu evaluieren. Ausgewählt wurde die FHT, da im Labor für dieses Enzym etablierte Enzymtest- und Analysemethoden zur Verfügung stehen.

λ -ZAP-cDNA-Library Massen-Expression

verändert nach Akashi *et al.* (2003) und dem λ -ZAP-cDNA-Library-Kit-Protokoll

1. 200 μ l frische SORL-Zellen (Übernacht-Kultur pelletiert und mit 10 mM $MgSO_4$ auf OD=1 eingestellt) mit Aliquot der Phagemide (ca. 60.000) mischen
2. 37° C für 15 min. inkubieren
3. Je 70 μ l auf 3 LB_{Amp} -Platten ausstreichen
4. 37° C über Nacht inkubieren

5. Kolonien von den Platten mit einem breiten Spatel abschaben und in 50 ml-Falkon-Röhrchen mit 20 ml LBamp geben (insgesamt 6 Falkon-Röhrchen mit je einer halben abgeschabten Platte = ca. 10.000 Kolonien/Falkon)
6. 3 h bei 30° C inkubieren
7. Nach 3 h nochmals 10 ml LBamp dazugeben und für 1 h bei 30° C inkubieren.
8. Ca. 50 µl aus jedem Falkon auf separate LBamp-Platten plattieren (stock für nächsten Fraktionierungsschritt)
9. Aus jedem Falkon-Röhrchen 5 ml raus- und in ein neues Falkon-Röhrchen reingeben (= nicht induziertes Kontrollgemisch)
10. Alle 6 Falkon-Röhrchen mit 150 µl 1 M IPTG induzieren (ca. 5 mM final)
11. Alle 6 Falkon-Röhrchen + Kontrolle 12 h bei 30° C inkubieren
12. Bakterien der 7 Falkon-Röhrchen pelletieren und in ca. 500 - 1000 µl Überstand wieder resuspendieren
13. In 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße überführen, pelletieren, und Überstand völlig abpipettieren
14. Ca. 700 µl Glasperlen zugeben
15. Pellet in 500 µl Puffer A (0,1 M KPi pH 7,5; 10 % Saccharose, 14 mM Mercaptoethanol) lösen
16. Ca. 5 min. schütteln, vortexen und immer wieder kurz auf Eis stellen.
17. 10 min. bei 4° C abzentrifugieren
18. Überstand aliquotieren und für den Enzymtest verwenden. (40 µl im 100 µl-Test)

FHT-Test für die Evaluierung der einzelnen cDNA-library Fraktionen

In dem Test wurde der enzymatische Umsatz von Naringenin zu Dihydrokämpferol getestet.

Der Enzymansatz enthielt in 100 µl:

6.000 dpm	C ¹⁴ -Naringenin
50 µl	Tris/HCl-Puffer 0,1 M + 0,4 % Ascorbat, pH 7,25
5 µl	FeSO ₄ (0,56 mg/ml H ₂ O)
5 µl	α-Ketoglutarat (1,46 mg/ml H ₂ O)
40 µl	Enzymextrakt der Fraktionen

Die Ansätze wurden bei 30 °C 30 min inkubiert, mit 10 µl Essigsäure angesäuert und mit 80 µl Ethylacetat extrahiert. Die Oberphasen wurden auf Cellulose-Platten im Laufmittel CAW (Chloroform : Essigsäure : Wasser = 10 : 9 : 1) dünnschichtchromatographisch getrennt.

Ergebnisse und Schlussfolgerungen

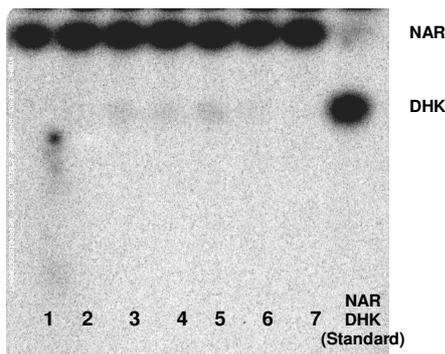


Abb. 1.16: FHT-Test mit Enzympräparationen der einzelnen funktionell exprimierten cDNA-library Fraktionen mit Naringenin (NAR) als Substrat und Dihydrokämpferol als Produkt. (Nr. 1 - 6: mit IPTG zur Expression induziert. Nr. 7: nicht induzierte Fraktion als Kontrolle)

Die Titerbestimmung der cDNA-library ergab 470.000 pfu (Primärbibliothek), wodurch eine repräsentative Auswahl der exprimierten Gene gewährleistet ist. Der FHT-Test zeigte unterschiedliche Aktivitäten mit den einzelnen Fraktionen der funktionell exprimierten cDNA-library, wobei in den Fraktionen 3, 4, 5 und 6 eine geringe FHT-Aktivität nachweisbar war, welche für eine weitere Fraktionierung in Frage kämen. In der nicht induzierten Kontrollfraktion war keine Aktivität nachweisbar. Der vorliegende FHT-Test bestätigte das Potential dieser Screeningmethode. In weiter Folge soll diese Methode zur Klonierung des Gens, welches für den Reduktionsschritt von Cumaroyl-CoA zum p-Dihydrocumaroyl-CoA verantwortlich ist, verwendet werden.

1.1.3.3 Herstellung von C¹⁴-markierten CoA-Estern

Voraussetzung für das Screening der einzelner Fraktionen der funktionell exprimierten cDNA-library sind sensitive Test- und Evaluierungsmethoden, was durch die Verwendung radioaktiv markierter Substrate im Enzymtest gewährleistet werden kann. Für das Screening nach dem Klon, der für die Entstehung von p-Dihydrocumaroyl-CoA aus p-Cumaroyl-CoA, (sowie die umgekehrte Reaktion) verantwortlich ist, sind radioaktiv markierte CoA-Ester notwendig. Dazu wurde eine

p-Cumarat:CoA-Ligase - cDNA (*4cl*) in den Vektor pGEX 4T1 kloniert und in *E. coli* BL21(DE3) transformiert (zur Verfügung gestellt von Wilfried Rozhan, Wien). Die heterolog exprimierte *4cl* wurde mit folgendem Enzymtest auf ihre Aktivität überprüft (verändert nach Zhang *et al.*, 1997)

1. 930 μ l Tris/HCl pH 7,5 (0,2 M final)
2. 10 μ l $MgCl_2 \times 6 H_2O$ (8 mM final)
3. 10 μ l ATP (Sigma A2383) (0,8 mM final)
4. 10 μ l p-Cumarsäure (Sigma C9008) (0,1 mM final)
5. 30 μ l heterologe CoA-Ligase

starten mit:

6. 10 μ l $CoAl_3$ Sigma (C3019) (25 μ M final)
7. Die Änderung der Absorption bei 333 nm wurde gemessen.

Ergebnisse und Schlussfolgerungen

In zwei unabhängigen Messungen konnte eine Absorptionsänderung von 0,18 bzw. 0,26 im Vergleich zu den Kontrollen gemessen werden. Die heterolog exprimierte *4cl* sollte deshalb nach weiteren Optimierungsschritten für die Synthese von radioaktiv markierten CoA-Estern geeignet sein, die in weiterer Folge für sensitive Enzymtests zur Analyse der cDNA-library-Fractionen verwendet werden können.

2 Infektionsversuche

2.1 Versuch 2005



Abb. 2.1: Quarantäneglashauskabine (AGES)

Das veredelte Pflanzenmaterial (je 60 Pflanzen Idared bzw. Rebella und 120 Pflanzen *M. robusta*) wurde am 21. März 2005 von der Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen Dresden - Pillnitz (BAZ) abgeholt und in die AGES gebracht. In der AGES wurden die Pflanzen in Substrat und in Kulturgefäße getopft. Im Verlauf der Vegetationsperiode erfolgte von der AGES eine Behandlung mit Pflanzenschutzmitteln, um die zu untersuchende Physiologie nicht durch zusätzliche biotische Streßfaktoren zu belasten (Bayleton gegen Mehltau sowie Lannate gegen Blattläuse und Thripse). Vor dem Transfer in die Quarantänekabine wurden die Pflanzen im 16-Stunden-Tag in den Glashäusern der AGES kultiviert.

Inokulationsexperiment

Die Sprossspitzen wurden unter dem 3. Blatt mit einer Spritzenadel (1ml) angestochen und mit 0,5 µl Inokulat injiziert. Optimale Bedingungen für die Infektion mit dem Feuerbrandbakterium (Ea) wurden in der Quarantänekabine durchgeführt (Luftfeuchtigkeit bei 80 - 90 % sowie einer Temperatur von 27° C). Der Standardstamm der AGES (*Erwinia amylovora* 295/93) wurde freundlicherweise in

einer Konzentration von 10^8 cfu von Herrn Ing. Schaffer (AGES) zur Verfügung gestellt. Die Bakterien wurden 24 Stunden bei 27°C in King B Medium kultiviert. Die Kontrollbehandlungen wurden mit Nährmedium (King B) durchgeführt. Das erste und zweite Blatt (Blatt 1) sowie das dritte Blatt wurden in Intervallen von 6 h, 24 h, 48 h und 72 h nach der Ea-Behandlung von mehreren Pflanzen gepoolt, gewogen und für Enzym-, Inhaltsstoffe und Genexpressionsanalysen getrennt in flüssigem Stickstoff eingefroren. Weiters wurden auch noch die Sproßspitzen 1 - 2 cm geerntet, um eventuelle weitere Analysen (z.B. Salicylsäurebestimmungen) durchzuführen.

2.1.1 Molekularbiologische Untersuchungen

RNA-Extraktion

Gesamt-RNA wurde von den Apfelblättern nach Chang *et al.* (1993) isoliert und spektralphotometrisch mittels Nanodropbestimmung verifiziert.

Primerdesign

Multiples Sequenzalignment mit Verwendung von CLUSTAL W 1.83 software (Kyoto Center) wurde für die Phenylpropanoidgene durchgeführt. Die Primer wurden, basierend auf konservierten Gensequenzen (NCBI) für FLS, CHS, CHI, DFR und PAL, abgeleitet und sollten ein Amplifikationsprodukt von ca. 100 bp ergeben. Primerdesign sowie Optimierung wurden mittels Primer 3 software (entwickelt von Whitehead-Institute und Howard Hughes Medical Institute) durchgeführt. Die folgenden Primerkombinationen wurden verwendet:

CHS-f 5'-AAC GAG GCC TTC AAG CCT AT-3'

CHS-r5' -GGG TGT GCA ATC CAG AAG AG-3'

CHI-f 5' -CAT CGT TAC AGG TCC GTT TG-3'

CHI-r5' -TTT CAA TGG CTT TGC CTT CT-3'

FLS-f 5' -CAT GTC CTC GCC CTG ATC T-3'

FLS-r5' -TGA CAA GGG CAT TAG GGA TG-3'

DFR-f 5' -TGC CAA AGA AAA CAA CAT TGA-3'
 DFR-r5' -GTG AAC ATA CTG CCC CTG CT-3'

PAL-f 5' -TGA CAA ATG GCG AGA GTG AG-3'
 PAL-r5' -CTC TTC CTC GAA AGC TCC AA-3'

UBQ-f 5' -TCT TTG TGA AAA CCC TCA CC-3'
 UBQ-r5' -ATC CCT TCC TGG TCC TGG AT-3'

ACT-f 5' -CGA TCG TCT TCG TTT TCG TT-3'
 ACT-r5' -CCA TAC CAA CCA TGA CAC CA-3'

Real Time PCR

DNA-Kalibrierkurven wurden hergestellt sowie die mRNA mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Verschiedene Housekeeping-Gene wurden als Standards getestet, wobei das Gen für Polyubiquitin sich geeigneter als das Actin erweist. Daher wurde Polyubiquitin als Housekeeping-Gen verwendet.

5 µg Gesamt-RNA der extrahierten Proben wurden mittels 200 U of Superscript II Rnase H Reverse Transkriptase (Invitrogen) unter Verwendung von 0,5 µg oligo dT Primer (Invitrogen) gemäß den Herstellerangaben revers transkribiert. Die PCR Amplifikationen wurden mit den entsprechenden Primern durchgeführt. In allen Proben wurden 2 µl der firststrand cDNA verwendet. 50 µl des PCR-Ansatzes enthielten 5 µl 10 x PCR-Puffer, 1 µl 10 mM dNTP-Mix, 1 µl forward Primer (10µM), 1 µl reverse Primer (10µM) und 0.4 µl Taq Polymerase (5U/µl). PCR Zyklen: 1. Schritt: 2 min bei 95° C, gefolgt von 40 Zyklen je 30 s bei 94° C, 15 s 55° C.

Die Ergebnisse wurden mittels relativer Expression Software Tool-REST-XL© analysiert. Dabei wird jeweils das Verhältnis von Ea inokuliert im Vergleich zur Kontrollbehandlung (King B) wiedergegeben. Ist das Verhältnis < 0, ist die Genexpression verringert, und ist das Verhältnis > 0, findet eine verstärkte Transkription des Gens statt.

Ergebnisse und Diskussion

Phenylalaninammonialyase (PAL)

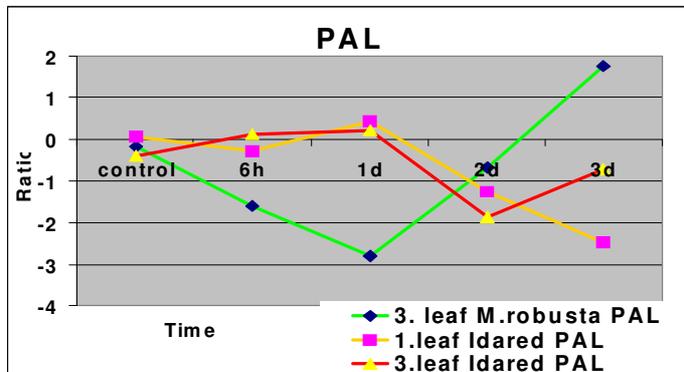


Abb. 2.1: Expression der PAL

In Abb. 2.1 ist die Genexpression der PAL dargestellt. Die Downregulierung findet in der anfälligen Sorte „Idared“ am 2. Tage nach Inokulation mit Ea statt. An diesem Tag waren noch keine Schadsymptome an den Pflanzen sichtbar. Morphologische Veränderungen und starke Nekrosen traten am 3. Tag nach Inokulation in den behandelten Pflanzen auf. Die Suppression der Genexpression setzte sich dann in Blatt 1 und 2 in den inokulierten Pflanzen fort.

Die Genexpressionsmuster von *M. robusta* zeigen hingegen ein verändertes Bild. Bei den ersten Probenahmen, 6 h und ein Tag nach Inokulation findet eine Downregulierung von PAL statt. Am Tag 2 und insbesondere am Tag 3 wird PAL jedoch wieder hochreguliert.

Chalconsynthase (CHS)

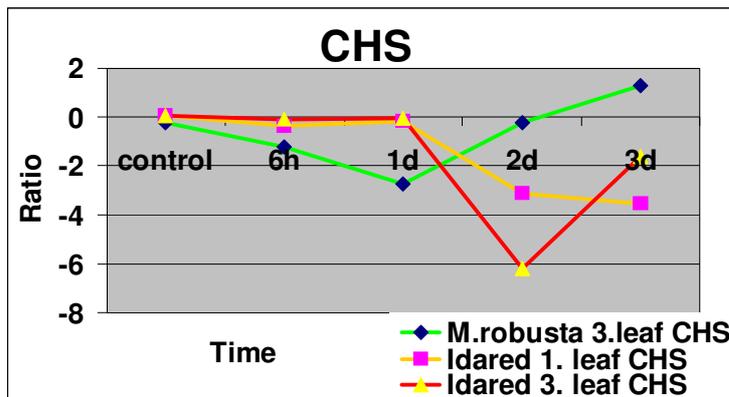


Abb. 2.2: Expression der CHS

Ein ähnlicher Expressionsverlauf wie bei der PAL ist auch bei der CHS (Abb. 2.2) festzustellen. Auch hier findet keine nennenswerte Änderung in der Expression in der anfälligen Sorte „Idared“ während der ersten beiden Probenahmetermine statt. Die Downregulierung ist jedoch ab dem 2. Tag dann noch markanter als bei PAL (Ratio -6).

Ein ähnliches Bild zeigt sich auch bei der resistenten Wildapfelart, wo es bei den ersten beiden Probenahmeterminen nach Inokulation zu einer geringen Downregulierung kommt, diese jedoch dann wieder stark ansteigt.

Chalconisomerase (CHI)

Der Expressionsverlauf der Chalconisomerase (Abb. 2.3) zeigt ein verändertes Muster. In der anfälligen Sorte „Idared“ ist die Aktivität dieses Gens immer höher als in *Malus robusta* und steigt am 3. Tag nach Inokulation geringfügig an.

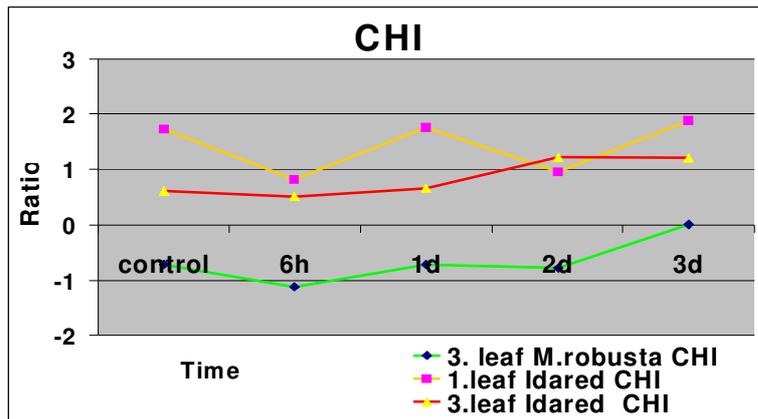


Abb. 2.3: Expression der CHS

Dihydroflavonol 4-reduktase (DFR)

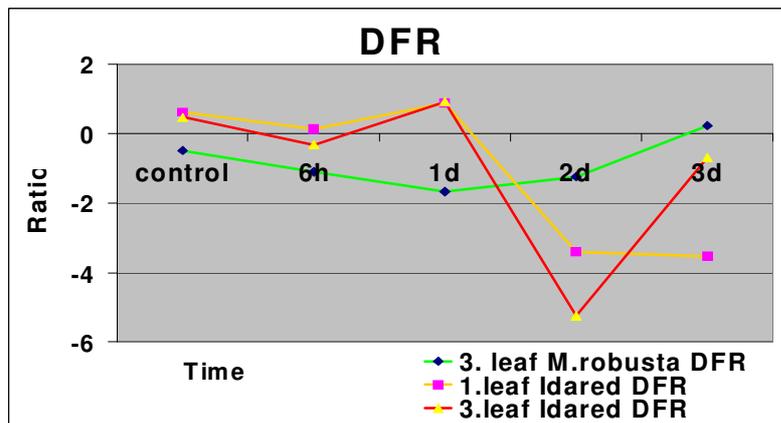


Abb. 2.4: Expression der DFR

Die Genexpression der Dihydroflavonol 4-reduktase (DFR) (Abb. 2.4) verläuft nach einem ähnlichen Muster wie bei der PAL und CHS. Bei der anfälligen Sorte kommt es ab dem 2. Tag zu einer Downregulierung, wohingegen es bei *M. robusta* zu einem leichten Anstieg kommt.

Flavonolsynthese (FLS)

Die Transkription des Flavonolsynthese - Genes (FLS) in Abb. 2.5 hingegen zeigt bei der anfälligen Sorte einen starken Anstieg ab dem 1. Tag nach Ea Infektion, während bei *M. robusta* ein starker Rückgang bis zum 3. Tag nach Ea-Inokulation zu beobachten ist.

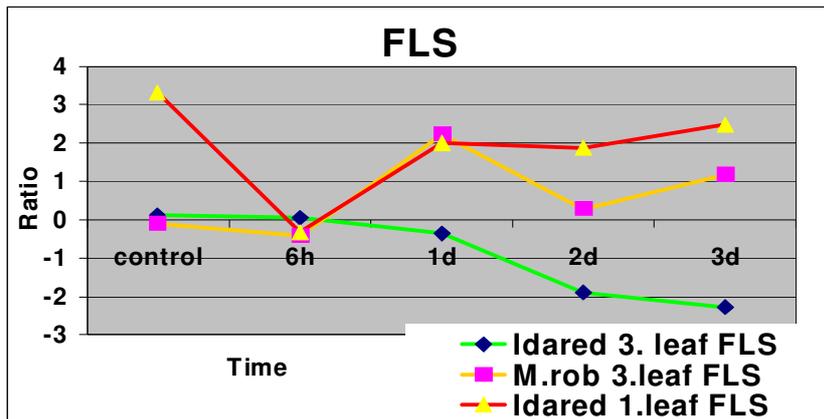


Abb. 2.5: Expression der FLS

Zusammenfassung

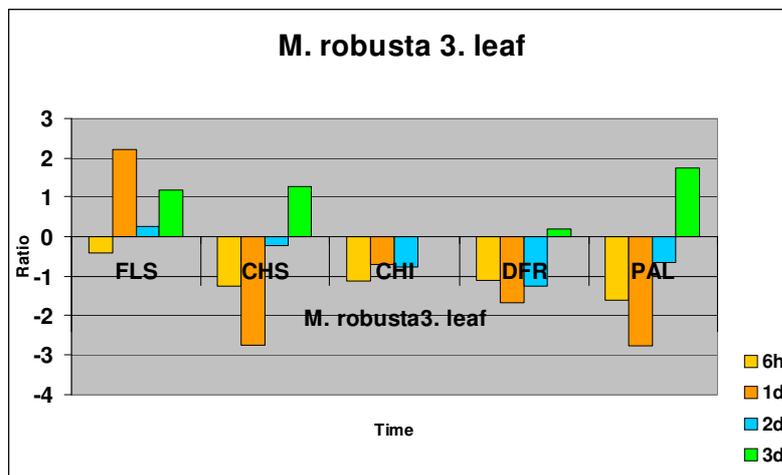


Abb. 2.6: *M. robusta* (3. Blatt)

Die zusammengefasste Darstellung des Expressionsverlaufs in *M. robusta* 3. Blatt (Abb. 2.6) zeigt, dass nach der Inokulation mit *Ea* mit Ausnahme von FLS alle ausgewählten Gene downreguliert werden, am stärksten am Tag 1. Weiters ist zu beobachten, dass das Verhältnis zwischen CHS und PAL fast im gleichen Ausmaß downreguliert wird. Am 3. Tag nach Inokulation zeigte sich jedoch bei allen Genen (mit Ausnahme CHI) wieder ein Anstieg in der Genexpression.

Werden die Daten von Blatt 3 zwischen anfälliger (Abb. 2.7) und resistenter Wildapfelart verglichen, fällt auf, dass das Gen FLS bei Idared immer downreguliert wird, hingegen bei *Malus robusta* stark upreguliert wird. Generell ist bei der anfälligen Sorte eine stärkere Downregulierung zu beobachten. Diese Suppression der

Genexpression ist typisch für phytopathogene Bakterien des Typs III Sekretionssystems (TTSS). Zu dieser Bakteriengruppe gehört auch *Erwinia amylovora*. Die Bakterien des Typ III Sekretionssystems injizieren Effektorproteine in die Pflanzenzelle und stören die Pflanzen-Abwehr-Signaltransduktion (Mudgett, 2005). Insbesondere interagieren sie mit der Resistenz-Protein-Aktivierung, dem MAPK signalling, unterdrücken den programmierten Zelltod sowie die Salicylsäure (SA)-abhängigen und SA-unabhängigen Pflanzenzellwandabwehrsysteme. Auffällig ist weiters, dass im Gegensatz zu *M. robusta*, bei der die CHI downreguliert wird, bei *Idared* die CHI upreguliert wird.

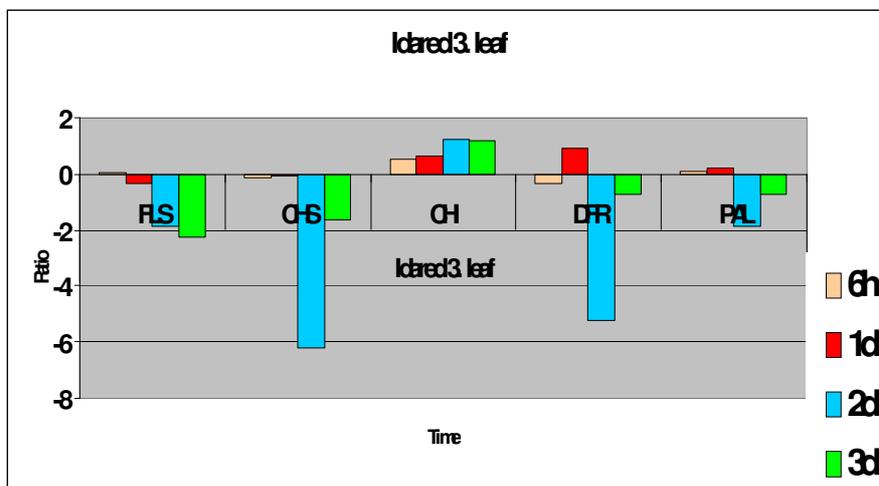


Abb. 2.7: *Idared* (3. Blatt)

Ein Vergleich zwischen *Idared* 1.+2. Blatt (Abb. 2.8) mit dem 3. Blatt zeigt deutliche Unterschiede. Insbesondere die FLS ist im Gegensatz zu Blatt 3 hochreguliert, wohingegen die CHS, DFR und PAL stärker reprimiert werden als in den Zellen des bereits weiter ausdifferenzierten dritten Blattes.

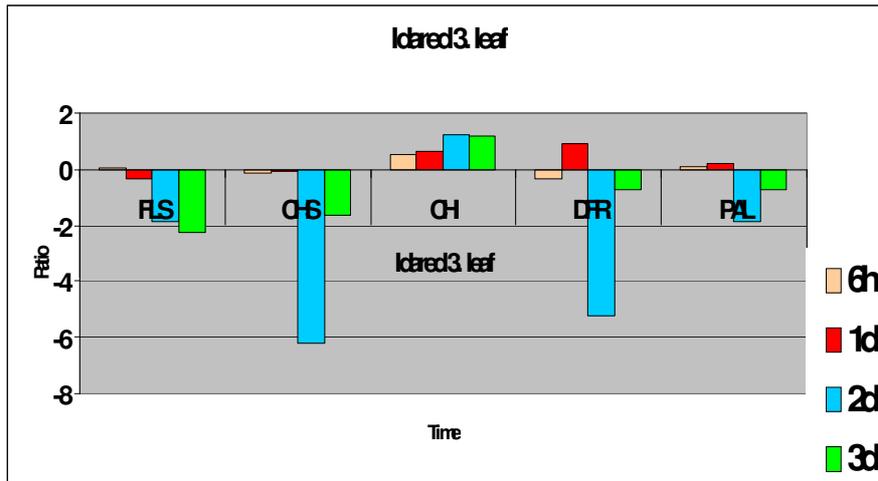


Abb. 2.8: Idared (1. Blatt)

Die Ergebnisse der Genexpressionsmuster stimmen nur teilweise mit den Arbeiten von Venisse *et al.* (2002) ein. Auch in diesen Arbeiten wird die Genexpression insbesondere von PAL, CHS, DFR durch Ea unterdrückt. Ein unterschiedliches Genexpressionsmuster wurde jedoch bei FLS und CHI in den von uns durchgeführten Versuchen festgestellt, nämlich dass diese Gene durch Ea stimuliert werden und nicht, wie von Venisse *et al.* (2002) beschrieben, reprimiert werden. Ein gänzlich anderes Bild ergibt sich auch bei der resistenten Wildapfelart, wo nach der unmittelbaren Inokulation eine Downregulierung, aber ab dem 2. Tag eine Upregulierung insbesondere von PAL, CHS, DFR und FLS stattfindet. Eine mögliche Erklärung könnte in den verwendeten Apfelsorten liegen.

2.1.2 Enzymatische Untersuchungen

Bei der Abwehr des Pathogens ist oft nicht die Menge an gebildeten sekundären Inhaltsstoffen entscheidend, sondern die Geschwindigkeit, mit der sie synthetisiert werden. Aus diesem Grund wurde die Enzymaktivität der an der Biosynthese beteiligten Enzyme (Phenylalaninammonialyase (PAL), Chalonsynthase (CHS)/Chalconisomerase (CHI), Flavanon 3-hydroxylase (FHT), Dihydroflavonol 4-reduktase (DFR) und Flavonoid 3-O-glucosyltransferase (F3GT) in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt. Da das Blattalter einen wesentlichen Einfluss auf die Biosynthese hat, wurden die Untersuchungen mit dem 1.+2. und dem 3. Blatt getrennt

durchgeführt. Das 1. und 2. Blatt musste allerdings aufgrund der geringen Menge an Blattmaterial vereinigt werden.

Ergebnisse

Phenylalaninammonialyase (PAL)

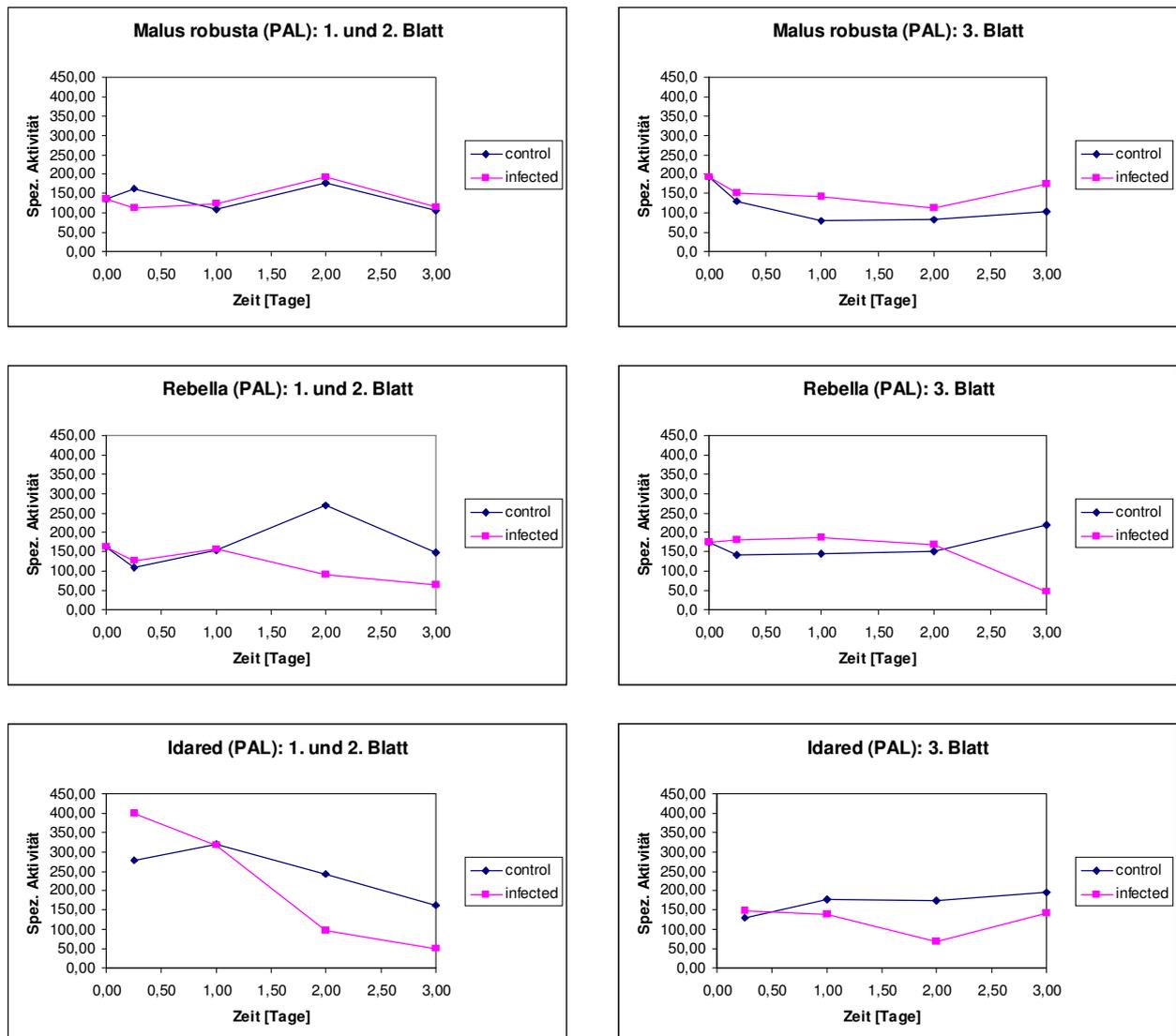


Abb. 2.9: PAL - spez. Aktivität

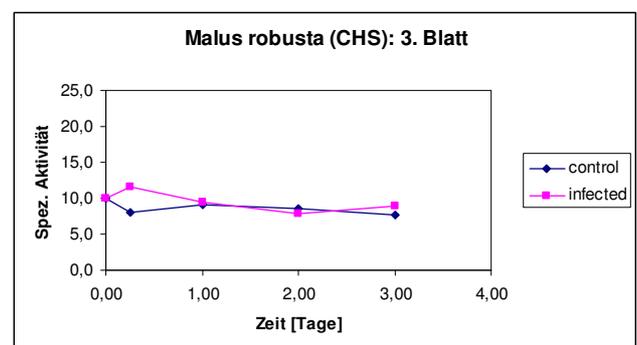
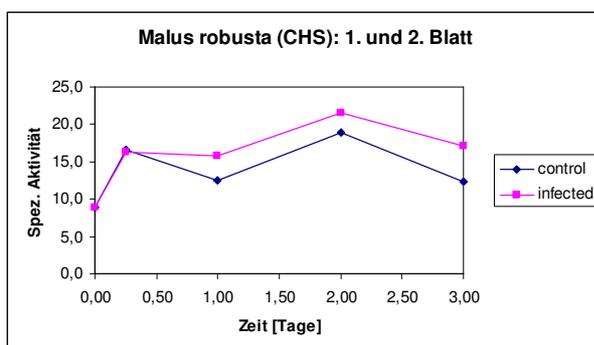
Die PAL stellt das Schlüsselenzym für den gesamten Phenylpropan-Stoffwechsel dar. Bei *M. robusta*, die resistent gegen Feuerbrand ist, kann nach Infektion mit *E. amylovora* in den beiden jüngsten Blättern nur eine geringe Erhöhung der PAL-Aktivität während der gesamten Versuchsdauer beobachtet werden. Im 3. Blatt kann

hingegen eine deutlich höhere PAL-Aktivität bei allen Messzeitpunkten festgestellt werden.

Der Verlauf der spezifischen PAL-Aktivität bei der Sorte Rebella zeigt im 1. und 2. Blatt nach erfolgter Infektion bis zum 1. Tag nahezu keinen Unterschied zur Kontrolle. Nach dem 1. Tag kommt es bei den infizierten Pflanzen zu einer kontinuierlichen Abnahme der PAL-Aktivität, während bei den Kontrollpflanzen zunächst eine Zunahme und ab dem zweiten Tag ein Rückgang der Enzymaktivität zu beobachten ist. Betrachtet man das 3. Blatt, so sieht man, dass sich die spezifische Aktivität zwischen den infizierten und nicht infizierten Pflanzen bis zum 2. Tag kaum nennenswert unterscheidet. Nach dem 2. Tag kommt es bei den infizierten Pflanzen zu einem starken Rückgang der PAL-Aktivität, während es bei den Kontrollpflanzen nach dem 2. Tag zu einem Anstieg der spezifischen Aktivität kommt.

Bei der stark anfälligen Sorte Idared kommt es bei den infizierten Pflanzen im 1. und 2. Blatt zu einer kontinuierlichen Abnahme der PAL-Aktivität. Dies gilt auch für das 3. Blatt, allerdings ist der Rückgang der PAL-Aktivität nicht so drastisch wie im 1. Blatt. Bei den Kontrollpflanzen kommt es hingegen zu einer leichten Zunahme der spez. PAL-Aktivität.

Chalconsynthese (CHS)



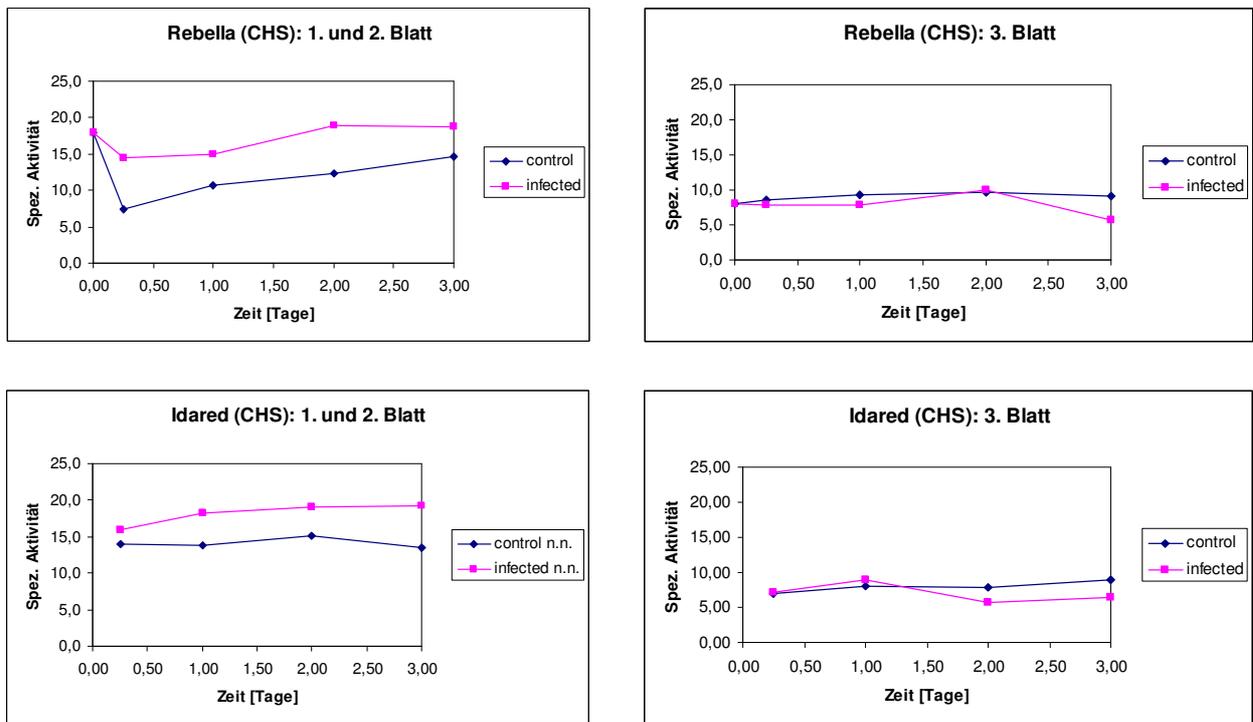
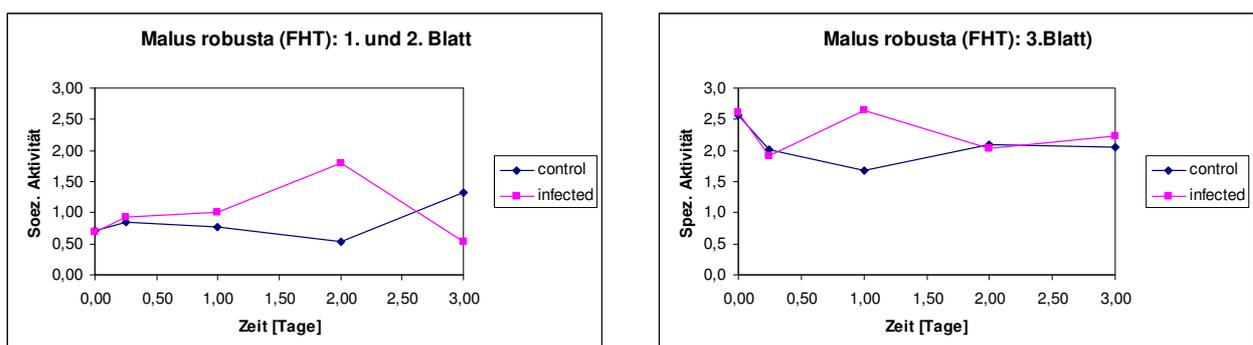


Abb. 2.10: CHS - spez. Aktivität

Die Chalconsynthase (CHS) ist das Schlüsselenzym des Flavonoid-Biosynthesewegs. Bei *Malus robusta* ist beim 1. und 2. Blatt bis zum 1. Tag kein Unterschied zwischen den infizierten und nicht infizierten Pflanzen zu beobachten. Ab dem 1. Tag weisen die infizierten Pflanzen eine etwas höhere CHS-Aktivität auf. Beim 3. Blatt ist nahezu kein Unterschied bei der CHS-Aktivität zwischen den infizierten Pflanzen und der Kontrolle festzustellen. Sehr ähnliche Ergebnisse konnten sowohl bei der Sorte Rebella als auch bei der Sorte Idared beobachtet werden. Bei diesen Sorten konnte allerdings bereits nach 6 Stunden eine erhöhte CHS-Aktivität im 1. und 2. Blatt der infizierten Pflanzen festgestellt werden.

Flavanon 3-hydroxylase (FHT)



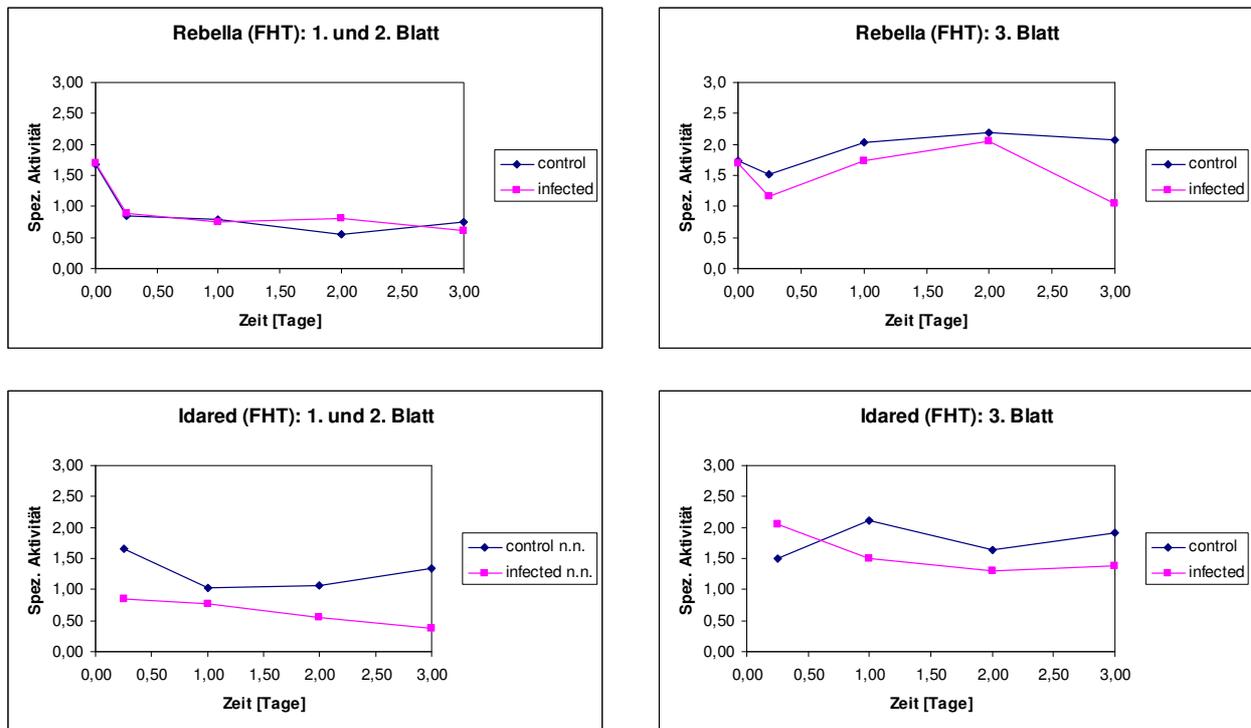


Abb. 2.11: FHT - spez. Aktivität

Die Flavanon 3-hydroxylase (FHT) katalysiert die enzymatische Umwandlung der Flavanone zu den Dihydroflavonolen. Diese sind sowohl die unmittelbaren Vorstufen der Leucoanthocyanidine als auch der Flavonole. Interessant ist, dass es bei *Malus robusta*, der resistent gegen den Erreger des Feuerbrands ist, bei allen Blattstadien nach erfolgter Infektion zu einem Anstieg der FHT-Aktivität kommt. Bei der Sorte Rebella, die schorfresistent ist, waren im 1. und 2. Blatt nach erfolgter Inokulation kaum Unterschiede zur Kontrolle festzustellen, während es im 3. Blatt zu einer Abnahme der Enzymaktivität über den gesamten Versuchszeitraum kam. Die sowohl Schorf- als auch Feuerbrand-anfällige Sorte Idared zeigt in allen Blattstadien eine starke Verminderung der FHT-Aktivität nach erfolgter Infektion.

Dihydroflavonol 4-reduktase (DFR)

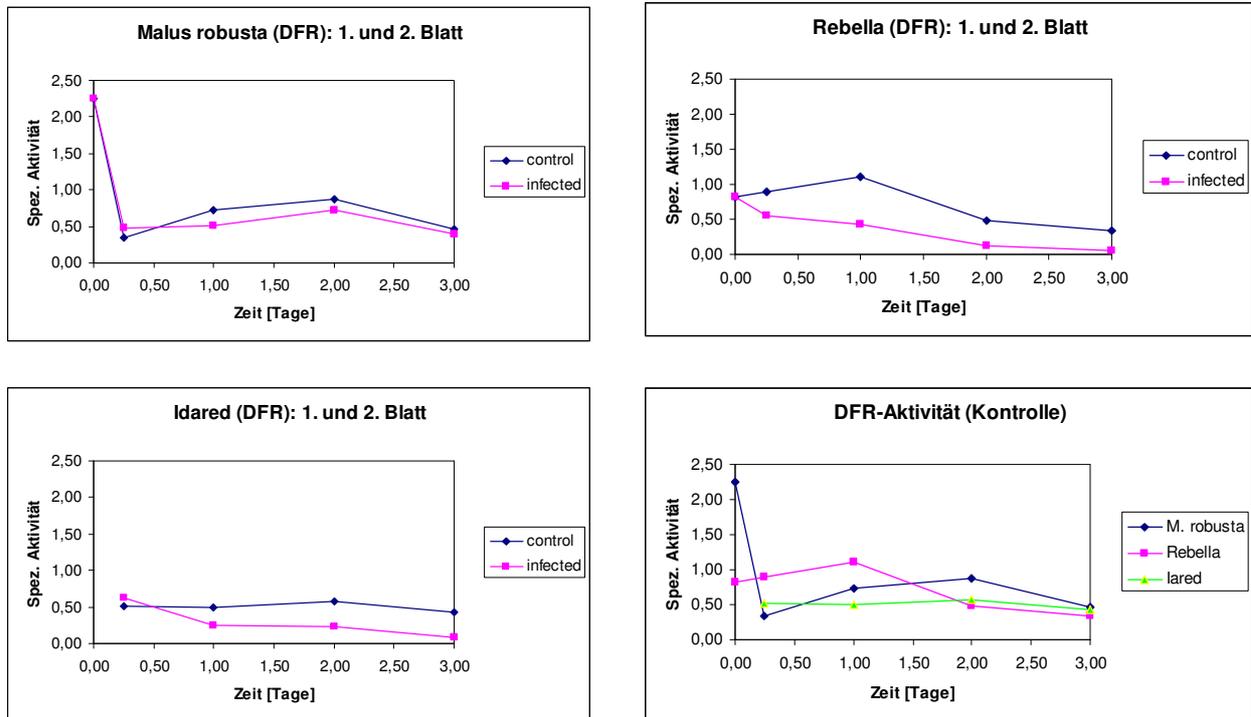


Abb. 2.12: DFR - spez. Aktivität

Die Dihydroflavonol 4-reduktase (DFR) katalysiert die enzymatische Umwandlung der Dihydroflavonole zu den Leucoanthocyanidinen, welche die unmittelbaren Vorstufen der Flavan 3-ole (Catechin, Epicatechin, Proanthocyanidine) sind. Diese Verbindungen spielen eine große Rolle bei der Wirt-Pathogen-Wechselbeziehung.

Interessant ist die spezifische DFR-Aktivität der nicht infizierten Äpfel im 1. und 2. Blatt in Abhängigkeit von der Zeit. Die Bestimmungen bei *M. robusta* ergaben nach einer relativ hohen Anfangsaktivität zunächst einen raschen Abfall. Danach stieg die Enzymaktivität wieder, erreichte am 2. Tag ihr Maximum und nahm danach wieder leicht ab. Rebella hingegen zeigt zu Beginn eine relativ hohe Enzymaktivität, welche am Tag 1 ihr Maximum erreicht und danach abnimmt. Die DFR-Aktivität ist bei der Sorte Idared bei allen Zeitpunkten nahezu gleich und im Vergleich zu den beiden anderen untersuchten Apfelblättern wesentlich geringer.

Die DFR-Aktivität wird bei *M. robusta* bis 6 Stunden nach erfolgter Inokulation nicht beeinflusst. Danach kommt es zu einer geringfügigen Verringerung der

Enzymaktivität. Dessen ungeachtet ist die Zunahme der DFR-Aktivität zwischen dem 1. und 2. Tag zu beobachten, wenngleich auf geringerem Niveau als bei den nicht infizierten Pflanzen. Anders verhält es sich bei den Sorten Rebella und Idared. Bei beiden Sorten kommt es infolge der Infektion zu einem deutlichen Rückgang der spezifischen DFR-Aktivität. Dies bedeutet für die Pflanze, dass sie weniger Leucoanthocyanidine und in weiterer Folge weniger Proanthocyanidine und monomere Flavan 3-ole bilden kann.

Flavonoid 3-O-glucosyltransferase (F3GT)

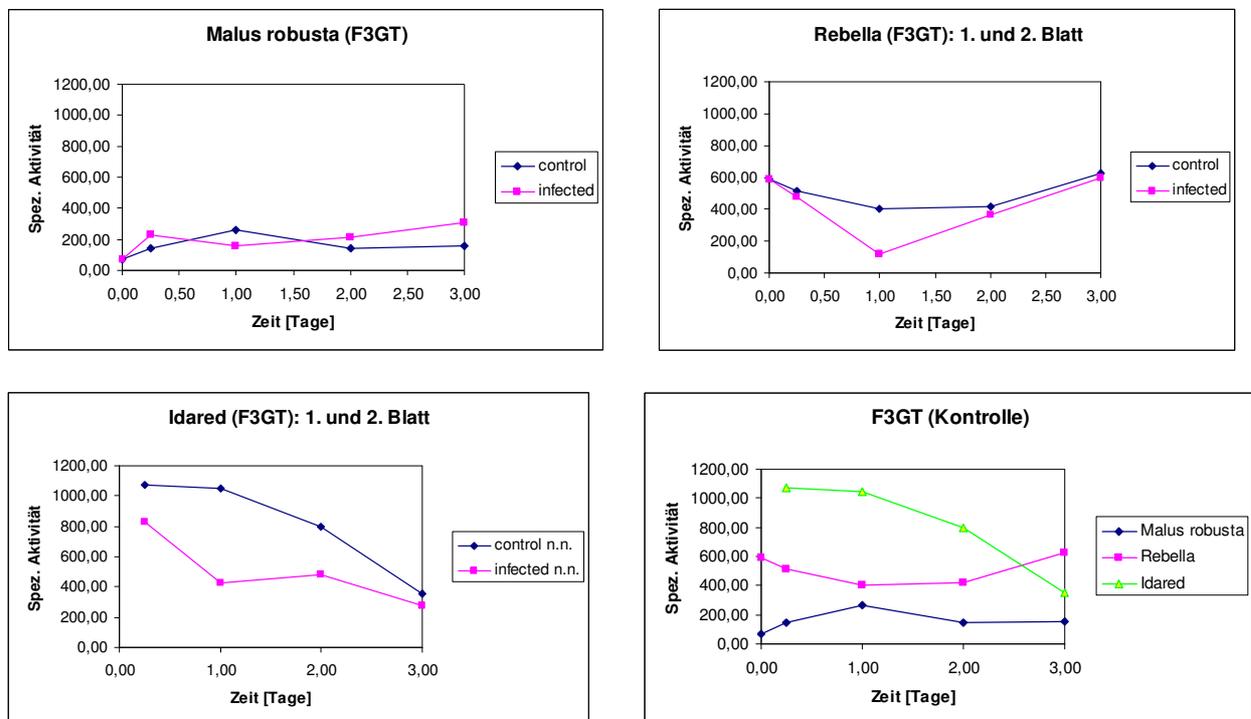


Abb. 2.13: F3GT - spez. Aktivität

Die Flavonoid 3-O-Glucosyltransferase (F3GT) überträgt den Glucoserest von UDP-Glucose auf die Hydroxylgruppe der Anthocyanidine bzw. Flavonole der Position 3. Auffallend ist, dass das 1. und 2. Blatt des sowohl gegen Feuerbrand als auch Schorf resistenten Apfels *Malus robusta* eine geringe F3GT-Aktivität aufweist. Die gegen Schorf resistente Sorte Rebella besitzt eine höhere F3GT-Aktivität. Die höchste F3GT-Aktivität kann bei der sowohl gegen Schorf als auch Feuerbrand anfälligen Sorte Idared gemessen werden, wobei ein starker Abfall der Enzymaktivität mit zunehmender Zeit zu beobachten ist.

Die F3GT-Aktivität im 1. und 2. Blatt von *Malus robusta* unterscheidet sich von der Kontrolle nur unwesentlich. Verglichen mit den anderen beiden Sorten ist sie gering. Bei den infizierten Blättern der Sorten Rebella und Idared kommt es hingegen unmittelbar nach der Infektion zu einer Absenkung der F3GT-Aktivität.

Die im Cytosol gebildeten Flavonole und Anthocyanidine werden von der F3GT in die entsprechenden 3-O-Glucoside umgewandelt. Dadurch werden diese Moleküle stabilisiert. Darüber hinaus ist die Glucosylierung, meist in Kombination mit der Acylierung, die Grundvoraussetzung für den Abtransport in die Vakuole. Kann dies nicht erfolgen, kommt es infolge der hohen Konzentration an Flavonoiden zur Vergiftung der pflanzlichen Zelle. Darüber hinaus können die ebenfalls im Cytosol lokalisierten Polyphenoloxidasen und Peroxidasen die gebildeten Flavonoide zu ihren entsprechenden o-Chinonen oxidieren. Diese sind, wie bereits bei der Oxidation des Phloretins erwähnt wurde, sehr reaktionsfähig und können mit Amino- und SH-Gruppen von Proteinen leicht reagieren. Als Folge kommt es zur Inaktivierung von Proteinen. Im Fall einer Infektion bedeutet ein höherer Level an o-Chinonen, dass die vom Pathogen gebildeten Enzyme inaktiviert werden und die Pflanze damit das Vordringen des Pathogens entweder verzögern oder sogar vollständig verhindern kann.

In Zusammenhang mit der Widerstandsfähigkeit gegen Pflanzenkrankheiten könnte dies möglicherweise folgendes bedeuten: Eine geringe F3GT-Aktivität führt dazu, dass die gebildeten Flavonoide nur langsam in ihre entsprechenden 3-O-Glucoside umgewandelt werden und die Konzentration der Aglyka im Cytosol sicher höher ist als bei Pflanzen mit einer hohen F3GT-Aktivität. Dies könnte dazu führen, dass es durch die erhöhte Aglyka-Konzentration infolge der enzymatischen Oxidation durch die ebenfalls im Cytosol lokalisierten Polyphenoloxidase und Peroxidasen zu einer höheren Konzentration an o-Chinonen kommt, welche zu klein ist, um die pflanzliche Zelle zu schädigen, aber ausreichend ist, um die Widerstandskraft der Pflanze gegen Pathogene zu erhöhen.

Außer der Bildung von o-Chinonen könnte eine Verringerung der F3GT-Aktivität noch eine andere Bedeutung in Zusammenhang mit der Widerstandsfähigkeit gegen Pathogene haben. In jüngster Vergangenheit wurde die Biosynthese der

Epicatchine aufgeklärt. Es konnte gezeigt werden, dass die Epicatchine durch Reduktion aus den entsprechenden Anthocyanidinen gebildet werden. Das Enzym, das diese Reaktion katalysiert, wurde Anthocyanidinreduktase (ANR) genannt.

Die Weintraube synthetisiert in den frühen Entwicklungsstadien Epicatchine und die entsprechenden Proanthocyanidine, in den späten Entwicklungsstadien hingegen Anthocyane. Es konnte gezeigt werden, dass die F3GT-Aktivität erst in den späten Entwicklungsstadien nachzuweisen ist. Da die Anthocyanidine sowohl Substrate für die ANR als auch F3GT darstellen, bedeutet dies, dass bei Auftreten der F3GT-Aktivität große Mengen der gebildeten Anthocyanidine in die entsprechenden Anthocyanidin 3-O-glucoside umgewandelt werden und der ANR somit nur mehr sehr geringe Mengen an Substrat zur Verfügung stehen (Abb. 2.14). Es wird daher diskutiert, dass die F3GT für das Umschalten der Flavan 3-ol-Biosynthese zur Anthocyan-Biosynthese verantwortlich ist.

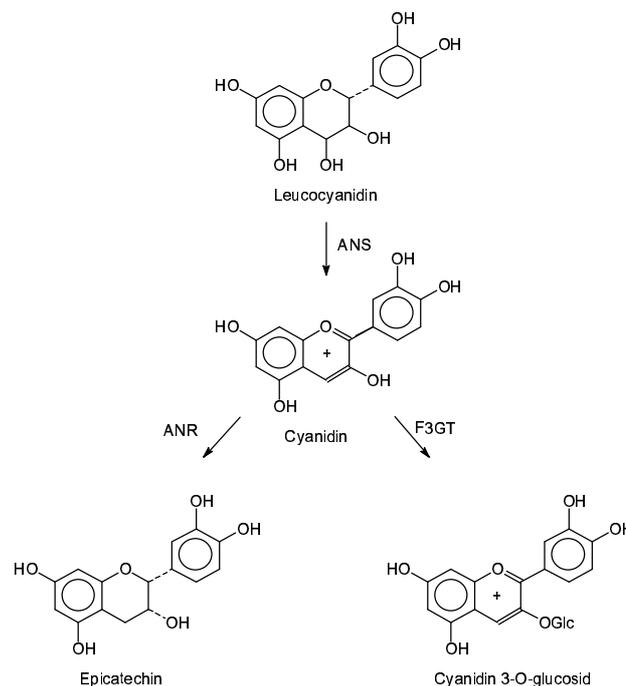


Abb. 2.14: Enzymatische Umwandlung des Anthocyanidins Cyanidin

Im Rahmen dieses Berichts wurde bereits ausgeführt, dass beim Apfel den Flavan 3-olen und hier im Besonderen den Proanthocyanidinen im Zusammenhang mit der Widerstandsfähigkeit gegenüber Pathogenen eine außerordentliche Rolle zukommt.

Eine verringerte F3GT-Aktivität, wie sie bei *Malus robusta* beobachtet wurde, bedeutet, dass mehr der gebildeten Anthocyanidine von der ANR zu den entsprechenden Epicatechinen reduziert werden können. Bei einer höheren F3GT-Aktivität, wie bei der anfälligen Sorte Idared, wird hingegen ein Teil der gebildeten Anthocyanidine in die entsprechenden Anthocyanidin 3-O-glucoside umgewandelt und nur ein geringerer Anteil der gebildeten Anthocyanidine steht der ANR als Substrat zur Verfügung.

Im Rahmen dieses Forschungsprojekts ist daher abzuklären, ob die aus den Versuchsergebnissen mit *Malus robusta* (resistent gegen Feuerbrand und Schorf), Rebella (resistent gegen Schorf) und Idared (anfällig) erhaltene Korrelation zwischen geringer F3GT-Aktivität und Krankheitsresistenz allgemeine Gültigkeit hat. Die in der Genbank von Dresden - Pillnitz vorhandenen Apfelsorten bzw. Naturformen wurden bereits auf ihre Empfindlichkeit gegen Feuerbrand untersucht. Es wurde im Frühjahr junge Blätter geerntet und die F3GT-Aktivität sowie der Gehalt an Epicatechin und Proanthocyanidinen bestimmt und mit der Feuerbrand-Anfälligkeit korreliert werden.

2.2 Enzymatische Untersuchungen verschiedener Apfelsorten bzw. Naturformen

Um herauszufinden, ob es eine Korrelation zwischen der Krankheitsanfälligkeit und der Enzymaktivität verschiedener an der Anthocyan-Biosynthese beteiligter Enzyme gibt, wurden gegen Feuerbrand unterschiedlich empfindliche Apfelsorten bzw. Naturformen untersucht. Das Pflanzenmaterial stammt aus der Genbank der BAZ Dresden - Pillnitz. Um den Einfluss äußerer Faktoren konstant zu halten, wurden die Blätter zum gleichen Zeitpunkt geerntet und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Es wurde das erste, zweite und dritte Blatt unabhängig von einander analysiert.

Die Feuerbrandanfälligkeit wurde von Dr. Richter (BAZ) bestimmt. Als Maßzahl der Feuerbrandanfälligkeit wird die Boniturnote (BN) angegeben. Die Einstufung erfolgt wie nachfolgend angegeben:

Boniturnote	% Befall	Anfälligkeit
1	85,3 - 100,0	hoch anfällig
2	76,6 - 85,2	
3	67,0 - 76,5	anfällig
4	56,2 - 66,9	
5	44,3 - 56,1	moderat anfällig
6	31,1 - 44,2	
7	16,6 - 31,0	moderat resistent
8	1,0 - 16,5	
9	0,0 - 0,9	hoch resistent

Folgende Apfelsorten bzw. Naturformen wurden untersucht:

Rekarda	BN 1,8	Idared	BN 3,2
Pilot	BN 4,3	<i>M. pivata</i>	BN 4,6
Rebella	BN 5,7	Regia	BN 6,5
<i>M. robusta</i>	BN 8,7	<i>M. fusca</i>	BN 8,9

Ergebnisse

Phenylalaninammoniumlyase (PAL)

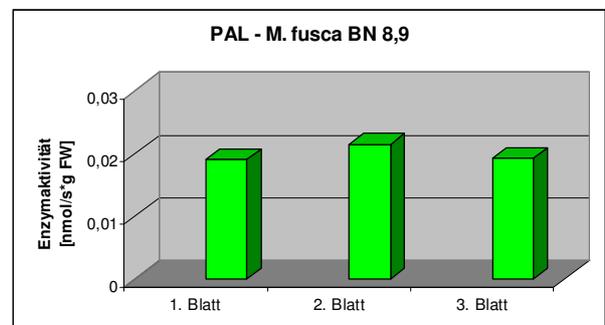
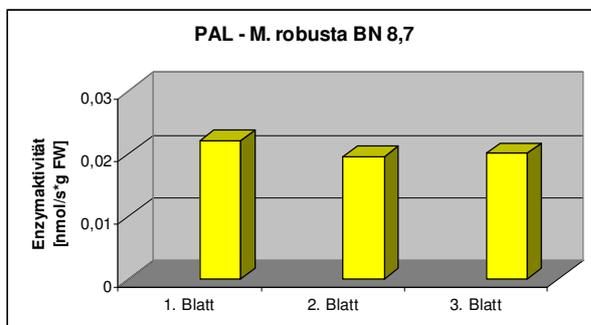
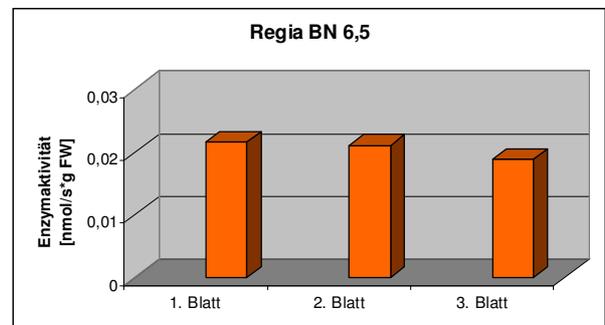
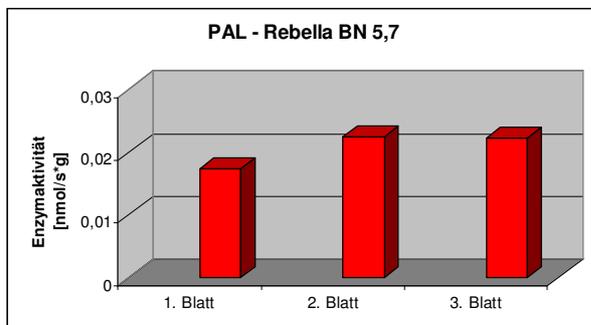
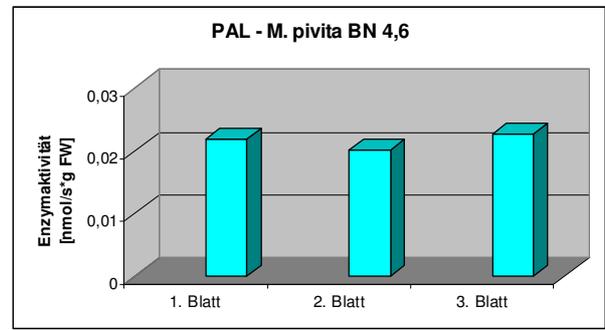
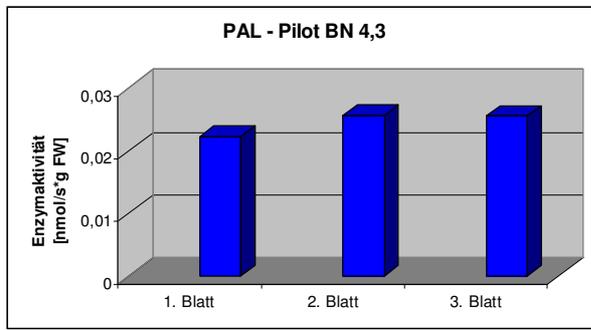
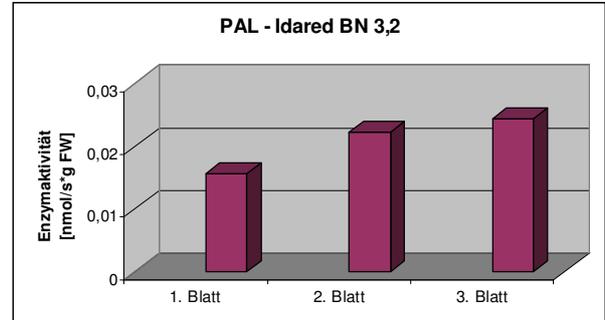
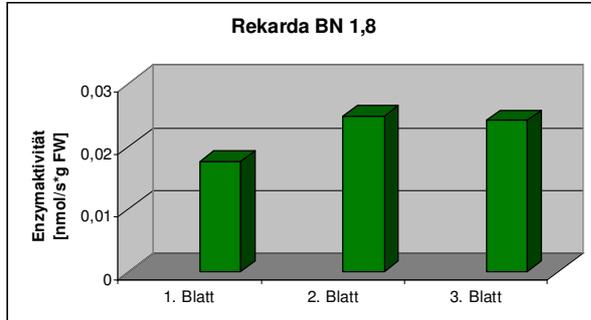


Abb. 2.15: Phenylalaninammoniumlyase (PAL)

Chalconsynthese (CHS)/Chalconisomerase (CHI)

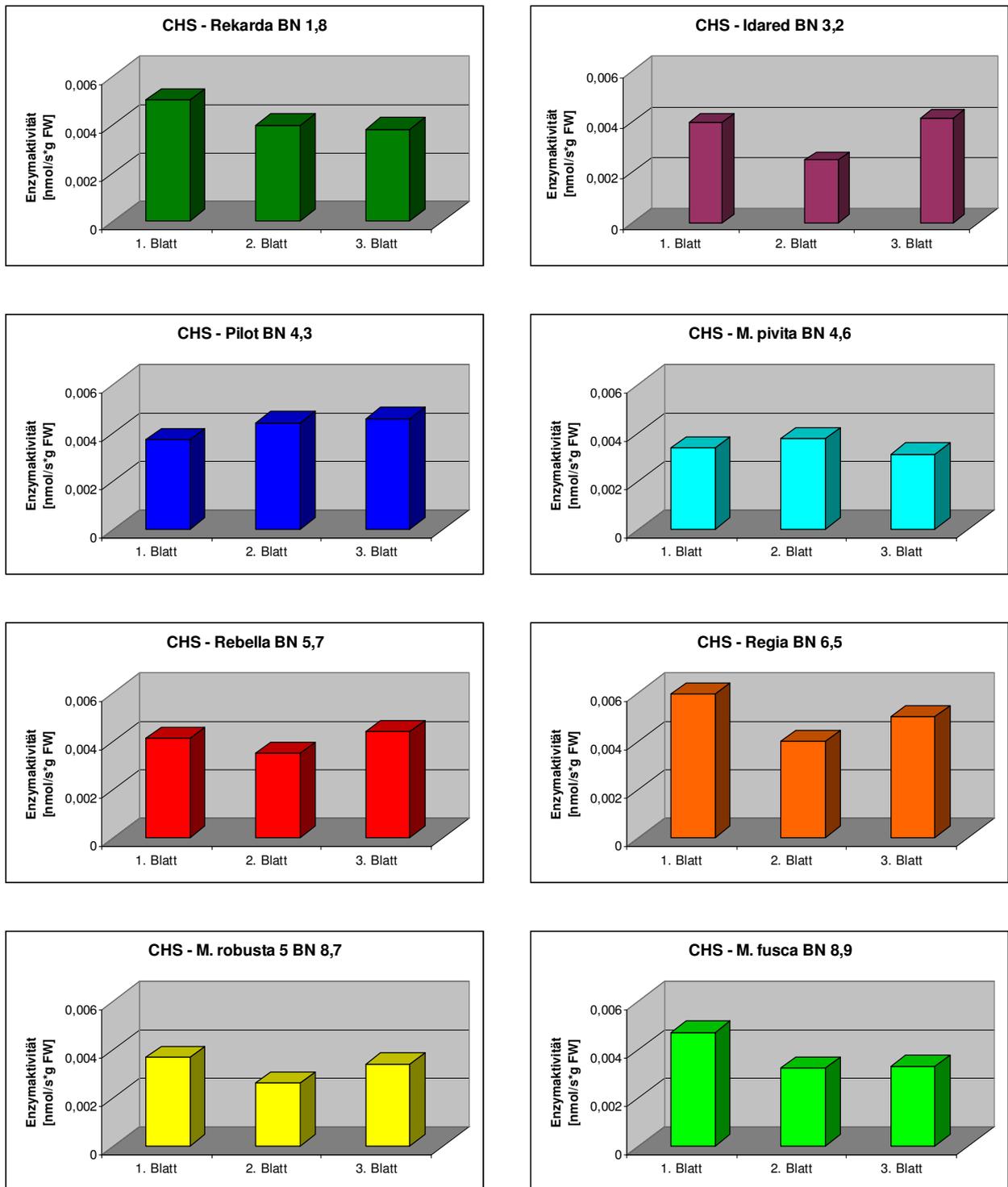


Abb. 2.16: Chalconsynthese (CHS)/Chalconisomerase (CHI)

Flavanon 3-hydroxylase (FHT)

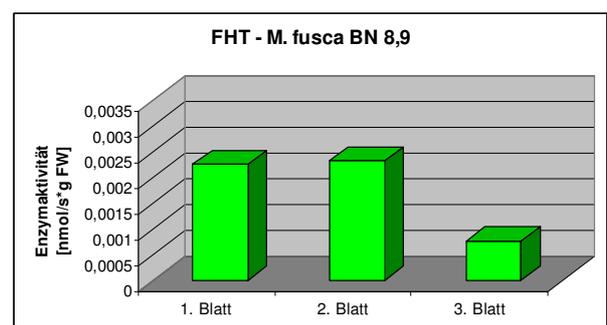
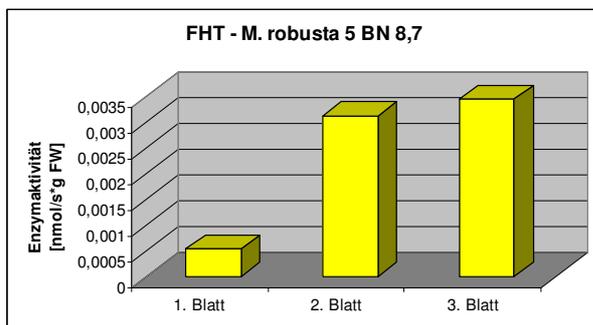
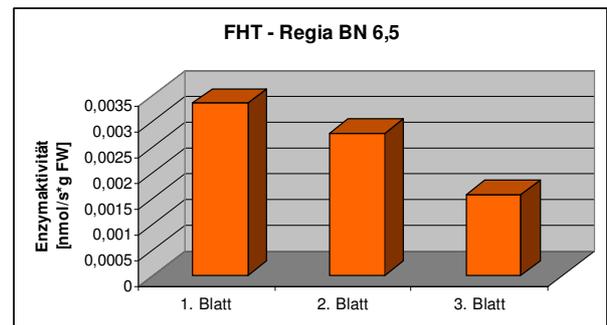
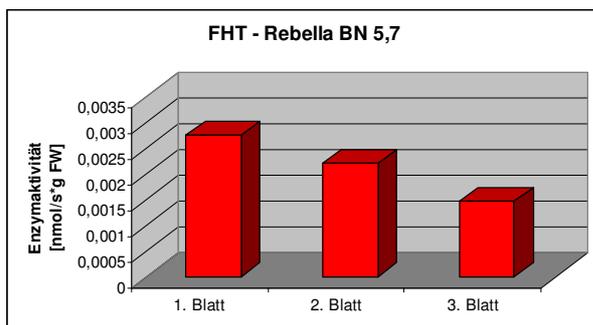
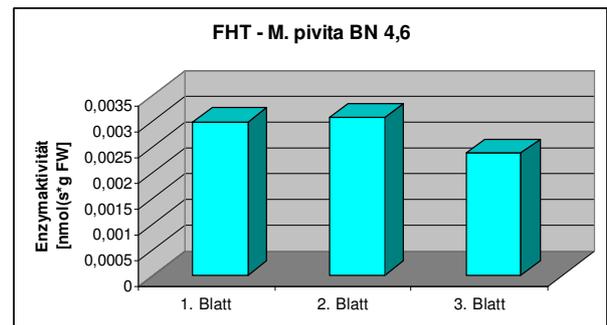
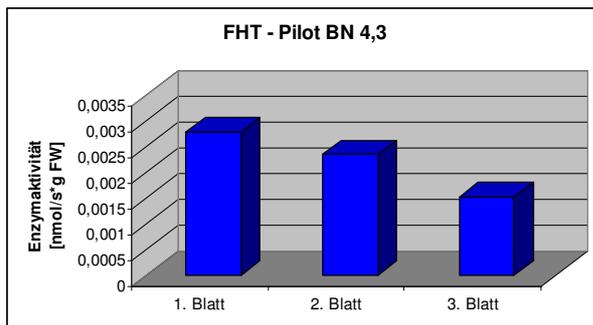
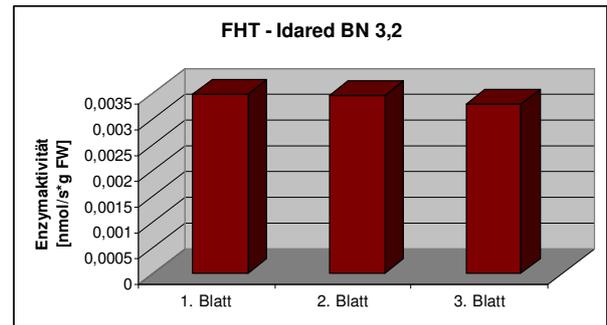
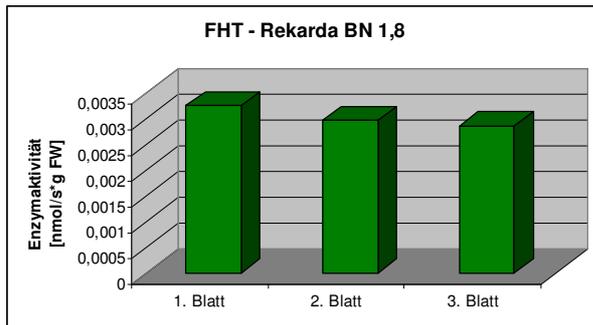


Abb. 2.17: Flavanon 3-hydroxylase (FHT)

Dihydroflavonol 4 -reduktase (DFR)

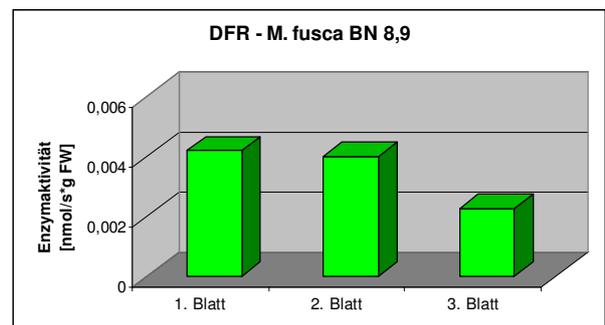
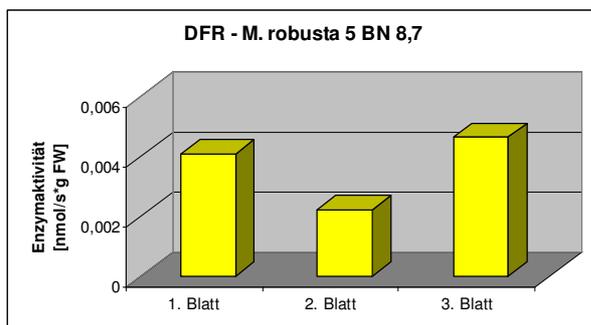
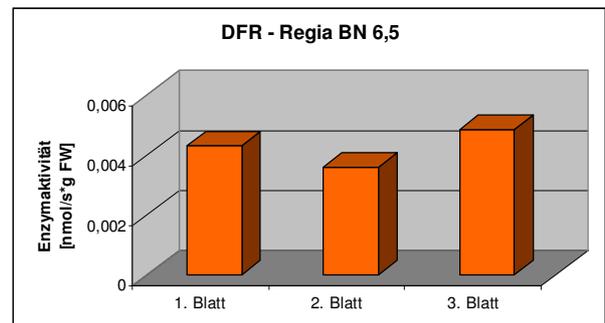
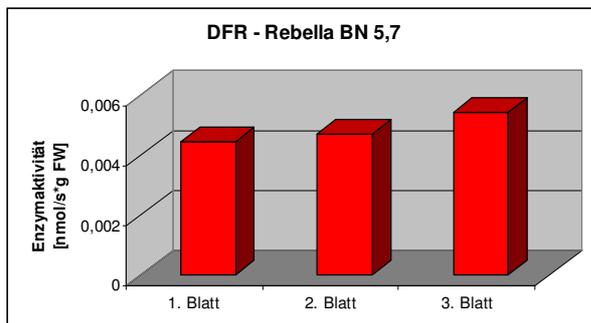
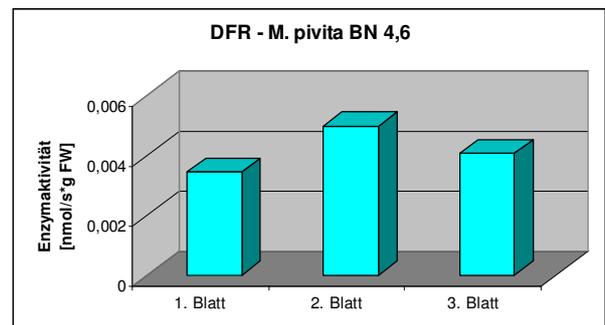
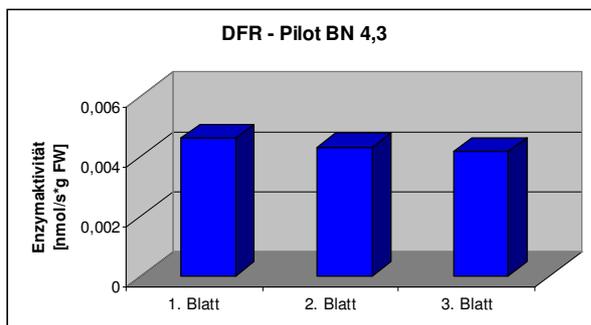
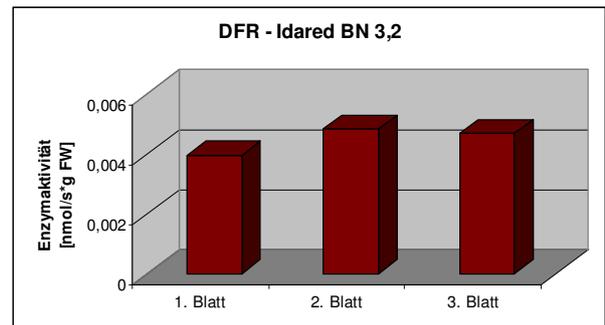
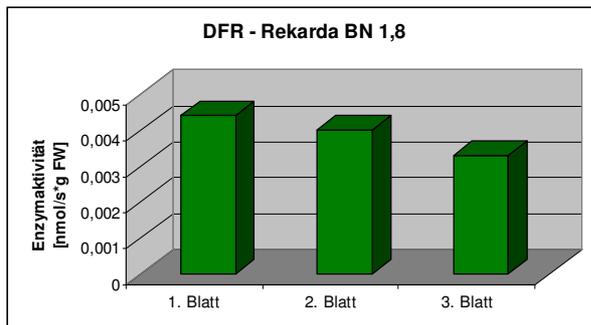


Abb. 2.18: Dihydroflavonol 4-reduktase (DFR)

Flavonolsynthese (FLS)

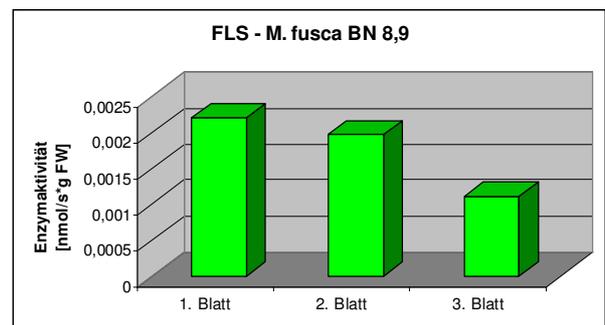
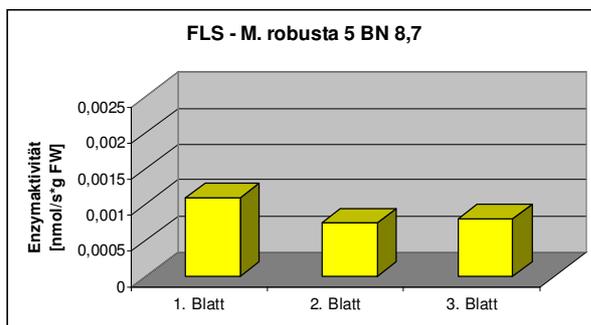
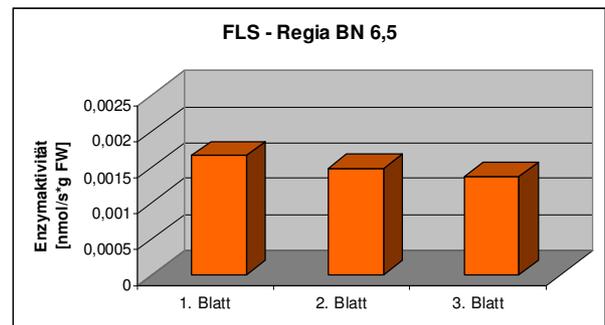
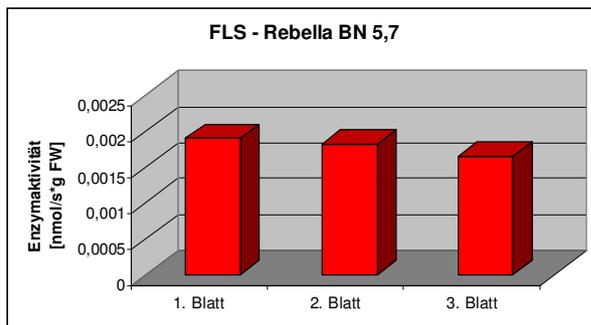
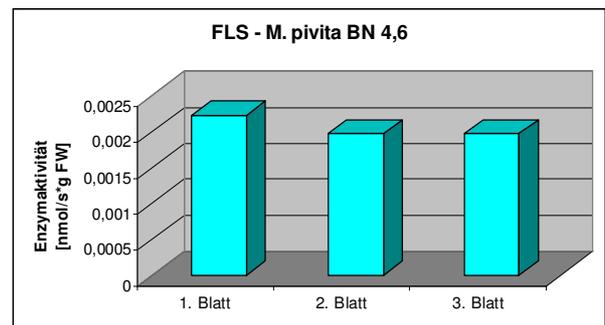
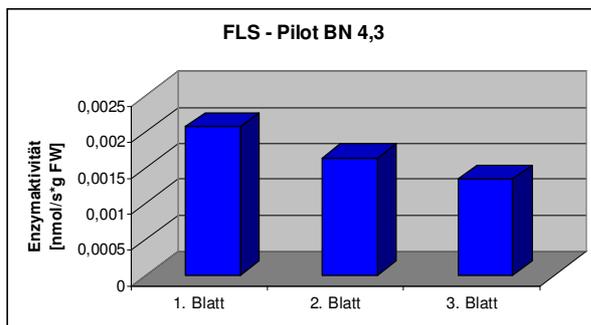
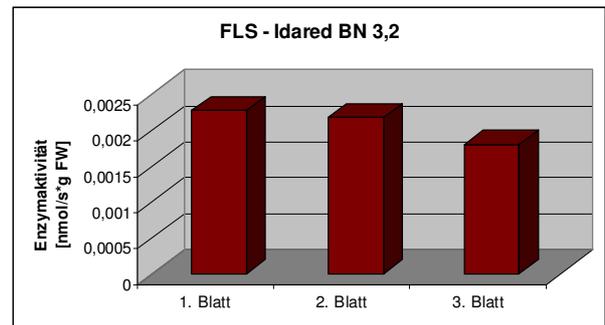
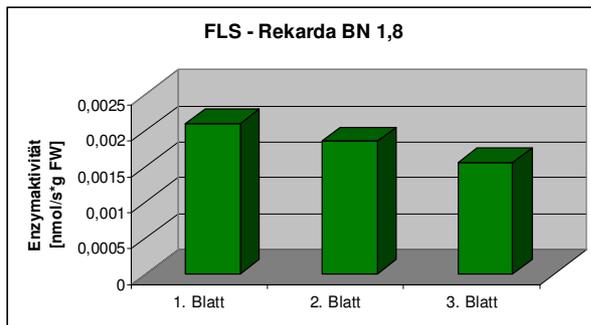


Abb. 2.19: Flavonolsynthese (FLS)

Flavonoid 3-O-glucosyltransferase (F3GT)

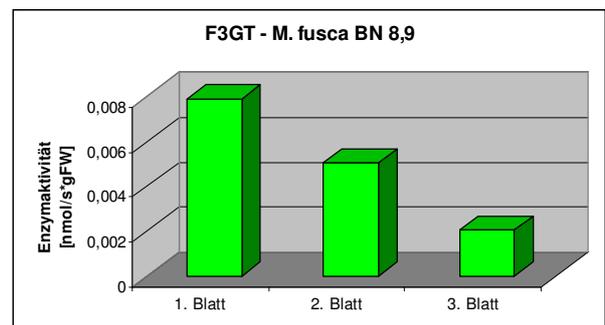
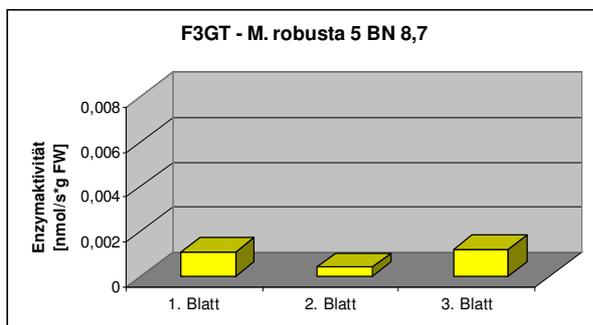
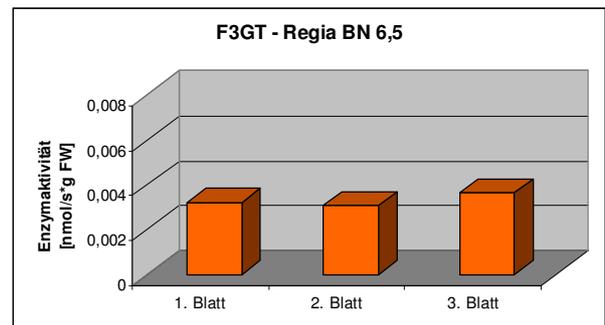
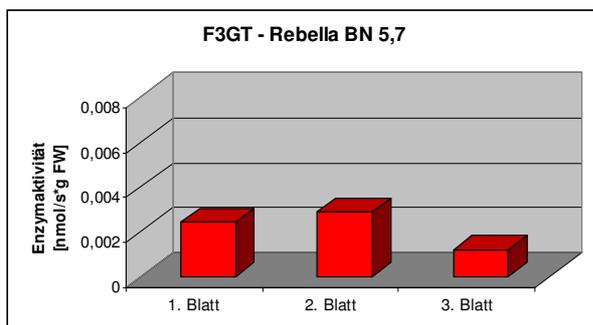
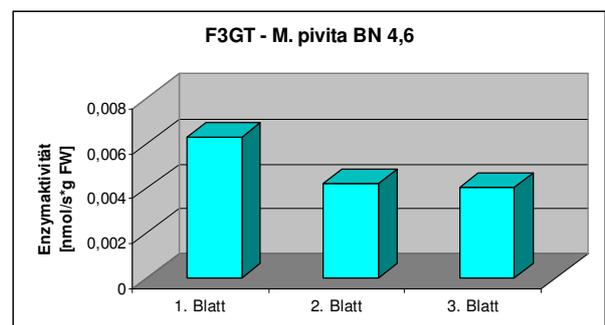
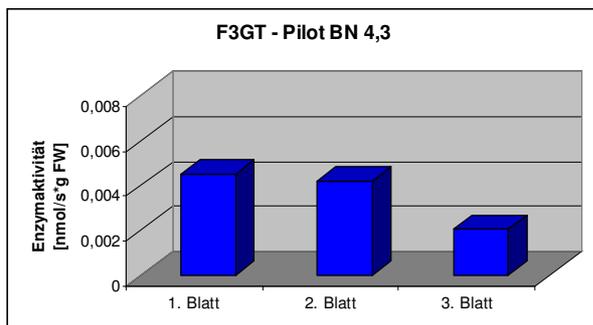
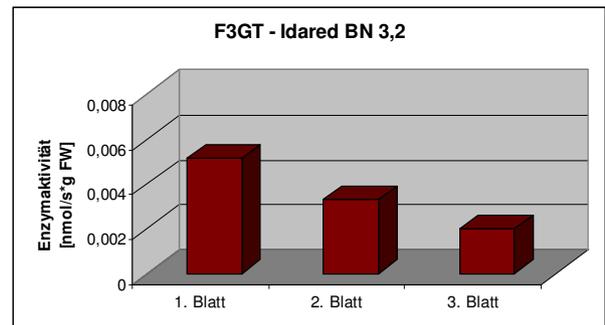
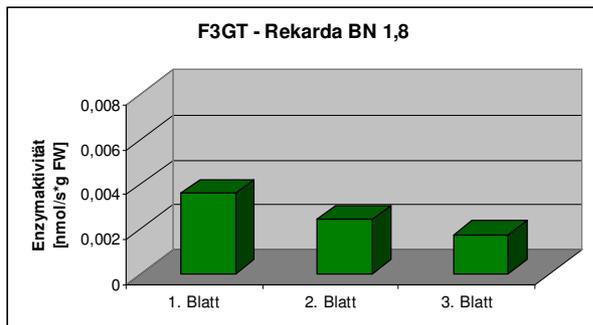


Abb. 2.20: Flavonoid 3-O-glucosyltransferase (F3GT)

Dihydrochalcon 2'-O-glucosyltransferase (DHC2'GT)

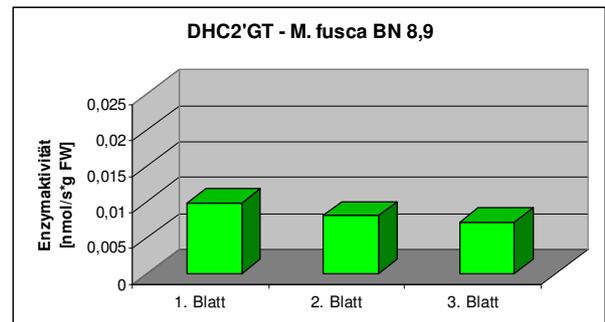
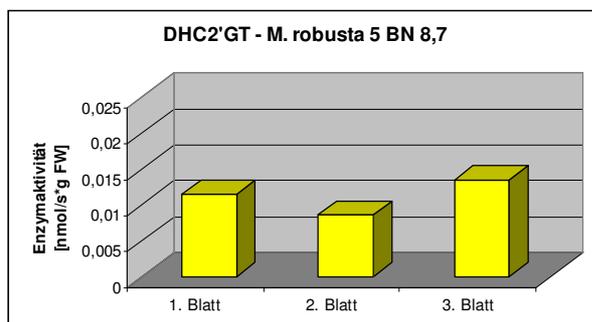
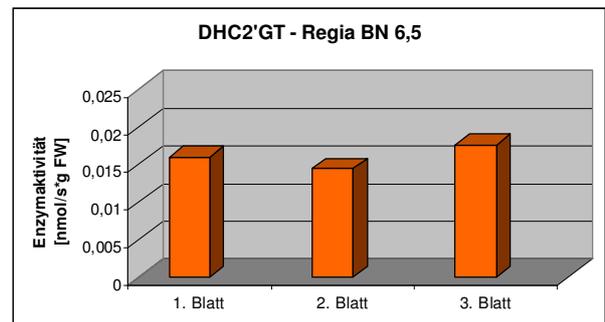
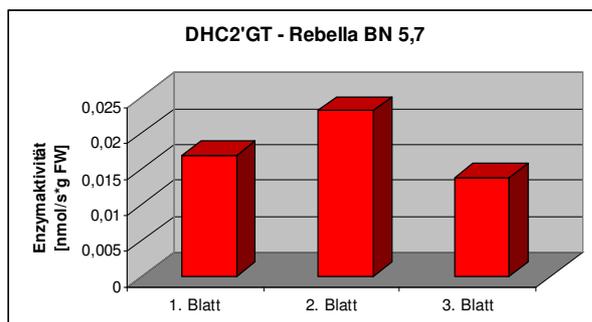
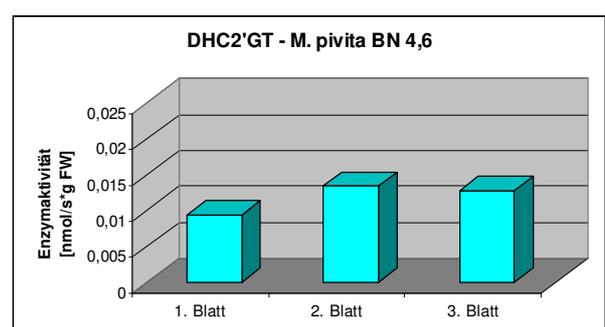
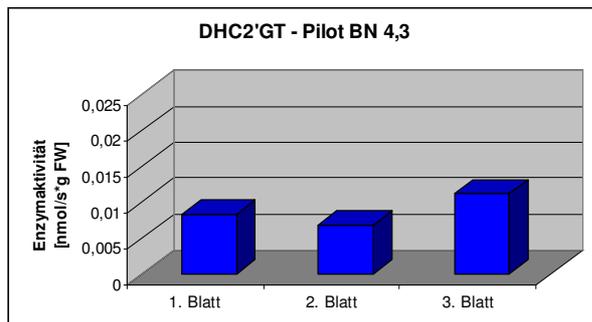
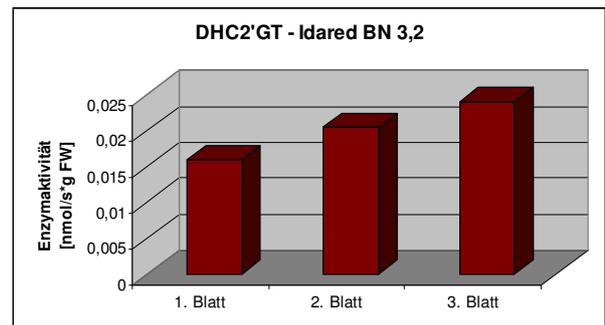
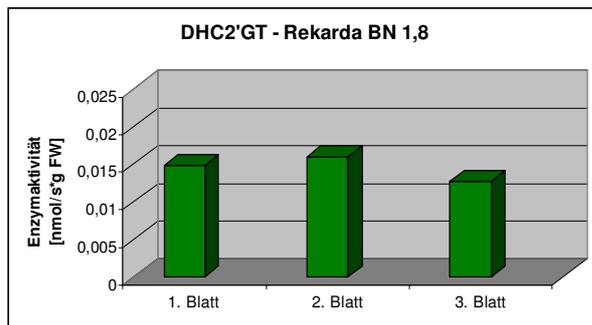


Abb. 2.21: Dihydrochalcon 2'-O-glucosyltransferase (DHC2'GT)

Bei den enzymatischen Untersuchungen der unterschiedlich anfälligen Apfelsorten bzw. Naturformen fällt auf, dass die PAL-Aktivität bei allen untersuchten Individuen sehr ähnlich ist. Zwar ist im 1. Blatt die PAL-Aktivität der anfälligen Sorten wesentlich geringer als bei den resistenteren Linien, aber auch die moderat anfällige Sorte Rebella (BN 5,7) weist im 1. Blatt eine vergleichbar geringe PAL-Aktivität auf wie die anfälligen Sorten Rekada (BN 1,8) und Idared (BN 3,2).

Auch die Chalconsynthase (CHS)-/Chalconisomerase (CHI) - Aktivitäten unterscheiden sich nicht wesentlich. So konnte in den Blättern der resistenten Naturform *M. robusta* 5 geringere CHS/CHI – Aktivitäten nachgewiesen werden als bei den anfälligeren Linien. Dasselbe gilt für die Flavanon 3-hydroxylase (FHT). Generell kann gesagt werden, dass die FHT sehr hohe Umsatzraten aufweist. Die höchsten Werte der FHT kommt in den Blättern der beiden anfälligsten Sorten vor. Interessant ist, dass es Sorten gibt, bei denen die FHT-Aktivität mit zunehmenden Blattalter nahezu konstant bleibt (Rekada und Idared). Bei den meisten Linien, nimmt die FHT-Aktivität mit zunehmenden Blattalter deutlich ab und es gibt Linien bei denen die FHT-Aktivität mit zunehmenden Blattalter zunimmt (z. B. *M. robusta* 5).

Die Dihydroflavonol 4-reduktase (DFR) zeigt bei den untersuchten Linien keine großen Unterschiede.

Anders verhält es sich bei der Flavonolsynthese (FLS). Die anfälligen Sorten Rekada (BN 1,8) und Idared (BN 3,2) weisen eine sehr hohe FLS-Aktivitäten in ihren Blättern auf. Ebenso ist die FLS-Aktivität bei *M. pivita* (BN 4,6) sehr hoch. Die beiden bereits wesentlich weniger anfälligen Sorten Rebella (BN 5,7) und Regia (BN 6,5) zeigen hingegen geringere FLS-Aktivität. Die resistente Naturform *M. robusta* 5 (BN 8,7) weist in allen Blattstadien die geringste Enzymaktivität auf. *M. fusca* (BN 8,9) weist zwar in den beiden jüngsten Blättern eine hohe FLS-Aktivität auf, die aber mit zunehmenden Blattalter rasch abnimmt, sodass im 3. Blatt nur mehr eine sehr geringe Enzymaktivität nachgewiesen werden konnte.

Dieser Befund, dass die FLS-Aktivität mit der Resistenz korreliert, lässt sich mit der Biosynthese der Flavan 3-ole erklären. Sowohl die Flavonolsynthese, als auch die Dihydroflavonol 4-reduktase konkurrieren um die gemeinsamen Vorstufen, die

Dihydroflavonole. Eine hohe FLS-Aktivität führt dazu, dass ein relativ großer Prozentsatz der gebildeten Dihydroflavonole zu den entsprechenden Flavonolen umgesetzt wird und der Dihydroflavonol 4-reduktase daher nur mehr eine kleine Menge an Dihydroflavolen als Substrat zur Verfügung steht. Ist die Aktivität der Flavonolsynthase jedoch gering, so stehen der Dihydroflavonol 4-reduktase ausreichend große Mengen an Dihydroflavonolen als Substrat zur Verfügung und es können in weiterer Folge größere Mengen an Flavan 3-olen gebildet werden.

Die Flavonoid 3-O-glucosyltransferase (F3GT) konkurriert mit der Anthocyanidin-reduktase (ANR) um die gemeinsamen Substrate, die Anthocyanidine. Eine hohe F3GT-Aktivität führt beim Apfel dazu, dass große Mengen an Cyanidin 3-O-glucosid gebildet werden und dass der ANR nur geringe Mengen an Cyanidin zur Verfügung stehen. Daher bilden sich nur geringe Mengen an Epicatechin und entsprechend geringe Mengen an Proanthocyanidinen. Ist die F3GT-Aktivität jedoch gering, so stehen der ANR große Mengen an Cyanidin als Substrat zur Verfügung und es werden entsprechend große Mengen an Epicatechin und Proanthocyanidinen gebildet. Tatsächlich sieht man, dass die Sorte Pilot (BN 4,3) und die Naturform *M. pivita* (BN 4,6) eine wesentlich höhere F3GT-Aktivität in allen drei Blattstadien aufweist als die widerstandsfähigeren Sorten Rebella (BN 5,7) und Regia (BN 6,5). Die resistente Naturform *M. robusta* 5 besitzt die geringsten F3GT-Aktivitäten. Die noch resistenteren Naturform *M. fusca* (BN 8,9) verhält sich wie bei der FLS-Aktivität anders. Sie zeigt im 1. und 2. Blatt sehr hohe F3GT-Aktivitäten. Mit zunehmenden Blattalter kommt es zu einem raschen Abfall der Aktivität der F3GT, sodass im 3. Blatt nur mehr eine extrem geringe Enzymaktivität gemessen werden konnte.

Wie in diesem Bericht bereits ausgeführt wurde, dürfte der für die Glucosylierung des Dihydrochalcon Phloretin verantwortlichen Dihydrochalcon 2'-O-glucosyltransferase (DHC2'GT) in Zusammenhang mit der Widerstandskraft eine außerordentliche Bedeutung zukommen. Durch eine hohe Aktivität der DHC2'GT ist der Pool an freiem im Cytosol vorliegenden Phloretin gering. Daher kann die im Cytosol vorkommende Peroxidase nur eine geringe Menge an o-Chinon bilden. Ist die DHC2'GT jedoch gering, so ist der Pool an Phloretin groß und die Konzentration an o-Chinonen nimmt infolge der von den Peroxidase-Isoenzymen katalysierten Oxidation zu. Betrachtet man die Ergebnisse der enzymatischen Untersuchungen, so sieht man, dass die

beiden anfälligsten Sorten, Rekarda (BN 1,8) und Idared (BN 3,2) sehr hohe DHC2'GT-Aktivitäten in allen Blattstadien aufweisen. Deutlich geringere DHC2'GT-Aktivitäten zeigt die Sorte Pilot (BN 4,3) und die Naturform *M. pivita* (BN 4,6). Sehr geringe Enzymaktivitäten besitzen die resistenten Naturformen *M. robusta 5* (BN 8,7) und *M. fusca* (BN 8,9). Erstaunlich hohe DHC2'GT-Aktivitäten kommen in den Blättern von Rebella (BN 5,7) und Regia (BN 6,5) vor.

Fasst man die Ergebnisse zusammen, so ergibt sich folgendes Bild:

Sorte	Boniturnote	FLS	F3GT	DHC2'GT
Rekarda	1,8	+++	++	+++
Idared	3,2	+++	++	+++
Pilot	4,3	++	+++	+
<i>M. pivita</i>	4,6	+++	+++	+
Rebella	5,7	++	++	+++
Regia	6,5	++	++	+++
<i>M. robusta 5</i>	8,7	+	+	+
<i>M. fusca</i>	8,9	++	++	+

+ geringe Enzymaktivität, ++ mittlere Enzymaktivität, +++ hohe Enzymaktivität

Tab. 2.1: Zusammenfassung der FLS-, F3GT- und DHC2'GT - Enzymaktivitäten

Wie man aus der Tabelle 2.1 erkennen kann, besitzt Rekarda, die anfälligste Sorte der Untersuchungen bei allen drei getesteten Enzymaktivitäten die höchsten Enzymaktivitäten. Auch Idared besitzt bis auf die FLS-Aktivität, die allerdings immer noch hoch ist, sehr hohe Enzymaktivitäten. Pilot und *M. pivita* weisen sehr hohe FLS- und F3GT-Aktivitäten auf, jedoch die DHC2'GT-Aktivitäten sind in den Blättern sehr gering. Die Sorten Rebella und Regia weisen eine etwas verringerte FLS- und F3GT-Aktivitäten auf besitzen jedoch eine sehr hohe DHC2'GT-Aktivität. Alle drei untersuchten Enzyme weisen bei der resistenten Naturform *M. robusta 5* nur eine sehr geringe Enzymaktivität auf. Etwas komplizierter ist es bei der ebenfalls resistenten Naturform *M. fusca*. Die DHC2'GT-Aktivität ist bei dieser Pflanze sehr gering. Bei den beiden anderen Enzymen nehmen die im 1. Blatt sehr hohen Enzymaktivitäten sehr rasch ab, sodass im 3. Blatt nur mehr eine sehr geringe FLS- und F3GT-Aktivität

nachgewiesen werden kann. Es dürfte daher der entwicklungsbedingte rasche Abfall der FLS- und F3GT-Aktivität mit der geringen DHC2'-Aktivität für die Resistenz verantwortlich sein.

Zusammenfassend kann daher gesagt werden, dass nicht die Stärke der Enzymaktivität eines der drei Schlüsselenzyme für die Widerstandskraft alleine verantwortlich ist, sondern dass das Zusammenspiel aller drei untersuchten Enzyme wesentlich für das Resistenzverhalten ist. Darüber hinaus sind andere Resistenzmechanismen nicht auszuschließen.

2.3 Versuch 2006

Der Infektionsversuch 2006 unterschied sich vom Infektionsversuch 2005 in der Art der Infektion. Bei diesem Versuch wurde die Triebspitze mit einer Schere, die vorher in eine *E. amylovora*-Suspension eingetaucht wurde, angeschnitten. Dadurch erfolgte die Infektion an der äußersten Spitze des Triebes und die Bakterien wanderten im weiteren Krankheitsverlauf innerhalb des Triebes nach unten. Auffällig war, dass die Krankheitssymptome erst wesentlich später optisch erkennbar waren. Musste aufgrund der auftretenden Nekrose bei der empfindlichen Sorte „Idared“ beim Infektionsversuch 2005 der Versuch bereits drei Tage nach erfolgter Infektion abgebrochen werden, so konnten beim Infektionsversuch 2006 die ersten Krankheitssymptome erst nach ca. zehn Tagen beobachtet werden.

2.3.1 Molekularbiologische Untersuchungen

Phenylalaninammoniumlyase (PAL)

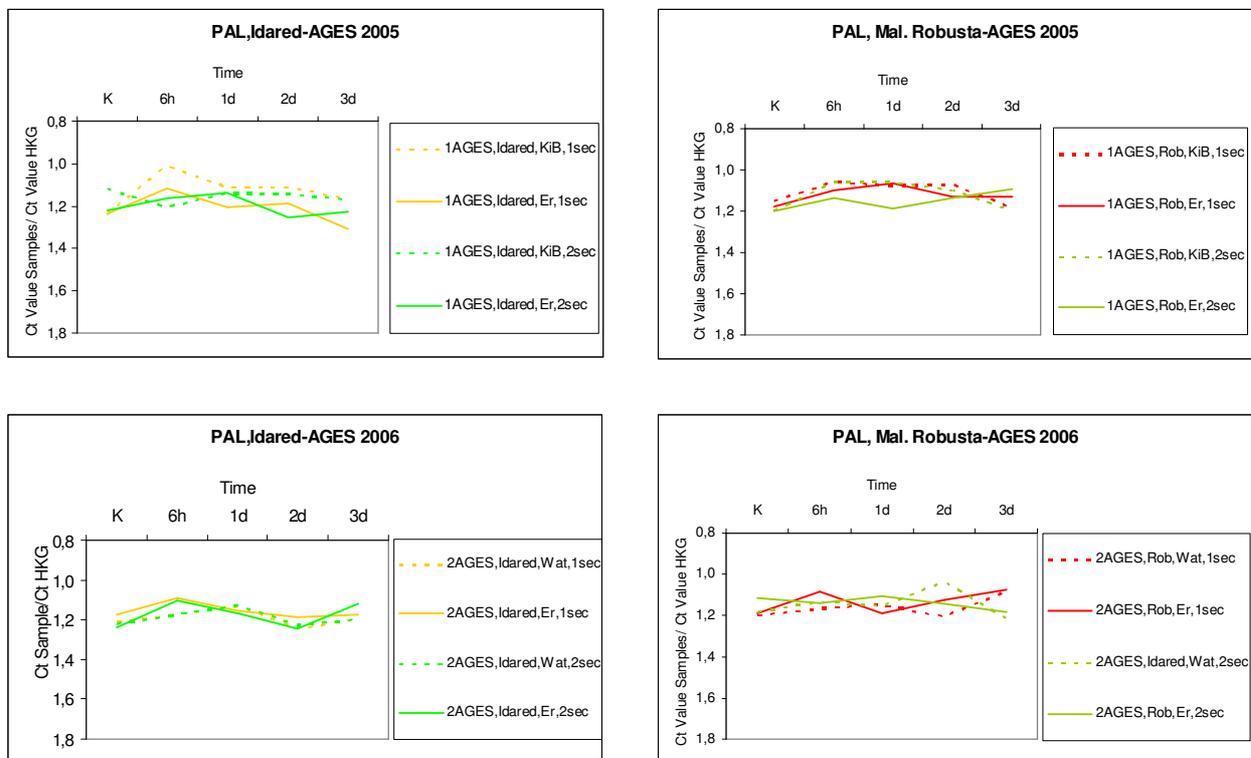


Abb. 2.22: Phenylalaninammoniumlyase (PAL) - Expression

Die Genexpression der PAL (Abb. 2.22) im Versuch AGES 2006 zeigt im Gegensatz zum Versuch 2005 nur geringe Unterschiede zwischen Idared und *M. robusta*.

Die Ergebnisse der PAL-Expression in Idared, (1. und 2. Blatt) AGES 2005 zeigen bei der Kontrollvariante einen Expressionshöhepunkt zum Zeitpunkt 6 Std. Bei Ea inokulierten Pflanzen konnte hingegen ein Rückgang festgestellt wurde. Dies deutet auf eine Hemmung der Genexpression durch Ea hin. Diese Beobachtung wurde bereits von Venisse *et al.* (2002) beschrieben, wo ebenfalls eine spezifische Hemmung einzelner Gene des Phenylpropanoid - Biosynthesewegs beobachtet werden konnte.

Ein ähnlicher Verlauf wurde auch beim 1. und 2. Blatt 2006 beobachtet, wobei hier vermutlich die Infektion langsamer verläuft als im Jahr 2005. Beim 1. und 2. Blatt 2006 wird der Expressionshöhepunkt bereits 6 Std. nach der Inokulation erreicht, ähnlich verläuft dies auch beim 3. Blatt 2006.

Bei Idared (3. Blatt, AGES 2005), wurde die Expression der PAL im Vergleich zur Kontrolle nach dem 1. Tag gehemmt.

Bei *M. robusta*, (1. und 2. Blatt) AGES 2005 kann ein ähnlicher Verlauf wie bei der Kontrolle beobachtet werden, wobei die Expression beim 3. Blatt 2005 nach dem 1.Tag gehemmt wird und dann wieder kontinuierlich ansteigt. Beim 3. Blatt 2006 verläuft die Genexpression ähnlich wie die Kontrolle, mit Ausnahme vom 2. Tag, wo eine Depression im Vergleich zur Kontrolle festgestellt wurde.

Chalconsynthase (CHS)

Die Expressionsuntersuchung (Abb. 2.23) zeigt, dass es im Versuchsjahr 2005 zu einer Downregulierung der CHS-Genexpression bei Idared kommt. Dieser Rückgang fällt im Versuch AGES 2006 nicht mehr so deutlich aus. Bei *M. robusta* zeigen sich wenige Veränderungen durch die Ea Infektion.

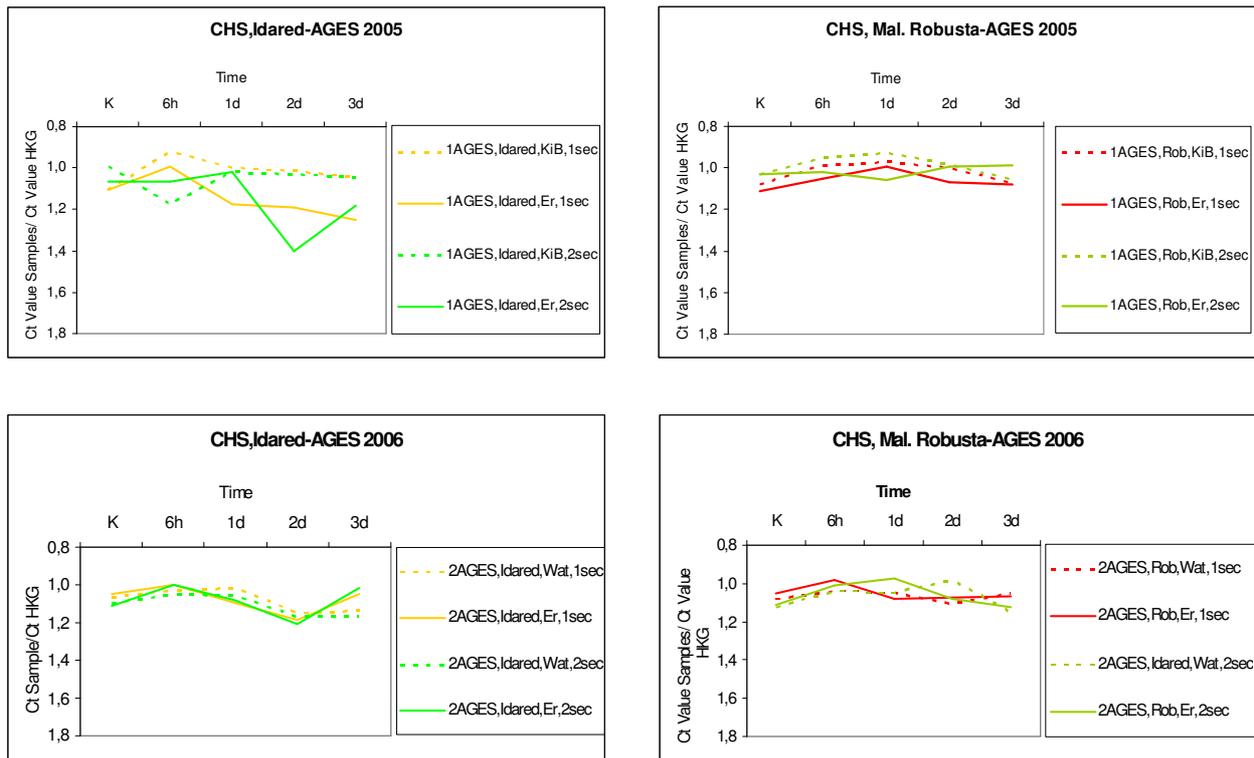


Abb. 2.23: Chalconsynthase (CHS) - Expression

Idared (1. und 2. Blatt, 2005): CHS-Genexpression - Hemmung im Vergleich zur Kontrolle, am 1.Tag kommt es bei der Kontrolle zu einem leichten Anstieg, der aber danach wieder abnimmt.

Idared (3. Blatt 2005): Expression erreicht den Höhepunkt am 1. Tag, dann stark rückläufig und ab 2. Tag wieder steigende Tendenz.

1. und 2. Blatt 2006 zeigen wenig Unterschiede und verlaufen ähnlich, aber anders als beim Versuch 2005.

M. robusta (1. und 2. Blatt) 2005: Zunahme am 1. Tag, jedoch noch immer geringer als bei der Kontrolle.

3. Blatt: ab dem 1. Tag signifikanter Anstieg der Genexpression der CHS.

Im Jahr 2006 verläuft die Genexpression anders, jedoch gibt es nur geringe Unterschiede zwischen Idared und *M. robusta*.

1. und 2. Blatt: Höhepunkt 6. Stunden; 3. Blatt: 1.Tag

Chalconisomerase (CHI)

Die Expression der CHI weist bei Idared große Unterschiede zwischen dem 1. und 2. Blatt und dem 3. Blatt nach der Ea Inokulation auf (Abb. 2.24). Hier kommt es zu einem raschen Anstieg (6 h) in beiden Versuchsjahren beim 1. und 2. Blatt. Bei *M. robusta* können nur wenige Unterschiede sowohl zwischen dem 1. und 2. Blatt und dem 3. Blatt, als auch zwischen der Ea und Kontrollbehandlung als auch zwischen den beiden Versuchsjahren festgestellt werden.

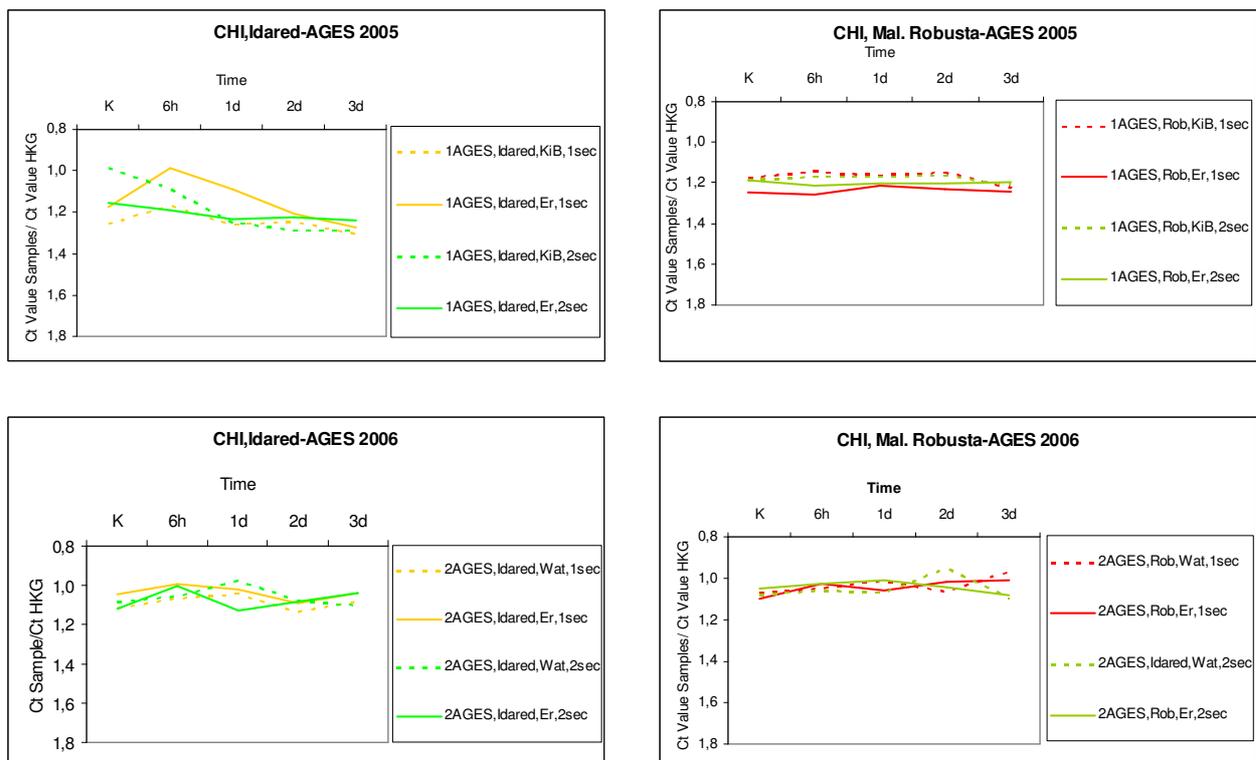


Abb. 2.24: Chalconisomerase (CHI) - Expression

Idared (1. und 2. Blatt, 2005): stark steigend bis 6 h, dann kontinuierliche Abnahme.

Idared (3. Blatt, 2005): wurde bis 1.Tag von Ea gehemmt.

M. robusta (1. und 2. Blatt) und (3. Blatt) 2005 sowie auch (1. und 2. Blatt) und (3. Blatt) 2006 zeigen keine auffällige Veränderungen. 1. und 2. Blatt 2006 zeigten leicht steigende Tendenzen, aber auch einen ähnlichen Verlauf wie bei der Kontrolle.

Flavanon 3-hydroxylase (FHT)

Die Expression der FHT ist schwierig zu interpretieren, weil es einerseits große Unterschiede zwischen Idared und *M. robusta*, und andererseits auch zwischen den unterschiedlichen Blattstadien gibt (Abb. 2.25).

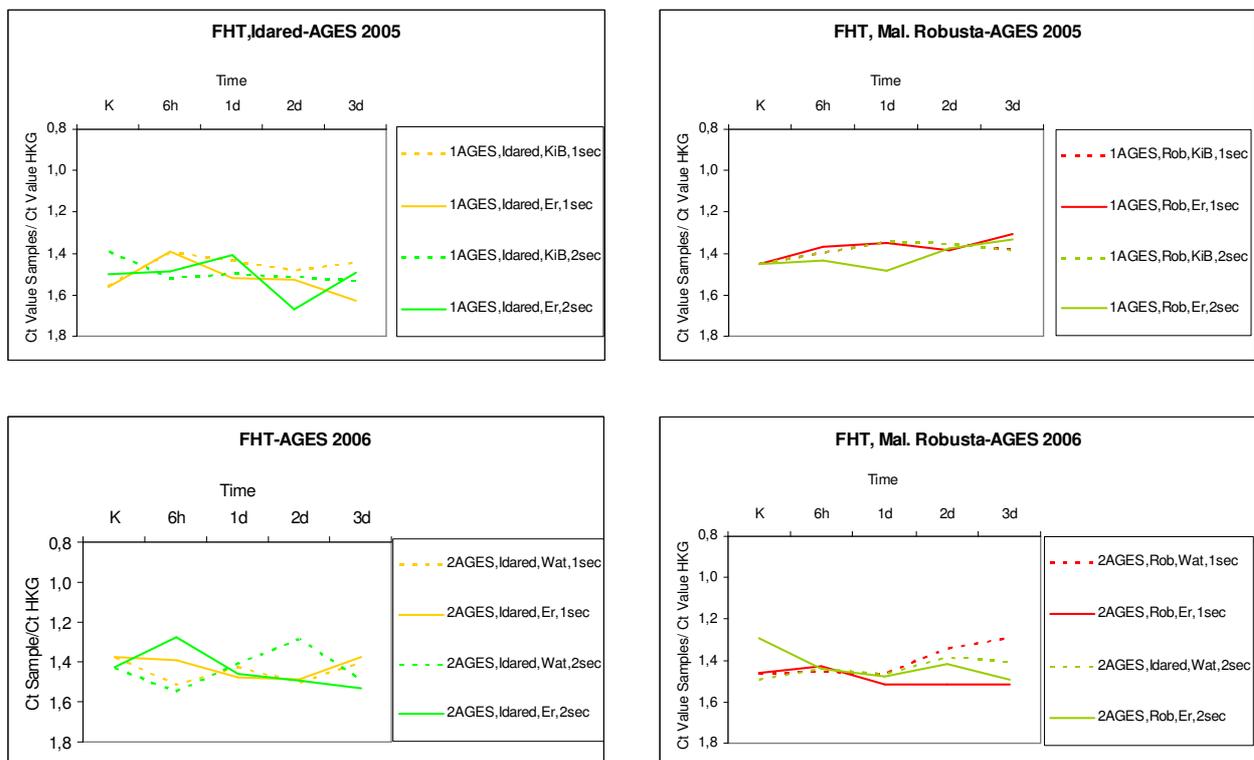


Abb. 2.25: Flavanon 3-hydroxylase (FHT) – Expression

Dihydroflavonol 4-reduktase (DFR)

Bei Idared (1. und 2. Blatt, 2005): Die Expression steigt bis 6 h, danach fällt diese. Bei den Ea inokulierten Pflanzen liegt die Genexpression beider Sektionen (1. und 2. Blatt) und (3. Blatt) 2005 unterhalb der Kontrolle, d. h. die Expression der DFR wurde durch Ea gehemmt.

In beiden Jahren wurde beobachtet, dass die Genexpression beim 1. und 2. Blatt sinkt, aber im 3. Blatt ansteigt. Bei *M. robusta* konnten keine signifikanten Veränderungen der DFR-Expression beobachtet werden.

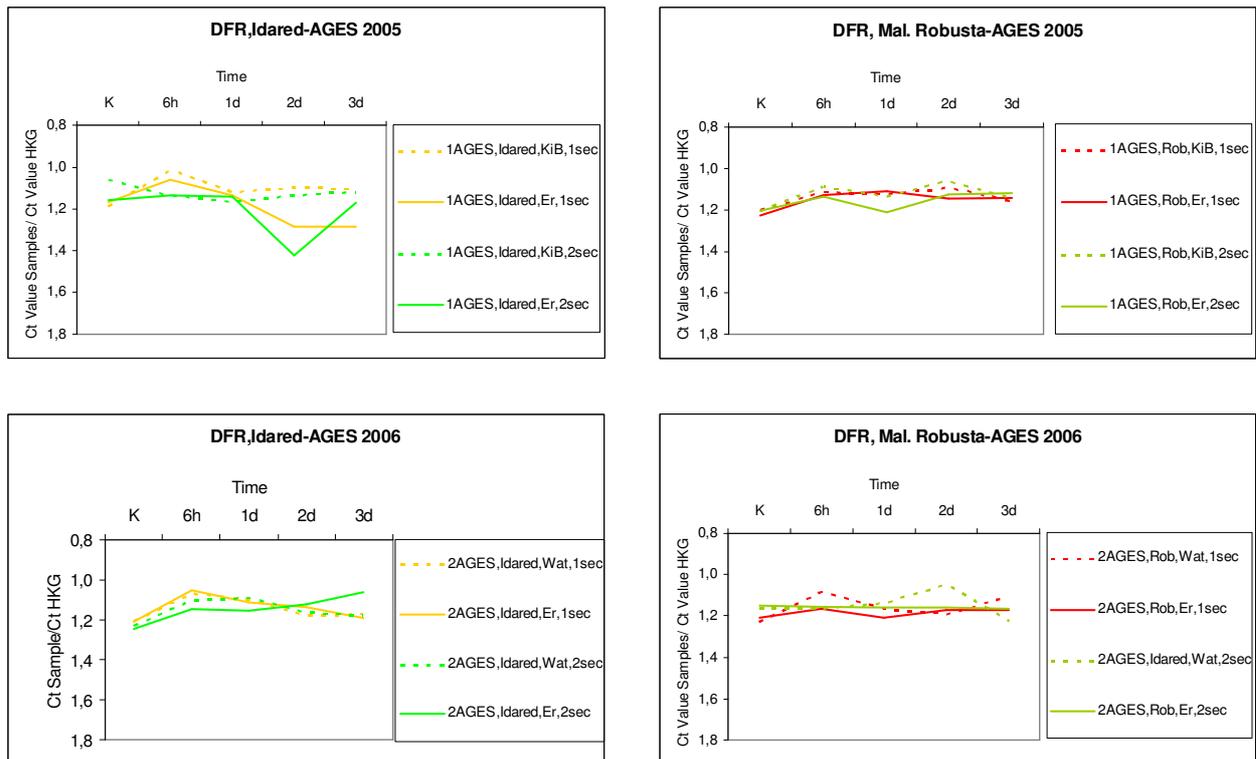


Abb. 2.26: Dihydroflavonol 4-reduktase (DFR) - Expression

Flavonol synthase (FLS)

Bei Idared (1. und 2. Blatt, 2005) kann eine Downregulierung der FLS-Expression, verursacht durch Ea, bereits 6 h und 1 Tag nach Inokulation beobachtet werden. Am 2. Tag steigt die Expression wieder an und bleibt bis zum 3. Tag auf gleichem Niveau. Im Gegensatz dazu weist der Versuch 2006 (1. und 2. Blatt) keine derart markante Veränderungen auf (Abb. 2.27). Das 3. Blatt 2005 erreicht den Expressionshöhepunkt nach 6 Std. und ab dem 1. Tag nimmt dann die Expression kontinuierlich ab. Ähnlich ist der Verlauf beim 3. Blatt 2006, wo die höchste Expression 6 Std. und 1 Tag nach der Inokulation erreicht wurde.

Bei *M. robusta* zeigt das 1. und 2. Blatt 2005 einen ähnlichen Verlauf wie das 3. Blatt desselben Jahres. In Jahr 2006 (1. und 2. Blatt) erreicht die FLS die größte Expression nach 6 Std., wobei das 3. Blatt erst nach dem 1. Tag aufweist. Dies könnte mit der Infektion von oben im Zusammenhang stehen, weil das 1. und 2. Blatt näher zur Inokulationstelle sind.

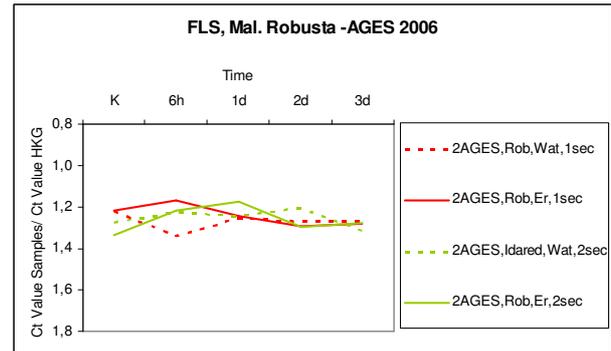
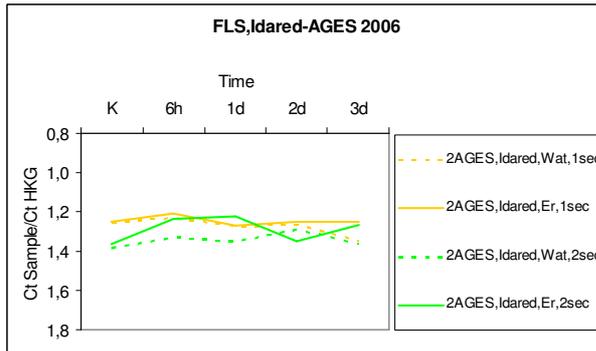
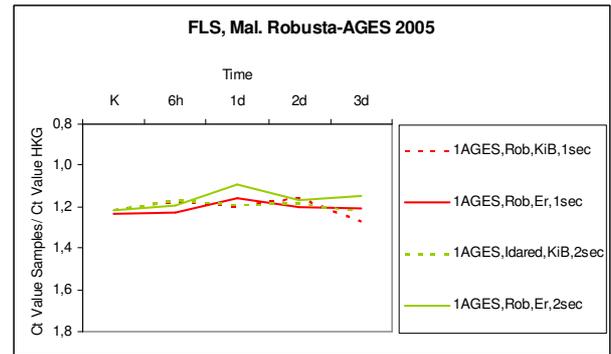
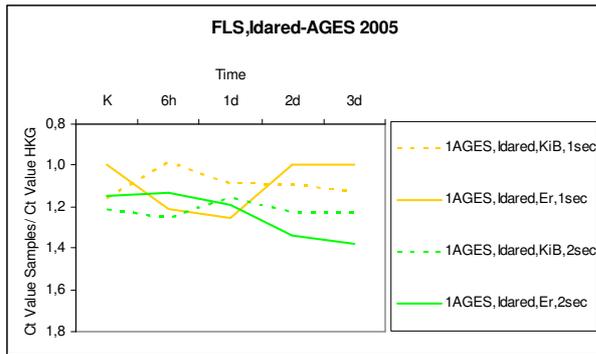


Abb. 2.27: Flavonolsynthase (FLS) - Expression

Anthocyanidinsynthase (ANS)

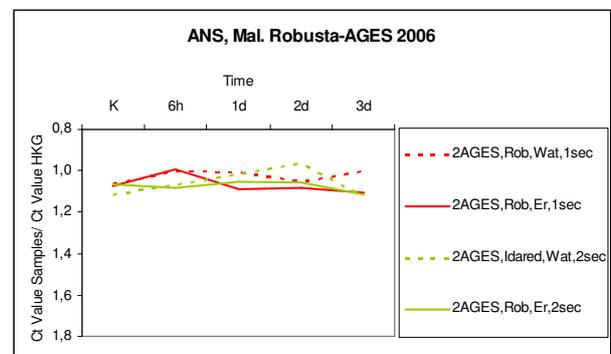
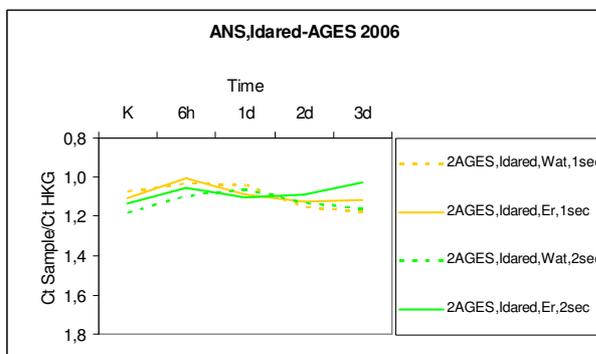
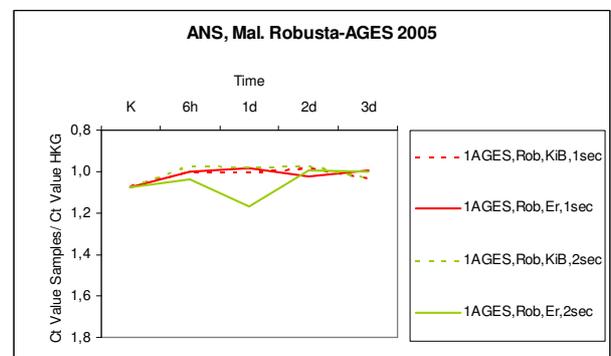
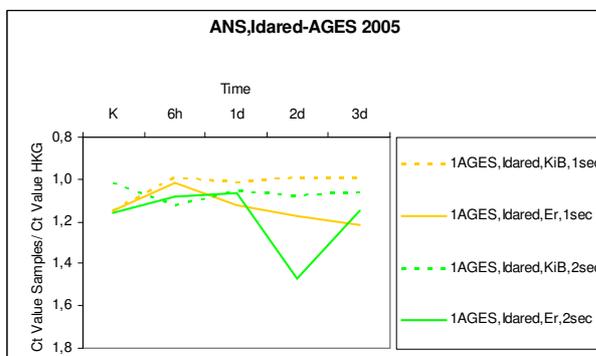


Abb. 2.28: Anthocyanidinsynthase (ANS) - Expression

Die Genexpression der ANS zeigt bei Idared einen Unterschied zwischen dem 1. und 2. Blatt und dem 3. Blatt (Abb. 2.28). In beiden Jahren ist nach 6 h Ea Inokulation die höchste Expression erreicht. Diese fällt dann kontinuierlich ab. Im Versuchsjahr 2005 fällt auf, dass es zu einer starken Downregulierung der inokulierten Varianten, sowohl bei Idared als auch *M. robusta* kommt, aber *M. robusta* reagiert bereits am 1. Tag darauf, Idared hingegen erst am 2. Tag (Abb. 2.28).

Idared, (1. und 2. Blatt) 2005 und 2006: Der Höhepunkt wurde nach 6 Std. nach der Inokulation erreicht, jedoch scheint die ANS-Expression durch Infektion mit Ea gehemmt zu sein, ebenso wie beim 3. Blatt in beiden Jahren.

Bei *M. robusta* bewegt sich alles im Bereich der Kontrolle, außer beim 3. Blatt 2005: 1. Tag, wo die ANS-Expression von Ea gehemmt wurde.

Anthocyanidinreductase (ANR)

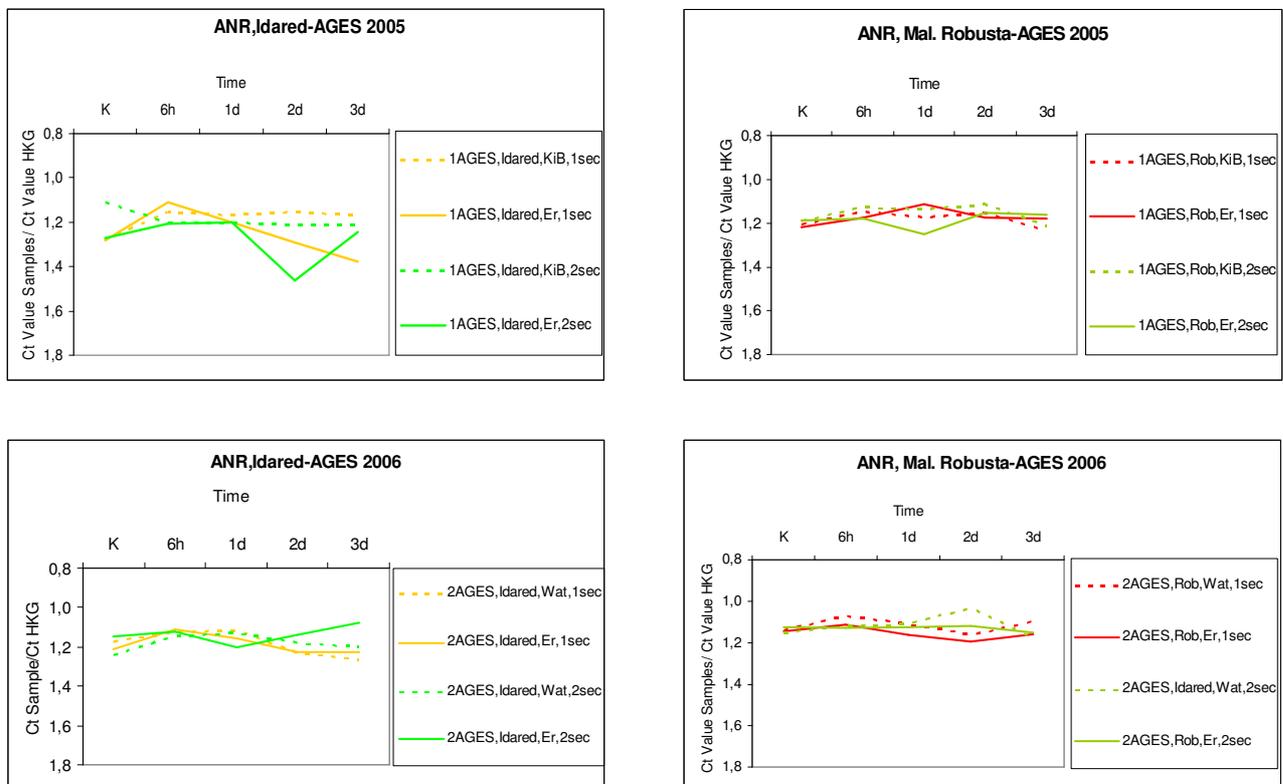


Abb. 2.29: Anthocyanidinreduktase (ANR) - Expression

Die Genexpression der ANS und ANR zeigen eine ähnliche Tendenz.

Flavonoid 3-O-glucosyltransferase (F3GT)

Dieses Gen wird bei Idared im Vergleich zur Kontrolle downreguliert (Abb. 2.30) und wird ebenfalls durch die Ea-Inokulation gehemmt. Bei *M. robusta* zeigen sich nur geringe Unterschiede in der Genexpression und der Verlauf ist relativ konstant.

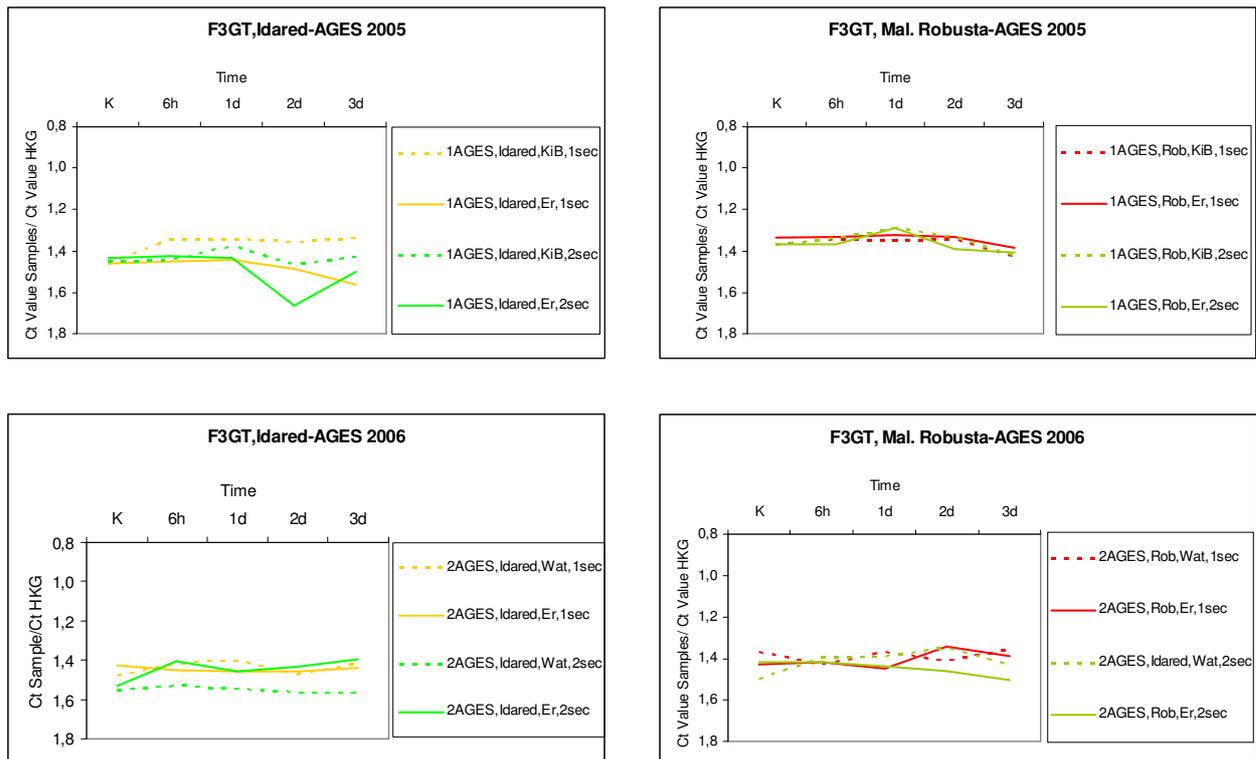


Abb. 2.30: Flavonoid 3-O-glucosyltransferase (F3GT)

Expression bei Idared (1. und 2. Blatt) und (3. Blatt) Jahr 2005: gleiches Niveau bis zum 1. Tag. 1. und 2. Blatt 2005 zeigen einen kontinuierlichen Expressionsabfall, 3. Blatt: nach dem Minimum am 2. Tag steigt die Expression wieder an.

Dihydrochalcon 2'-O-glycosyltransferase (DHC2'GT)

Die Genexpression dieses Gens wurde durch die Ea - Inokulation bei Idared signifikant beeinflusst (Abb. 2.31) und eine Downregulierung konnte beobachtet werden. Obwohl die Ergebnisse der zwei Glashausversuche durch die unterschiedlichen Inokulationsmethoden generell etwas unterschiedlich sind, ist auch bei der Expression dieses Gens eine ähnliche Tendenz der Upregulierung im AGES 2006 - Versuch zu beobachten.

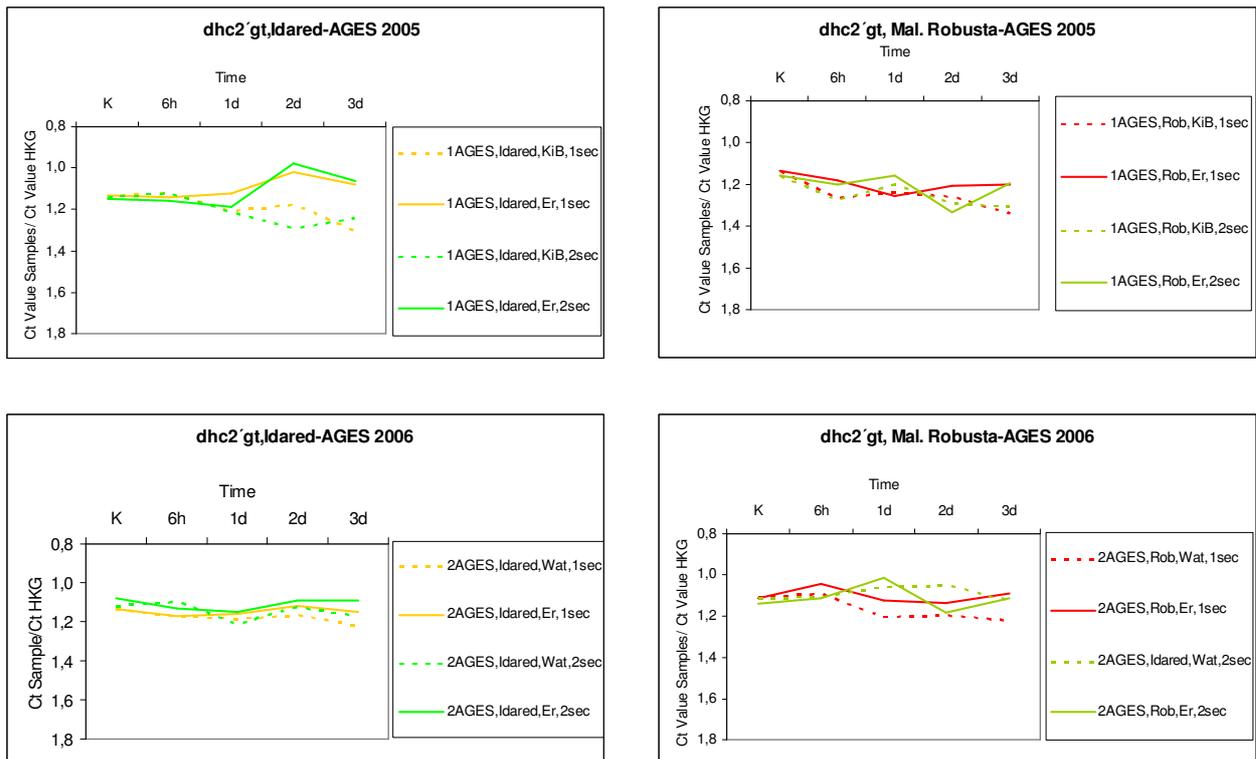


Abb. 2.31: Dihydrochalcon 2'-O-glucosyltransferase (DHC2'GT) – Expression

Idared (1. und 2. Blatt, 2005): die Genexpression steigt nach dem 1. Tag, markanter Einfluss von Ea. Beim 3. Blatt 2005 wurde der gleiche Verlauf beobachtet. 1. und 2. Blatt 2006 zeigt eine leichte Erhöhung nach dem 1. Tag, ähnlich 2005 wurden auch in Jahr 2006 Ähnlichkeiten zwischen dem 1. und 2. Blatt und dem 3. Blatt beobachtet. *M. robusta* zeigt sowohl im Jahr 2005 als auch im Jahr 2006 eine Abnahme am 1. Tag. Eine ähnliche Tendenz in beiden Jahren, mit einem Maximum am 1. Tag wurde beim 3. Blatt beobachtet.

Pathogenesis-related (PR)-protein

Die Ergebnisse der PR-1 Genexpression in Idared zeigen, dass das Pathogen vermutlich nicht erkannt wurde und es daher zu keiner signifikanten Expressionssteigerung kommt (Abb. 2.32). Bei *M. robusta* zeigt die Expression ebenfalls kein eindeutiges Bild, speziell im Jahr 2006 gibt es wenig Unterschiede zur Kontrolle.

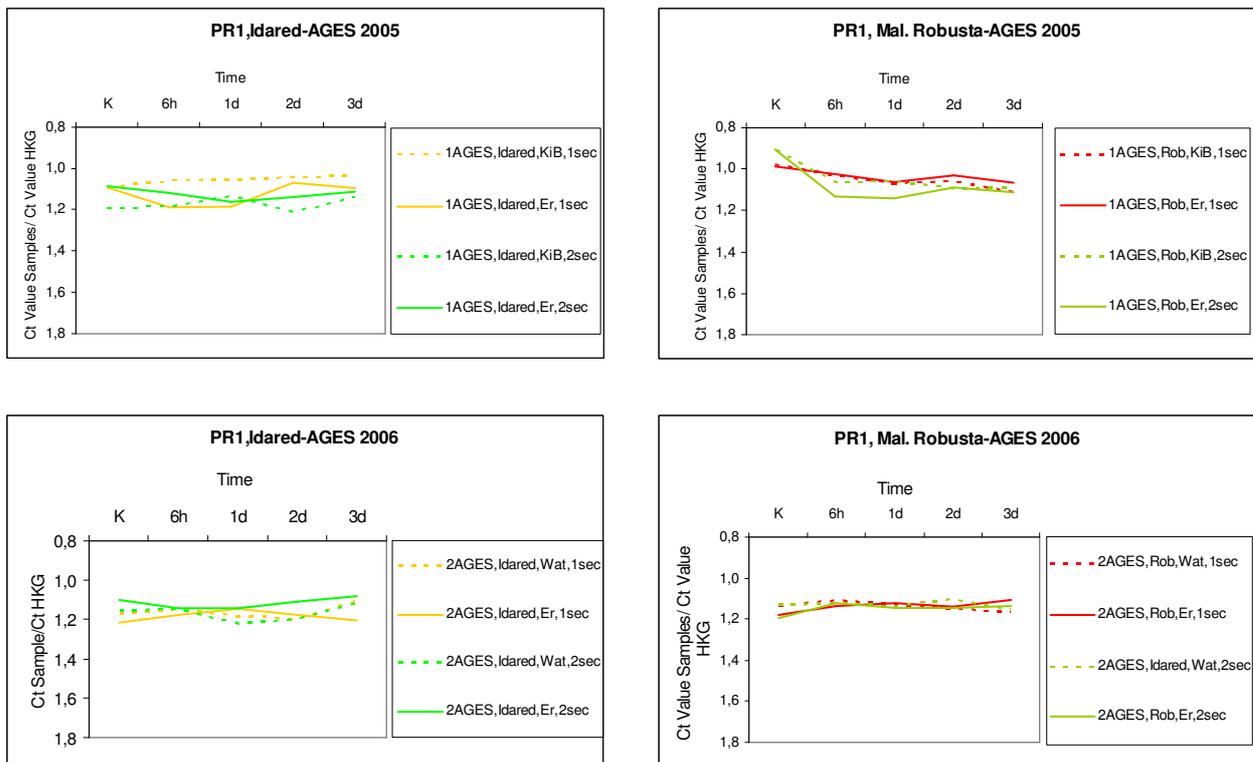


Abb. 2.32: Pathogenesis-related-protein (PR) – Expression

Zusammenfassend konnte beobachtet werden, dass der Verlauf der Genexpression bei *M. robusta* im Gegensatz zur anfälligen Sorte Idared nur geringe Schwankungen aufweist. Dies lässt vermuten, dass *M. robusta* keine geeigneten Bedingungen für die Ausbreitung und Vermehrung von *Erwinia amylovora* bietet, was durch konstitutive Abwehrmechanismen begründet sein könnte.

Um diese Hypothese näher zu untersuchen, wurde die quantitative Ausbreitung von Ea im Infektionsverlauf sowohl bei *M. robusta* als auch bei Idared nach Salm und Geider (2004) analysiert.

2.3.2 Biochemische Untersuchungen

Phenylalaninammoniumlyase (PAL)

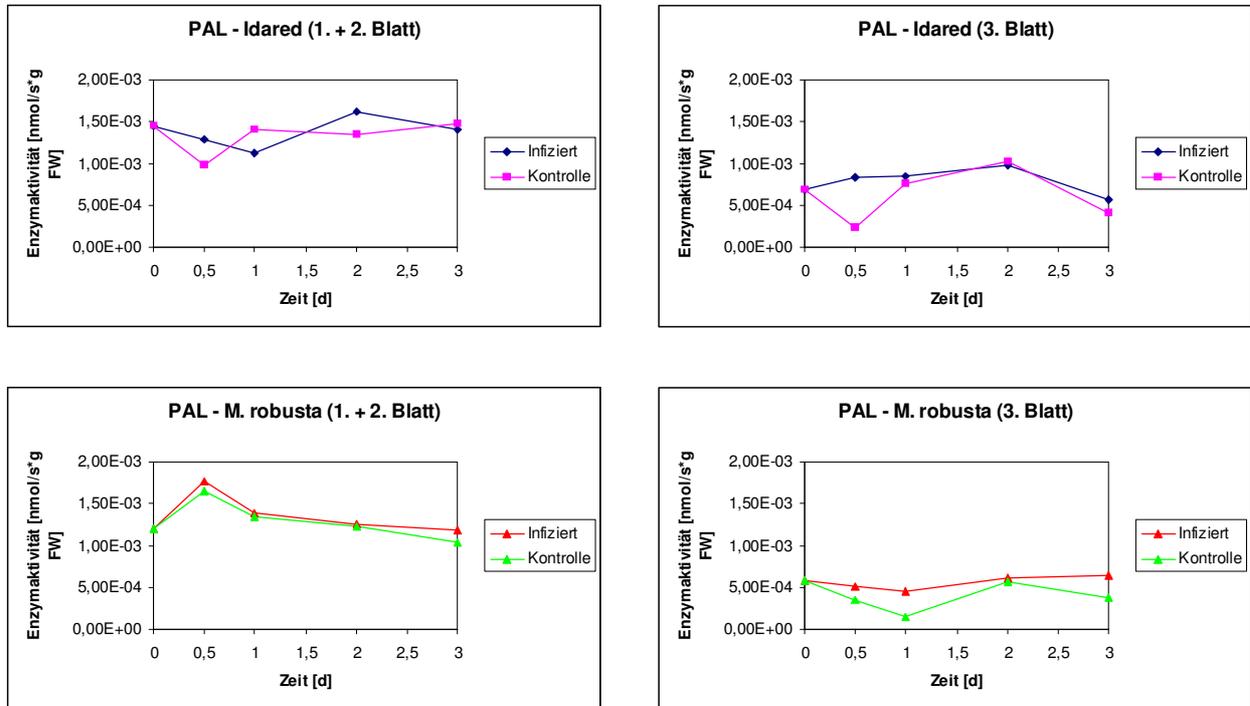


Abb. 2.33: Phenylalaninammoniumlyase (PAL) - Aktivität

Wie man aus der Abbildung 2.33 erkennen kann, treten keine wesentlichen Unterschiede beim Aktivitätsverlauf der PAL zwischen den infizierten und nicht infizierten Pflanzen auf. Deutlich sieht man, dass die jüngeren Blätter (1. und 2. Blatt) eine wesentlich höhere PAL-Aktivität aufweisen als das ältere 3. Blatt. Beim 3. Blatt kommt es sowohl bei Idared als auch bei *M. robusta* zu einer geringfügigen Erhöhung der PAL-Aktivität nach erfolgter Infektion.

Chalconsynthese (CHS)/Chalconisomerase (CHI)

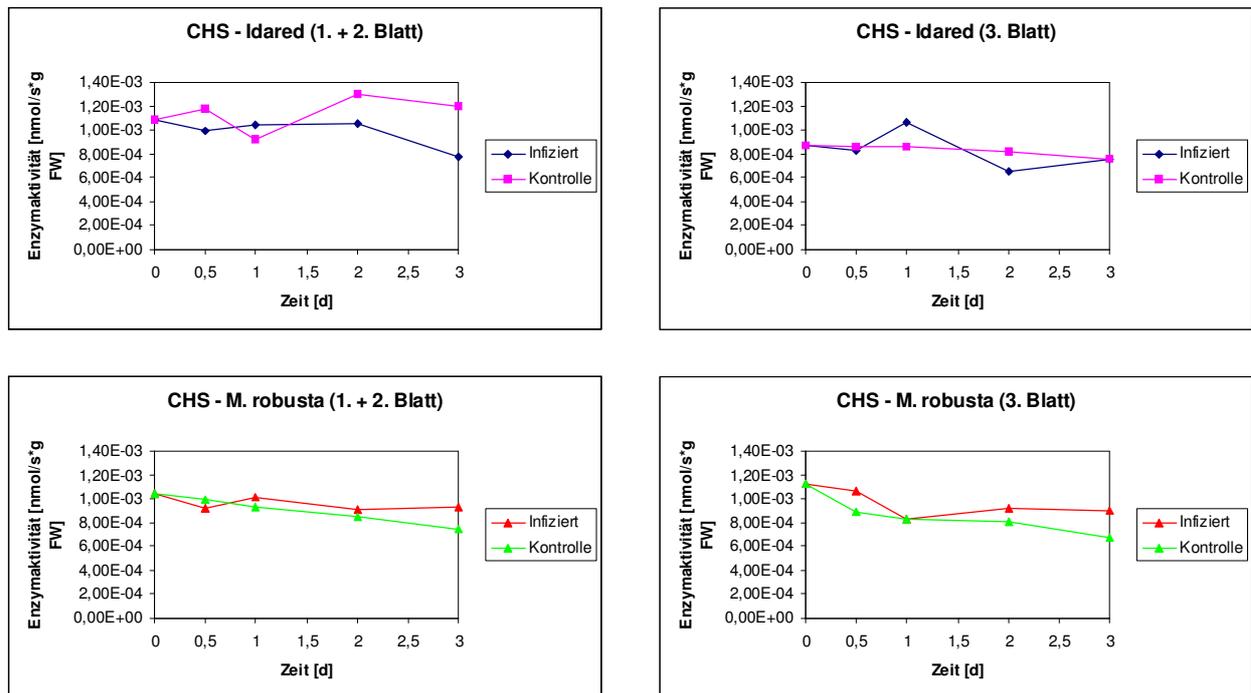


Abb. 2.34: Chalconsynthese (CHS)/Chalconisomerase (CHI) - Aktivität

Beim 1. und 2. Blatt der anfälligen Sorte Idared kommt es nach erfolgter Infektion zu einer Zunahme, während es bei *M. robusta* zu einer leichten Abnahme der CHS/CHI - Aktivität kommt. Beim 3. Blatt von *M. robusta* ist unmittelbar nach der Infektion ebenfalls eine Zunahme zu beobachten. Auffällig ist, dass es bei *M. robusta* zu nahezu keiner Abnahme der CHS/CHI - Aktivität mit zunehmenden Blattalter kommt, während es bei Idared zu einer deutlichen Abnahme der Enzymaktivität mit fortschreitender Blatentwicklung kommt.

Flavanon 3-hydroxylase (FHT)

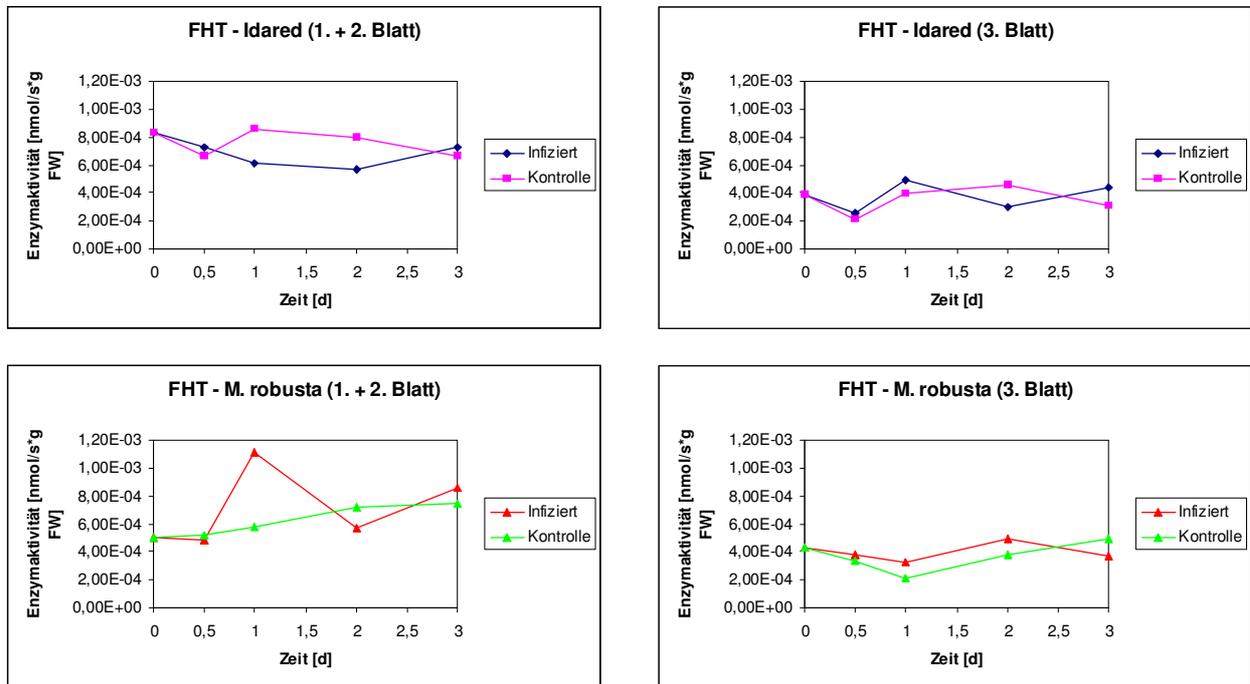


Abb. 2.35: Flavanon 3-hydroxylase (FHT) - Aktivität

Beim 1. und 2. Blatt von Idared kommt es nach 6 Stunden zu einer anhaltenden Abnahme der FHT - Aktivität. Erst nach 3 Tagen ist die Aktivität der infizierten Pflanzen annähernd wieder gleich wie bei den Kontrollpflanzen. Bei *M. robusta* ist beim 1. und 2. Blatt bis zum Zeitpunkt 6 Stunden kein wesentlicher Unterschied bei der FHT - Aktivität festzustellen. Dann kommt es allerdings bei den infizierten Pflanzen zu einer drastischen Zunahme der Aktivität, die ihr Maximum nach einem Tag erreicht und sich anschließend wieder auf das Niveau der nichtinfizierten Pflanzen einpendelt. Die 3. Blätter zeigen wie bei den meisten anderen an der Flavonoid-Biosynthese beteiligten Enzyme eine altersbedingte geringere FHT - Aktivität. Deutlich erkennt man bei *M. robusta*, dass auch das 3. Blatt nach erfolgter Infektion eine etwas größere Enzymaktivität aufweist als die nicht infizierten Blätter.

Flavonolsynthese (FLS)

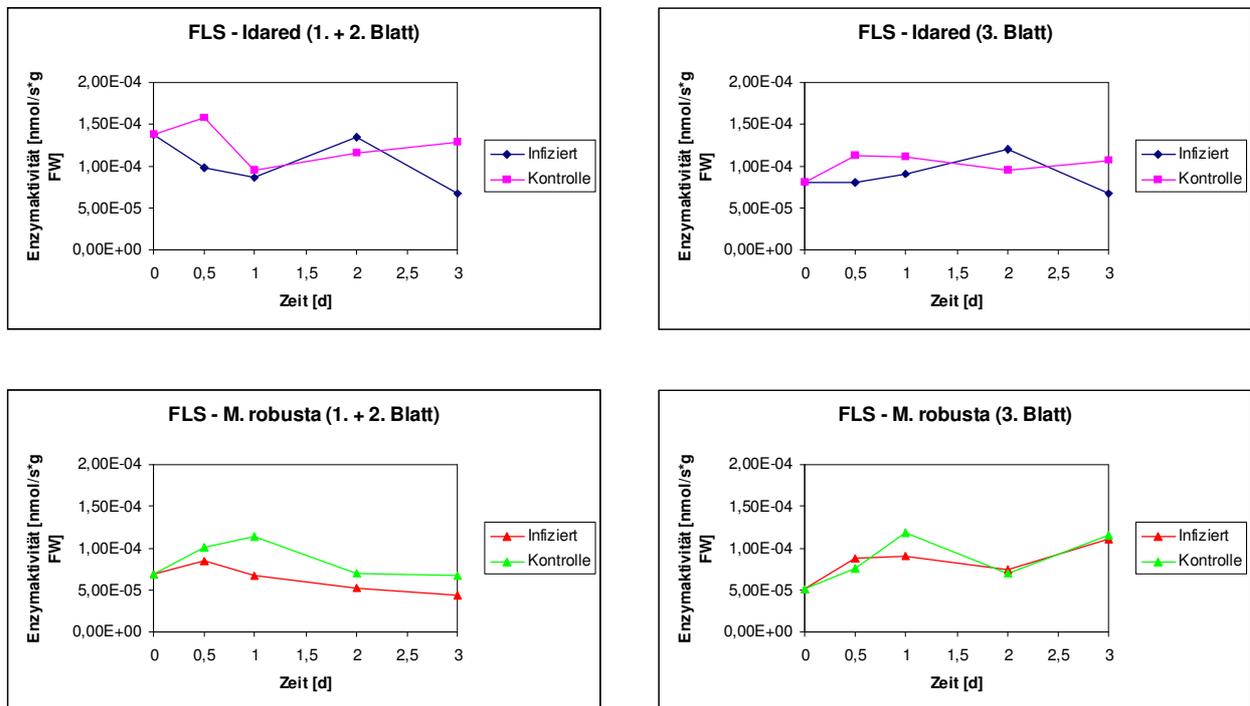


Abb. 2.36: Flavonolsynthase (FLS) - Aktivität

Sowohl bei Idared als auch bei *M. robusta* kommt es beim 1. und 2. Blatt zu einem Abfall der FLS-Aktivität. Bei Idared kommt es aber bereits nach einem Tag wieder zu einem Anstieg, sodass am zweiten Tag sogar die Enzymaktivität der infizierten Pflanzen etwas höher ist als bei den nicht infizierten. Danach kommt es wieder zum Abfall der Enzymaktivität. Anders verhält sich *M. robusta*: Bei diesem kommt es generell zu einer Abnahme der FLS-Aktivität nach erfolgter Infektion. Darüber hinaus ist bemerkenswert, dass *M. robusta* generell eine geringere FLS-Aktivität als Idared aufweist. Das bedeutet, dass eine geringere Menge der vorhandenen Dihydroflavonole zu den Flavonolen umgewandelt wird und daher eine größere Menge in Richtung der pathotoxischen Flavan 3-ole metabolisiert werden kann. Das 3. Blatt beider untersuchten Linien verhält sich ähnlich wie das 1. und 2. Blatt. Auch hier kommt es zu einer Abnahme der Enzymaktivität nach erfolgter Infektion.

Dihydroflavonol 4-reduktase (DFR)

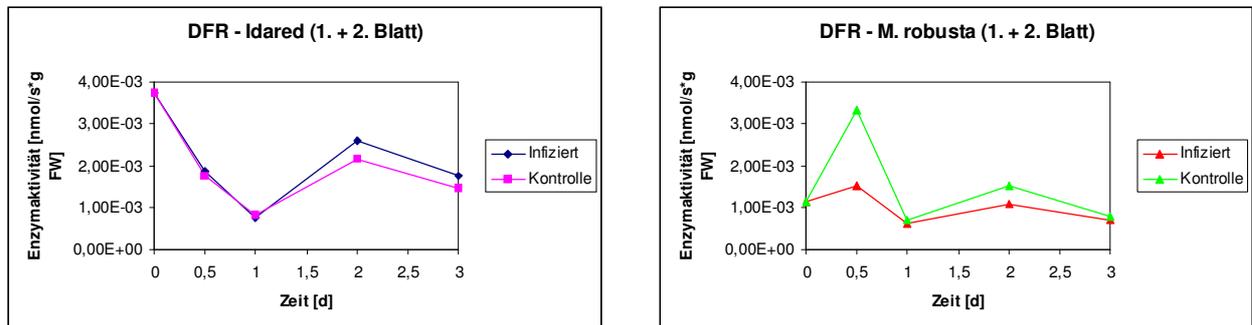


Abb. 2.37: Dihydroflavonol 4-reduktase (DFR) - Aktivität

Beim 1. und 2. Blatt von Idared ist bis zum Zeitpunkt 1. Tag bei der DFR-Aktivität kein Unterschied zwischen den infizierten und den nicht infizierten Pflanzen festzustellen. Danach zeigen die infizierten Pflanzen eine etwas erhöhte Enzymaktivität als die Kontrollpflanzen. Bei *M. robusta* kommt es generell nach erfolgter Infektion zu einer Erhöhung der Enzymaktivität. Besonders auffällig ist, dass es unmittelbar nach der Infektion zu einem extrem starken Abfall der DFR-Aktivität kommt. So fällt bei den infizierten *M. robusta* - Pflanzen die Aktivität der DFR nach 12 Stunden auf mehr als auf die Hälfte des Wertes der nicht infizierten Pflanzen ab.

Flavonoid 3-O-glucosyltransferase (F3GT)

Wie man aus der Abbildung 2.38 eindeutig erkennen kann, ist die F3GT-Aktivität bei *M. robusta* geringer als bei Idared. Nach erfolgter Infektion sind beim 1. und 2. Blatt nahezu keine Unterschiede zu beobachten. Hingegen zeigt das 1. und 2. Blatt bei

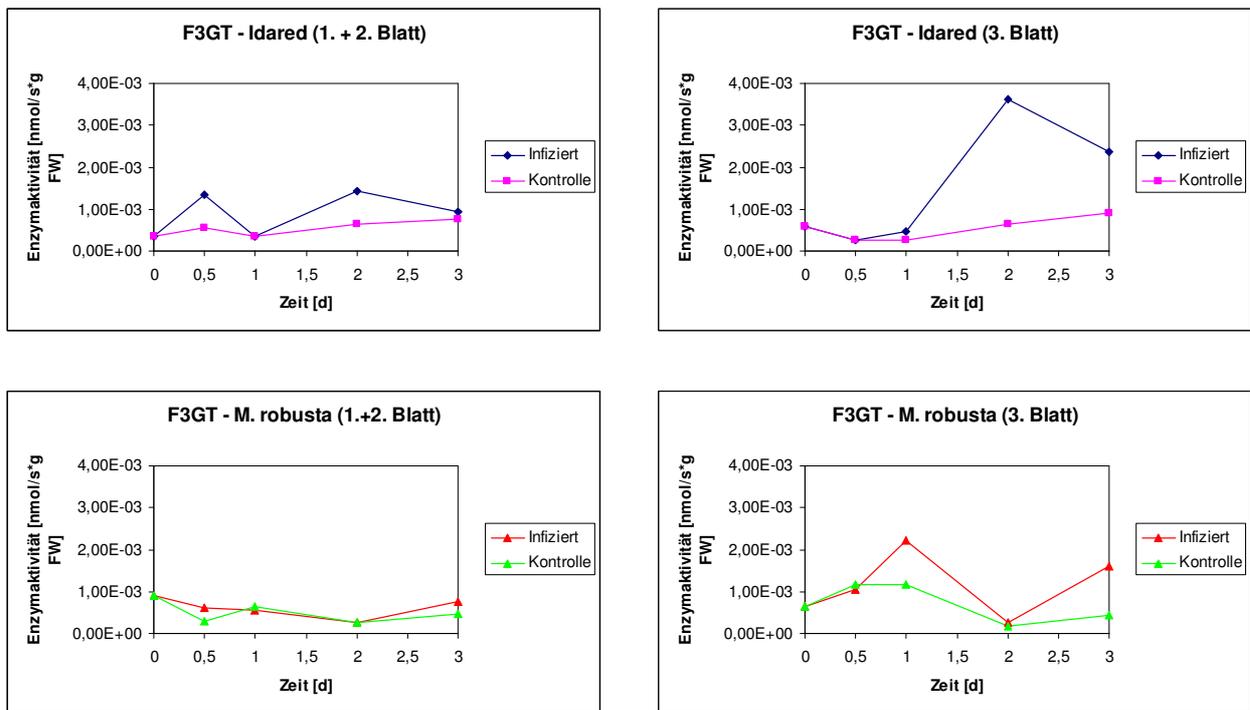
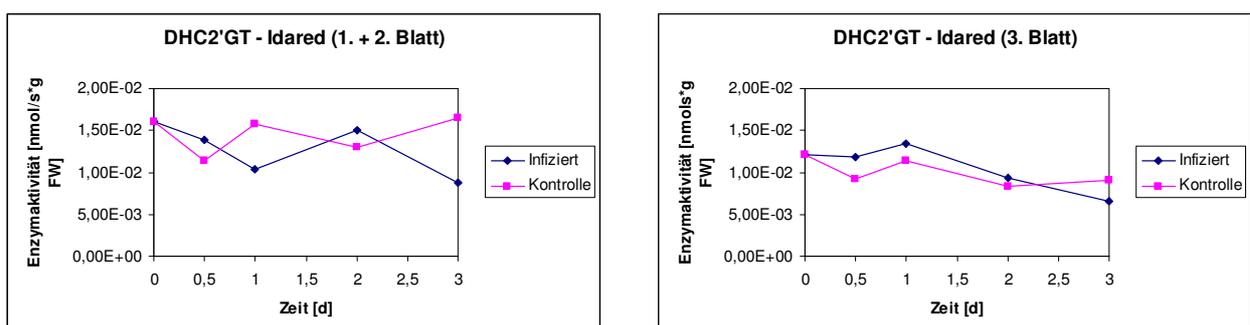


Abb. 2.38: Flavonoid 3-O-glucosyltransferase (F3GT) - Aktivität

Idared nach erfolgter Infektion eine erhöhte F3GT-Aktivität. Dies ist auch beim 3. Blatt erkennbar. Dies gilt auch für das 3. Blatt von *M. robusta*. Allerdings ist die Erhöhung bei den infizierten *M. robusta* - Pflanzen nicht so extrem wie bei den infizierten Idared - Bäumchen.

Dihydrochalcon 2'-O-glucosyltransferase (DHC2'GT)

Wie man aus der Abbildung 2.39 erkennen kann, besitzt Idared eine wesentlich größere DHC2'GT-Aktivität als *M. robusta*. Dies gilt nicht nur für das 1. und 2. Blatt sondern auch für das 3. Blatt. Beim 1. und 2. Blatt beider untersuchten Linien sind keine wesentlichen Unterschiede bei der DHC2'GT-Aktivität zu beobachten. Beim 3. Blatt kommt es bei den infizierten Pflanzen zu einer Erhöhung der DHC2'GT-Aktivität.



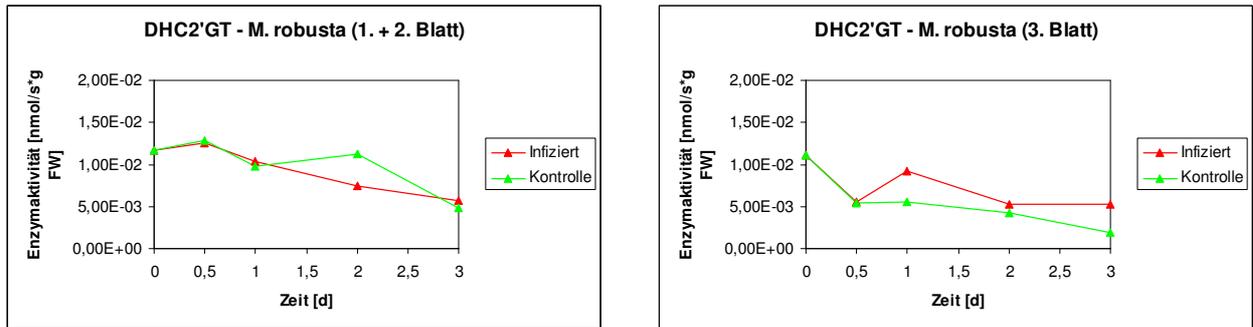


Abb. 2.39: DHC2'-O-glucosyltransferase (DHC2'GT) - Aktivität

Peroxidase

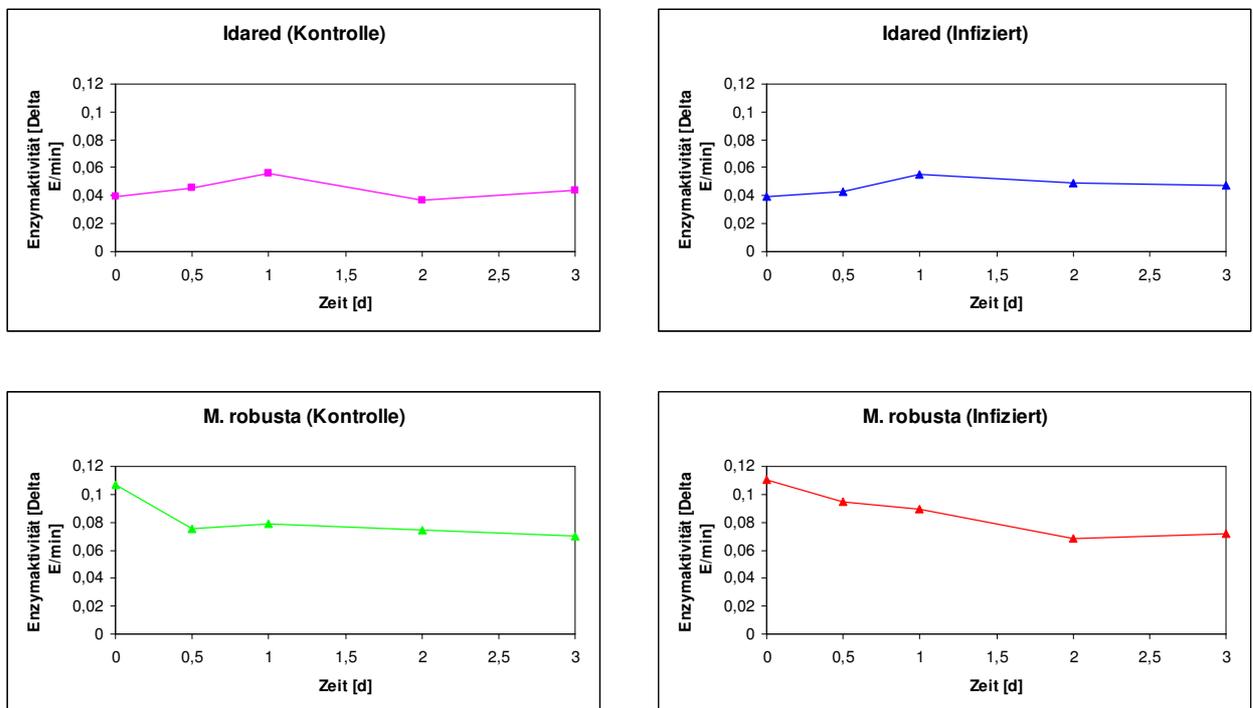


Abb. 2.40: Peroxidase (POX) - Aktivität

Da nicht die durch die an der Flavonoid-Biosynthese beteiligten Enzyme gebildeten Flavonoide, im Besonderen die Flavan 3-ole (Catechin, Epicatechin bzw. die polymeren Proanthocyanidine) bzw. das Dihydrochalcon Phloridzin bzw. dessen Aglycon das Phloretin für die Abwehrreaktion verantwortlich gemacht werden sondern deren Oxidationsprodukte, die o-Chinone, wurde im Rahmen dieser Untersuchungen erstmals eines für die Oxidationsreaktion verantwortlichen Enzyme, die Peroxidase untersucht.

Abbildung 2.40 zeigt den Verlauf der Peroxidase-Aktivität in Abhängigkeit von der Zeit in infizierten bzw. nicht infizierten 1. und 2. Blatt von Idared bzw. *M. robusta*. Wie man eindeutig erkennen kann, weist *M. robusta* eine fast dreimal so hohe Peroxidase-Aktivität als Idared auf. Das bedeutet, dass *M. robusta* ungleich schneller die freigesetzten, im Cytoplasma befindlichen phenolischen Inhaltsstoffe in die physiologisch wirksamen o-Chinone umwandeln kann. Dies dürfte von entscheidender Bedeutung für die Abwehrreaktion sein. Vergleicht man den Aktivitätsverlauf der Peroxidase zwischen den infizierten und nicht infizierten Pflanzen, so sieht man, dass keine wesentlichen Unterschiede auftreten. Das bedeutet, dass es zu keiner Induktion der Peroxidase infolge der Infektion kommt.

2.4 *In vitro* - Versuch

2.4.1 Molekularbiologische Untersuchungen

Die Rolle ausgewählter Gene des Phenylpropanoid Pathways im Vergleich mit der anfälligen Sorte Idared und der resistenten Wildart *Malus robusta* wurde untersucht.

In vitro - Sprosse von Dresden - Pillnitz (V. Hanke) wurden auf MS-Medium, 3 % Saccharose, mit BA und IBA (1 mg/l) kultiviert. Pflanzen wurden mittels Mikrostecklingsvermehrung bei einem 16 Stunden Tag kultiviert. Die Pflanzen wurden 2 Wochen vor dem Experiment auf frisches Nährmedium gesetzt.

Die Inokulation wurde mit sterilen Zahnstochern, welche vorher in die bakterielle Suspension *E. amylovora* (strain 295/93, cfu 10^8) getaucht wurden, durchgeführt. Die Proben wurden 6 h, 1 d, 2 d, 3 d nach Inokulation gesammelt. Die Kontrolle wurde mit sterilem King B Medium genauso behandelt. Das Material wurde sofort in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Es wurden drei Wiederholungen durchgeführt. Jeweils fünf Pflanzen wurden pro Zeitpunkt gesammelt.

DNA-Kalibrierkurven wurden hergestellt sowie die mRNA mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Verschiedene Kontrollgene wurden als Standards getestet, wobei das Gen für Polyubiquitin sich als zuverlässiger als das

Actin erweitert. Daher wurde Polyubiquitin als Housekeeping Gene verwendet. Eine statistische Analyse wurde mittels der REST 2005 Software durchgeführt.

Phenylalaninammoniumlyase (PAL)

PAL ist das Schlüsselenzym des Phenylpropanoid-Pathways. Die Daten zeigen, dass die Expression (Abb. 2.41) der PAL-Gene in beiden Apfelerarten eine leicht abnehmende Tendenz nach mechanischer Verwundung aufweisen. Dieser Effekt erscheint nach der Inokulation mit Bakterien sogar stärker, die Veränderungen sind allerdings nicht signifikant. Weiters gibt es auch keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Apfelerarten.

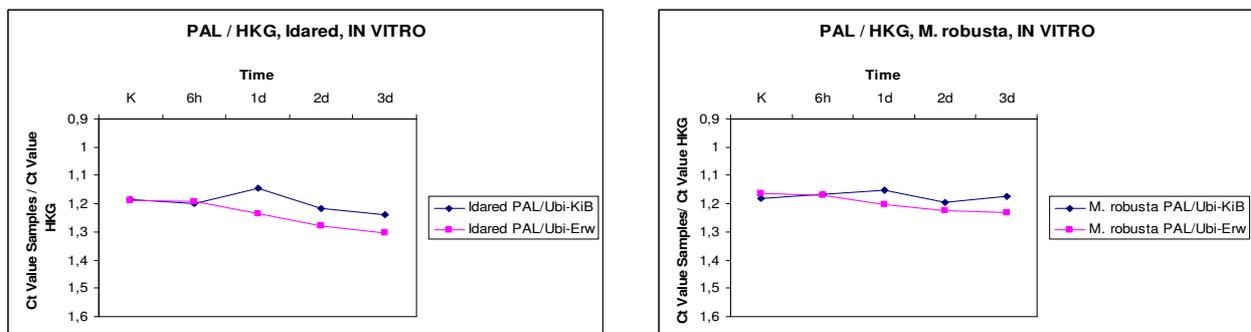


Abb. 2.41: Phenylalaninammoniumlyase (PAL) - Expression

Chalconsynthase (CHS)

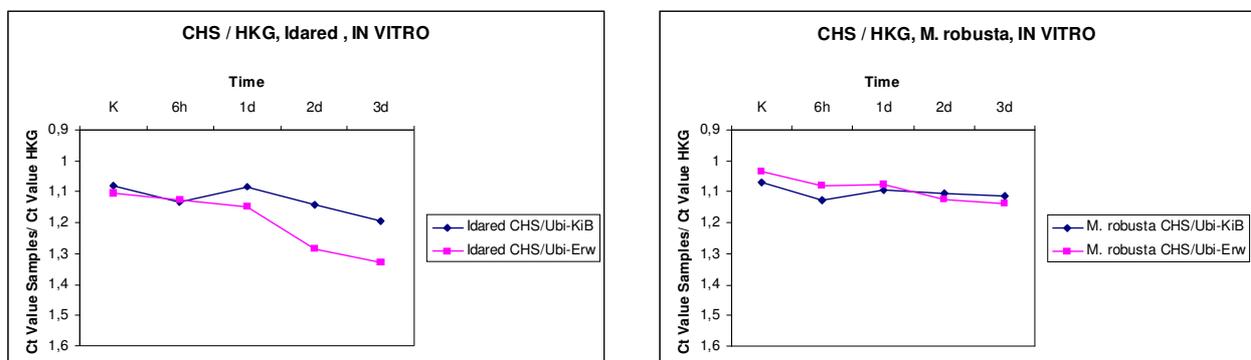


Abb. 2.42: Chalconsynthase (CHS) - Expression

Die Chalconsynthase ist eine weitere wichtige Komponente dieses Pathways. Die Expression der CHS erscheint in beiden Apfelpflanzen downreguliert (Abb. 2.42).

Auch hier ist die Genexpression während der mechanischen Verwundung ähnlich wie durch das bakterielle Pathogen. Die Expressionslevel scheinen bei *M. robusta* im Vergleich zu Idared höher, obwohl die Unterschiede nicht signifikant sind.

Chalconisomerase (CHI)

Chalconisomerase ist das verantwortliche Enzym für die Isomerisation von Chalconen zu den Flavanonen, ein Schlüsselschritt in der Biosynthese der Flavonoide.

Die Expression der CHI in Idared nach Ea Inokulation stieg leicht an, im Gegensatz zu *M. robusta*, wo die Expression nach Ea Inokulation leicht abnahm (Abb. 2.43).

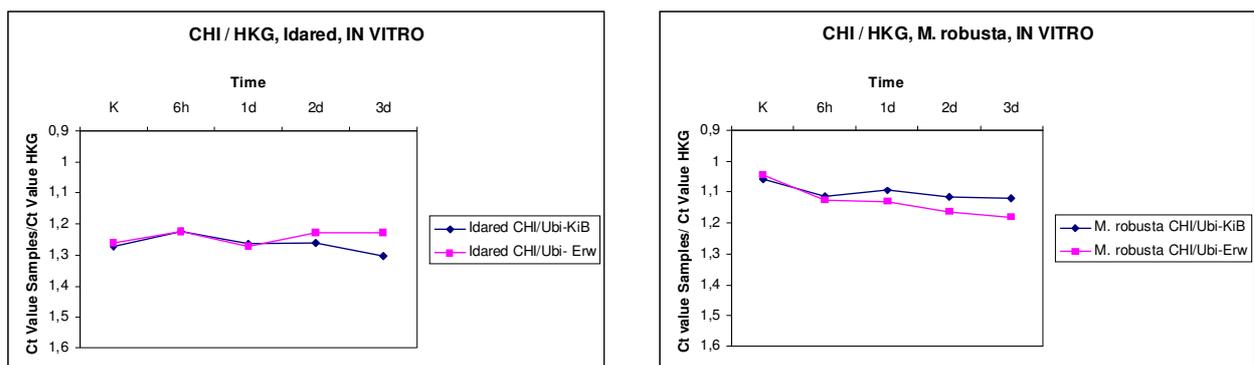


Abb. 2.43: Chalconisomerase (CHI) - Expression

Flavanon 3-hydroxylase (FHT)

Die Flavanon 3-hydroxylase (FHT) katalysiert die enzymatische Umwandlung der Flavanone zu den Dihydroflavonolen, der unmittelbaren Vorstufen der Flavan 3,4-diole (Leucoanthocyanidine) und der Flavonolen.

Bei der Expression von FHT (Abb. 2.44) kommt es in beiden Apfelarten bereits 6 Stunden nach Ea - Inokulation zu einem geringen Anstieg der Genexpression, der bereits nach einem Tag keinen Unterschied zur Kontrolle aufweist und dann ähnlich wie in den Kontrollbehandlungen verläuft.

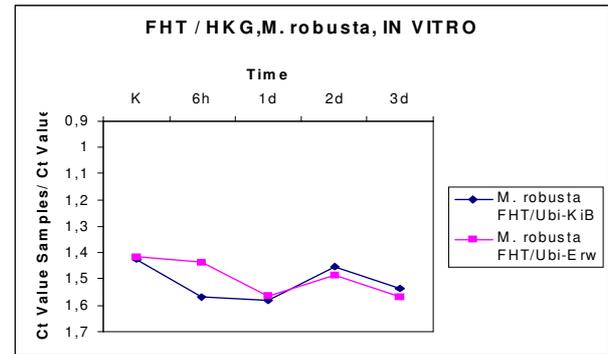
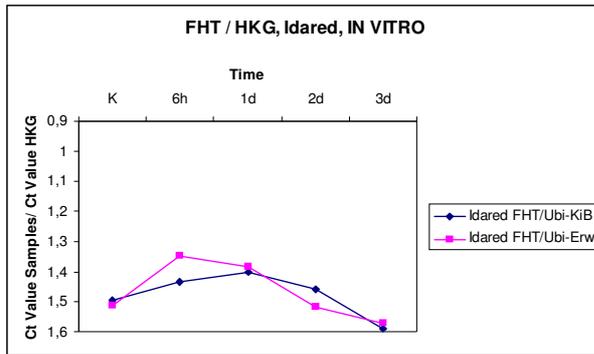


Abb. 2.44: Flavanon 3-hydroxylase (FHT) - Expression

Flavonolsynthese (FLS)

Es konnte keine Änderung der Genexpression bei *M. robusta* festgestellt werden. Eine Abnahme der Expression konnte bei der anfälligen Sorte Idared am 2. Tag nach Inokulation mit Ea im Vergleich zur Kontrollvariante gezeigt werden (Abb. 2.45).

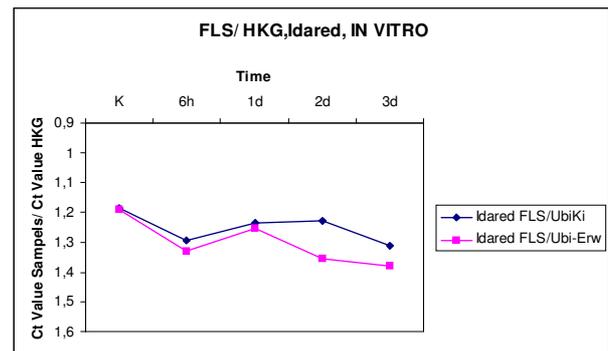
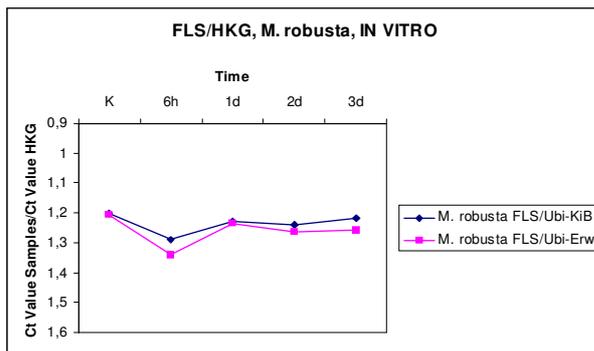


Abb. 2.45: Flavonolsynthese (FLS) - Expression

Dihydroflavonol 4-reduktase (DFR)

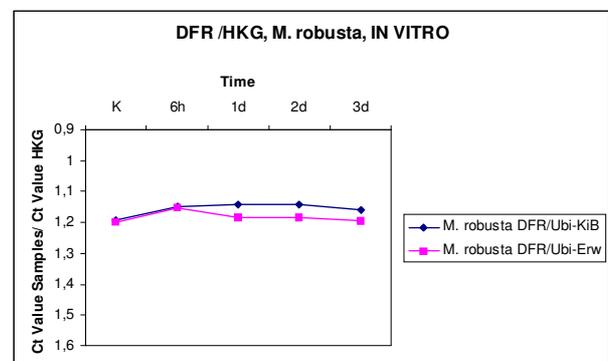
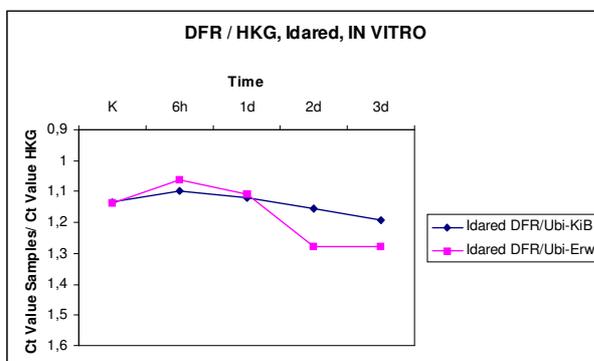


Abb. 2.46: Dihydroflavonol 4-reduktase (DFR) - Expression

Die Dihydroflavonol 4-reduktase (DFR) katalysiert die enzymatische Umwandlung der Dihydroflavonole zu den Leucoanthocyanidinen, welche die Vorstufen der Flavan 3-ole (Catechin, Epicatechin, Proanthocyanidin) sind. Diese Substanzen spielen in Zusammenhang mit den Wirt-Pathogen-Interaktionen eine wichtige Rolle.

Die Expressions-Aktivitäten der DFR bei *M. robusta* und bei Idared zeigen bis zum 1. Tag nach der Inokulation keine großen Unterschiede. Danach fiel die Expression bei Idared stark ab und zeigte nur eine geringe Zunahme nach dem 2. Tag, während bei *M. robusta* nur eine geringe Abnahme nach dem 1. Tag zu verzeichnen war.

Anthocyanidinsynthase (ANS)

Idared zeigt bereits ab dem 1. Tag eine Abnahme der Expression, während bei *M. robusta* keine signifikanten Veränderungen zu beobachten sind (Abb. 2.47).

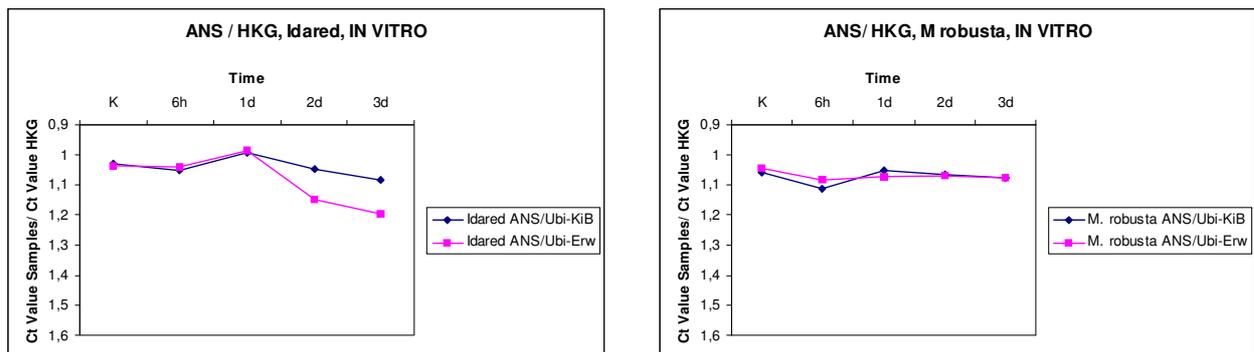


Abb. 2.47: Anthocyanidinsynthase (ANS) - Expression

Anthocyanidinreduktase (ANR)

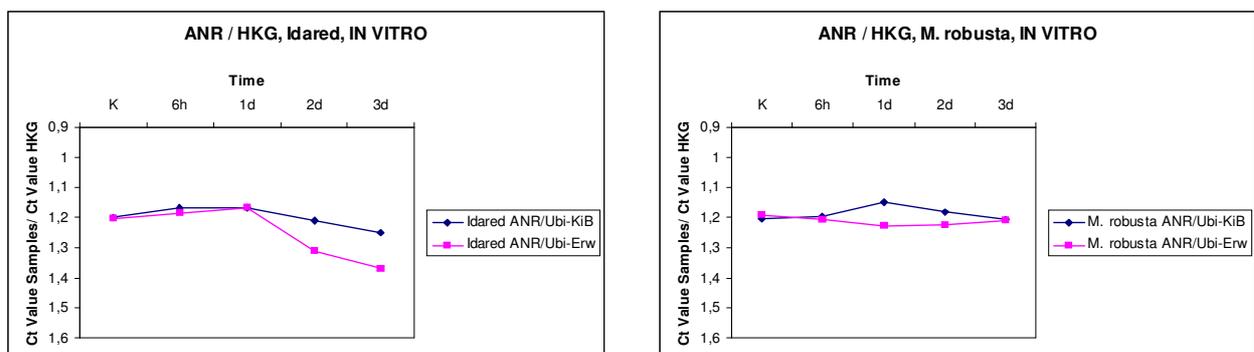


Abb. 2.48: Anthocyanidinreduktase (ANR) - Expression

Die Expression des ANR Gens verlief bei *Idared* leicht ansteigend bis zum 1. Tag, danach wurde jedoch eine starke Abnahme beobachtet (Abb. 2.48). Ein ähnlicher Expressionsverlauf der ANS wurde auch bei *M. robusta* beobachtet. Eine leichte Abnahme bei 6 h, nach dem 1. Tag erfolgte wieder ein leichter Anstieg.

Flavonoid 3-O-glucosyltransferase (F3GT)

Die Flavonoid 3-O-glucosyltransferases transferiert den Glucose-Rest von UDP - Glucose auf die Hydroxylgruppe in Position 3 der Anthocyanidine bzw. der Flavonole. Ein ähnlicher Expressionsverlauf der F3GT zeigt sich bei *M. robusta* und bei *Idared* bis zum 1. Tag nach Inokulation (Abb. 2.49) Danach nimmt die Expression bei *Idared*, insbesondere nach bakterieller Infektion, rascher ab als bei *M. robusta*.

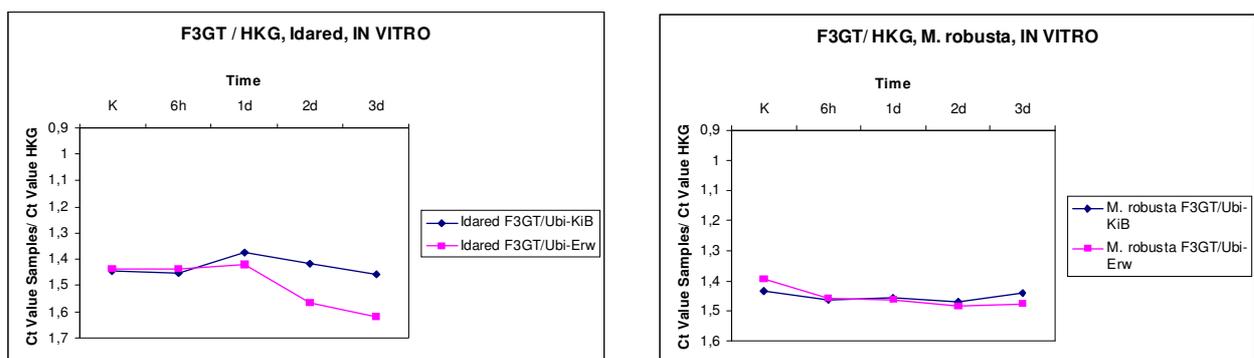


Abb. 2.49: Flavonoid 3-O-glucosyltransferase (F3GT) - Expression

Dihydrochalcon 2'-O-glucosyltransferase (DHC2'GT)

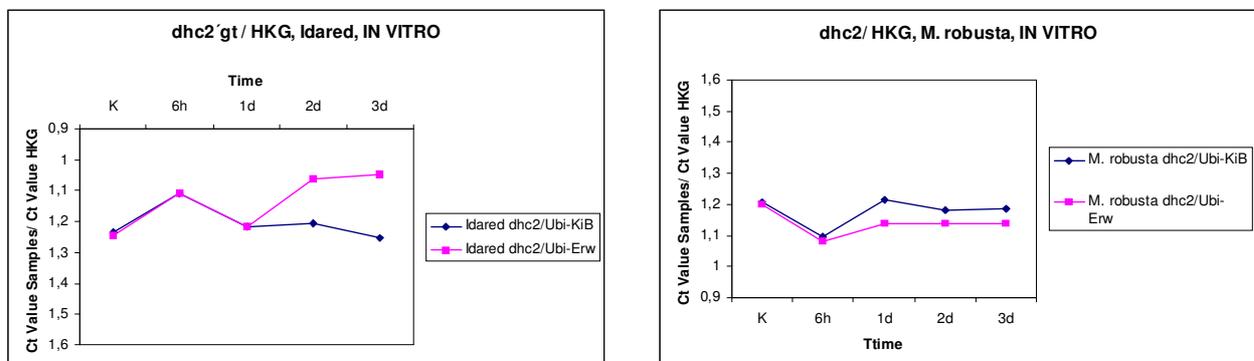


Abb. 2.50: Dihydrochalcon 2'-O-glucosyltransferase (DHC2'GT) - Expression

Das Expressionsverhältnis bei *M. robusta* zeigt einen Tag nach Inokulation einen leichten Anstieg der Expression der DHC2'GT, gefolgt von einer geringen Abnahme (Abb. 2.50). Im Gegensatz dazu, kann ein signifikanter Anstieg der DHC2'GT bei Idared (p-value 0,001), ab dem 1. Tag nach Inokulation beobachtet werden.

Überblick über die Expression aller Gene - Vergleich Idared - *M. robusta*

Generell zeigt sich, dass die Expression der untersuchten Gene in der anfälligen Sorte Idared wesentlich höher ist, als in der resistenten Wildapfelart *M. robusta* (Abb. 2.51).

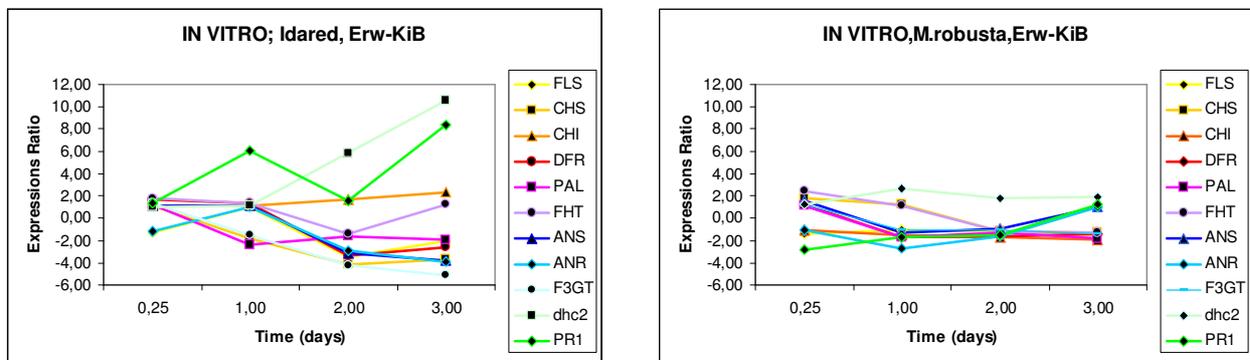


Abb. 2.51: Expression in den nicht infizierten Pflanzen

ANS, ANR, F3GT

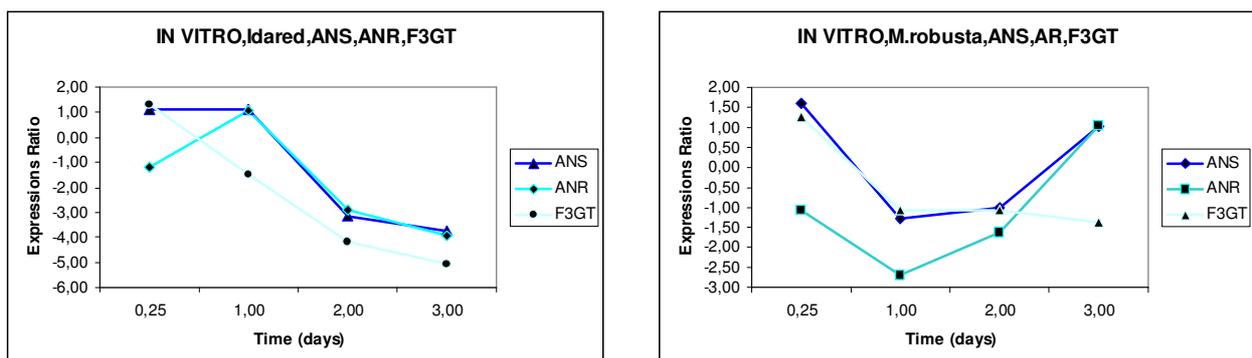


Abb. 2.52: Expression der ANS, ANR und F3GT

Idared zeigte eine generelle Abnahme der Expression der ANS, ANR und F3GT im Gegensatz zu *M. robusta*, bei der nach dem 1. Tag ein Anstieg der ANS und ANR zu beobachten war (Abb. 2.52).

CHS, CHI, FHT, DFR

Die Genexpression der CHS, CHI, FHT und DFR in *Idared* im Vergleich zu *M. robusta* zeigte starke Schwankungen, wobei es auch bei *M. robusta* zu einer generellen Abnahme der Genexpression kommt (Abb. 2.53).

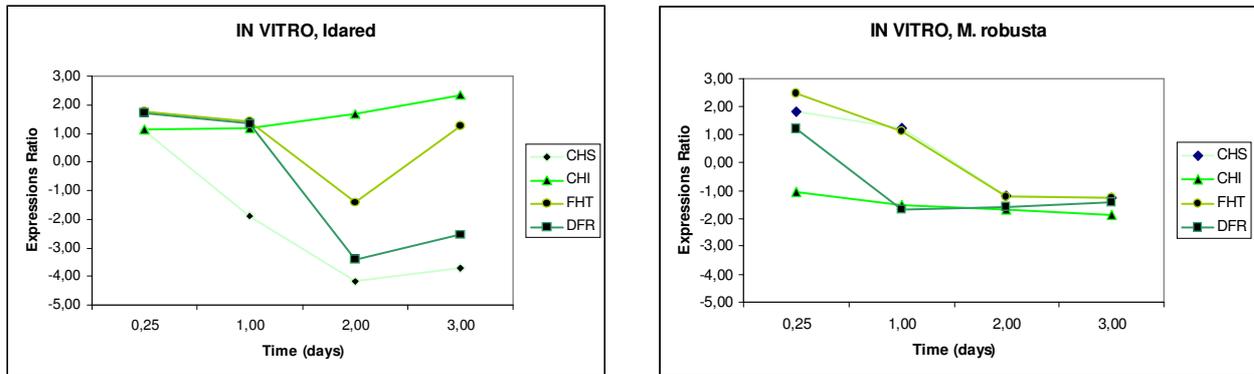


Abb. 2.53: Expression der CHS, CHI, FHT und DFR

CHS, DHC2'GT

Die Expressionsverhältnisse bei *M. robusta* zeigen einen Tag nach Inokulation einen geringen Anstieg der DHC2'GT, und danach eine geringe Abnahme. Im Gegensatz dazu ist bei *Idared* eine signifikante Zunahme der Expression zu beobachten, bereits einen Tag nach Inokulation und dies mit stark steigender Tendenz (Abb. 2.54).

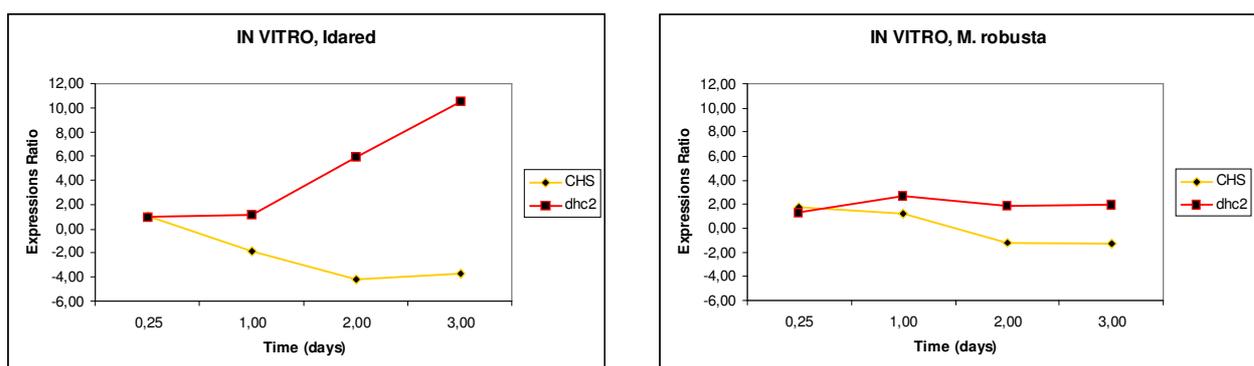


Abb. 2.54: Expression der CHS und DHC2'GT

2.4.2 Biochemische Untersuchungen

Phenylalaninammoniumlyase (PAL)

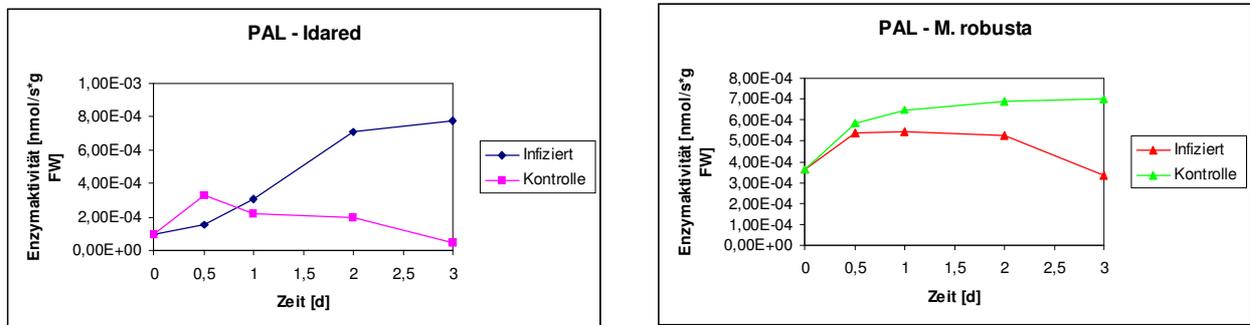


Abb. 2.55: Phenylalaninammoniumlyase (PAL) - Aktivität

Vergleicht man die Anfangs - PAL - Aktivitäten, so sieht man, dass *M. robusta* im Vergleich zu der anfälligen Sorte Idared fast eine 3,5 fach höhere PAL - Aktivität aufweist. Nach erfolgter Infektion kommt es bei Idared zu einem kontinuierlichen Anstieg der PAL - Aktivität, während bei den Kontrollpflanzen nur ein Anstieg der Enzymaktivität bis zum Zeitpunkt 6 Stunden erfolgt. Danach nimmt die Aktivität wieder ab. Im Gegensatz zu Idared steigt bei den *M. robusta* - Kontrollpflanzen die PAL-Aktivität mit zunehmender Kulturdauer. Die Enzymaktivität nimmt auch in den infizierten Pflanzen zu, allerdings nur bis zum 1. Tag, danach kommt es zu einer Abnahme. Auch ist die zu Beginn bei den infizierten Pflanzen zu beobachtende Aktivitätszunahme geringer als bei den nicht infizierten Pflanzen.

Chalconsynthese (CHS)/Chalconisomerase (CHI)

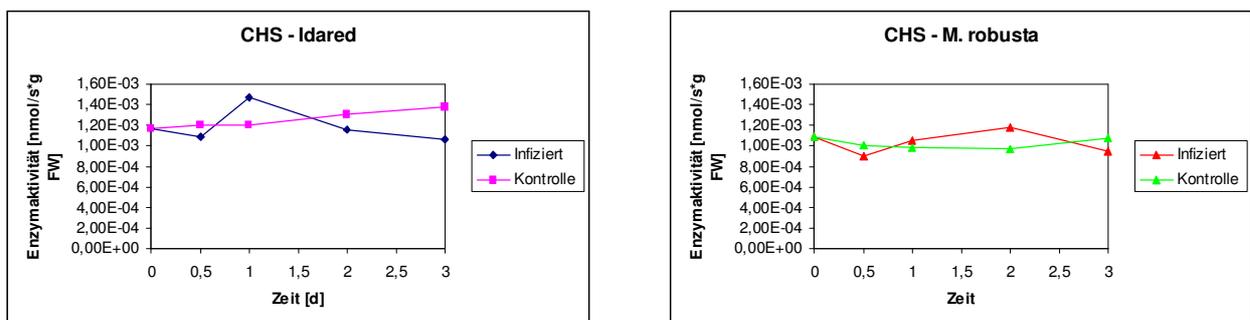


Abb. 2.56: Chalconsynthese (CHS)/Chalconisomerase (CHI) - Aktivität

Idared weist eine etwas höhere CHS/CHI – Aktivität auf als *M. robusta*. Weder bei Idared noch bei *M. robusta* kommt es zu einer wesentlichen Veränderung des Aktivitätsverlaufs nach erfolgter Infektion. Bei beiden getesteten Kultivaren kommt es zu Beginn zu einer geringfügigen Aktivitätsabnahme, die allerdings nach 6 Stunden wieder zunimmt, sodass die infizierten Pflanzen im weiteren Zeitverlauf höhere Enzymaktivitäten aufweisen als die nicht infizierten Pflanzen. Erst nach 2 bzw. 2,5 Tagen sinkt diese bei den infizierten Pflanzen unter den Wert der Kontrollpflanzen.

Flavanon 3-hydroxylase

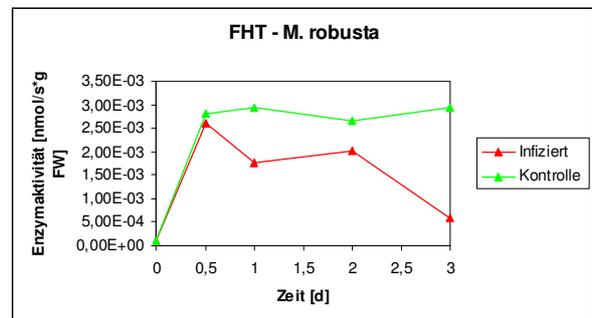
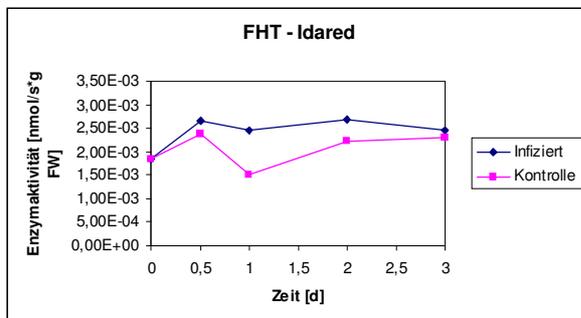


Abb. 2.57: Flavanon 3-hydroxylase (FHT) - Aktivität

Bei Idared kommt es nach erfolgter Infektion zu einer Erhöhung, während es bei *M. robusta* zu einer Erniedrigung der FHT - Aktivität kommt.

Flavonolsynthese (FLS)

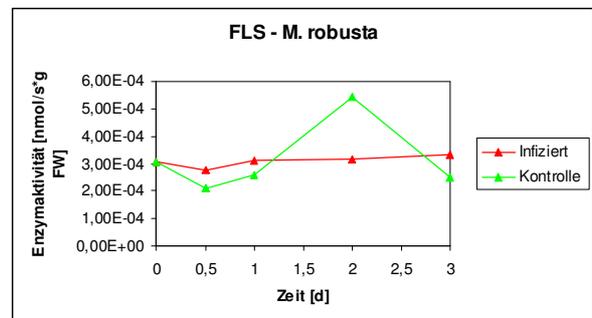
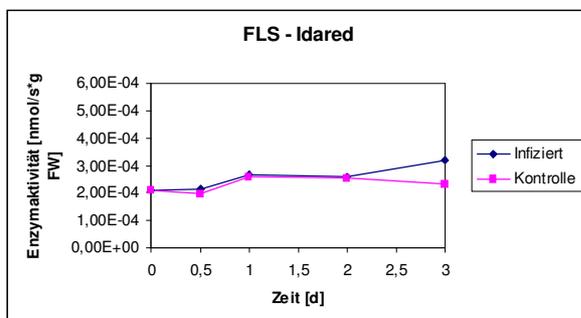


Abb. 2.58: Flavonolsynthese (FLS) - Aktivität

Idared weist eine etwas geringere FLS - Aktivität als *M. robusta* auf. Bis zum 2. Tag kann bei Idared keine Beeinflussung der FLS - Aktivität infolge der Infektion

festgestellt werden. Danach zeigen die infizierten Idared - Pflanzen eine etwas höhere FLS – Aktivität. Bei *M. robusta* steigt bis zum Zeitpunkt 1. Tag die FLS - Aktivität nach der Infektion leicht an. Im weiteren Verlauf bleibt die FLS - Aktivität bei den infizierten Pflanzen auf demselben Niveau, während es bei den nicht infizierten Pflanzen zu einer raschen Zunahme der Enzymaktivität kommt, die am 2. Tag ihr Maximum erreicht. Danach sinkt die Aktivität der FLS wieder ab.

Dihydroflavonol 4-reduktase (DFR)

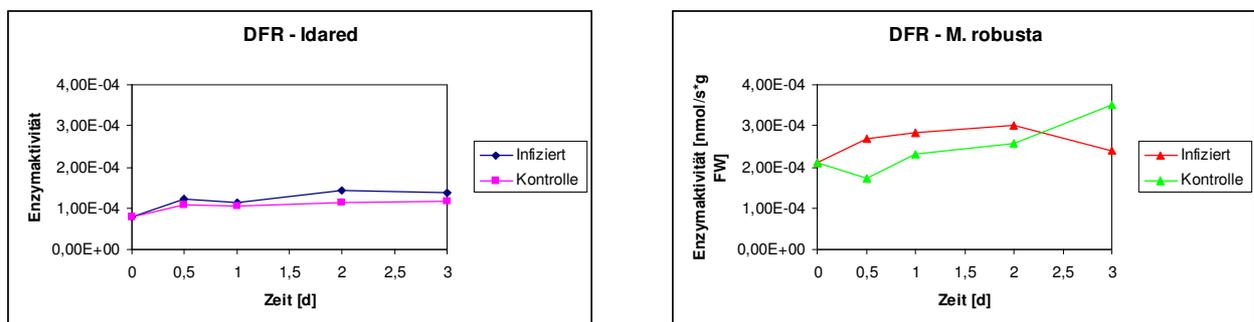


Abb. 2.59: Dihydroflavonol 4-reduktase (DFR) - Aktivität

Wie man aus der Abbildung 2.59 erkennen kann, besitzt *M. robusta* eine wesentlich höhere DFR - Aktivität als Idared. Die Infektion bewirkt bei beiden Kultivaren eine Erhöhung der Enzymaktivität, die bei *M. robusta* aber ausgeprägter ist als bei Idared.

Flavonoid 3-O-glucosyltransferase (F3GT)

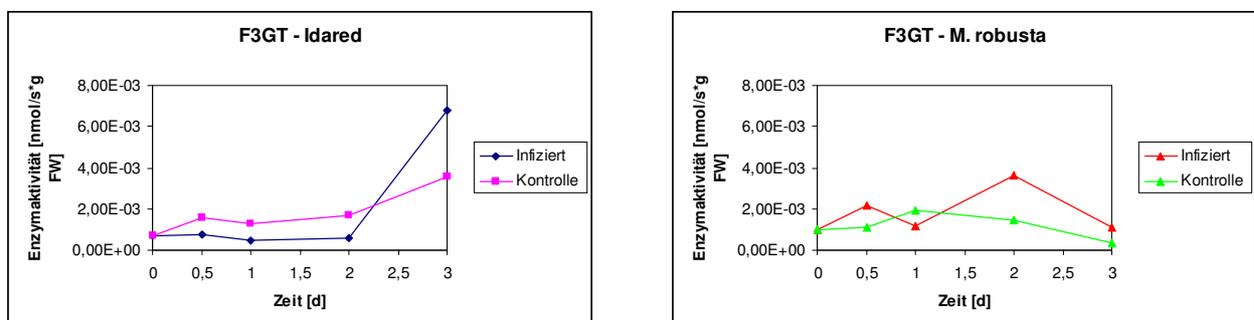


Abb. 2.60: Flavonoid 3-O-glucosyltransferase (F3GT) - Aktivität

Betrachtet man den Verlauf der nicht infizierten Pflanzen, so nimmt die F3GT-Aktivität mit zunehmender Kulturdauer bei Idared kontinuierlich zu, während diese

bei *M. robusta* abnimmt. Durch die Infektion kommt es bei Idared bis zum 2. Tag zu einer Abnahme der F3GT - Aktivität. Anschließend kommt es sowohl bei den nicht infizierten als auch bei den infizierten Idared – Pflanzen zu einem Anstieg der F3GT - Aktivität. Dieser ist bei den infizierten Pflanzen ausgeprägter, sodass am 3. Tag die infizierten Pflanzen eine höhere Enzymaktivität aufweisen als die nicht infizierten Pflanzen. Bei *M. robusta* kommt es teilweise zu einer Erhöhung der F3GT-Aktivität nach erfolgter Infektion.

Dihydrochalcon 2'-O-glucosyltransferase (DHC2'GT)

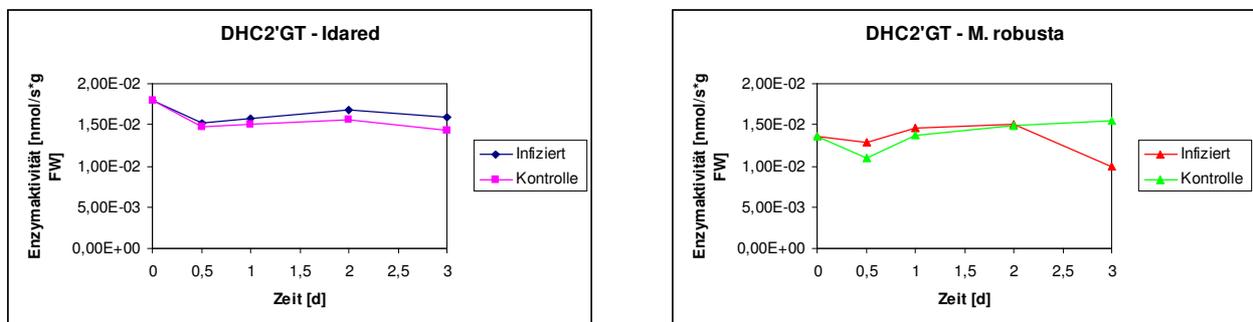


Abb. 2.61: Dihydrochalcon 2'-O-glucosyltransferase (DHC2'GT) - Aktivität

M. robusta weist eine etwas geringere DHC2'GT – Aktivität als Idared auf. Durch die Infektion kommt es bei beiden Kultivaren zu einer minimalen Zunahme der Enzymaktivität. Lediglich bei *M. robusta* kommt es nach dem 2. Tag zu einer deutlichen Abnahme der Aktivität der DHC2'GT.

2.5 Nachweis und Quantifizierung von *Erwinia amylovora* (Ea)

Die Quantifizierung und die Ausbreitung von Ea im Pflanzengewebe wurde untersucht. Innerhalb der ersten drei Tage nach bakterieller Inokulation wurden keine sichtbaren Unterschiede zwischen Idared und *M. robusta* beobachtet. Danach konnten an den Infektionsstellen nekrotische Läsionen und der Austritt kleiner Tröpfchen (das bakterielle Ooze) aus den Wunden festgestellt werden. Dies konnte meist bei Pflanzen der Sorte Idared, vereinzelt aber auch bei *M. robusta* Pflanzen beobachtet werden. In den Abbildungen 2.62 und 2.63 sind die makroskopischen (A1-6) und mikroskopischen (B1-6) Beobachtungen der morphologischen

Veränderungen, welche 3 Tage nach Inokulation mit Ea in Idared auftreten, dargestellt.



Abb. 2.62: Idared - Kontrolle, Idared - Ea Infektion , darunter *Malus robusta*

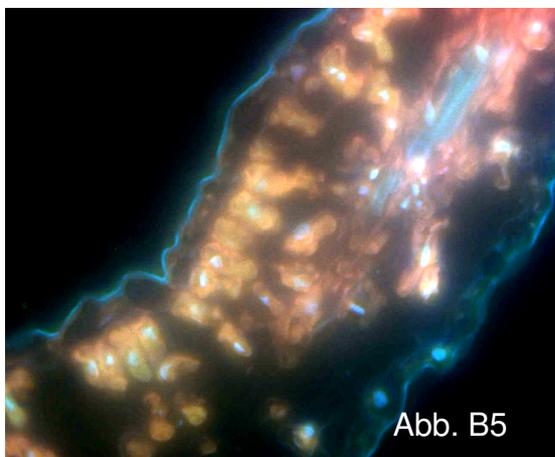
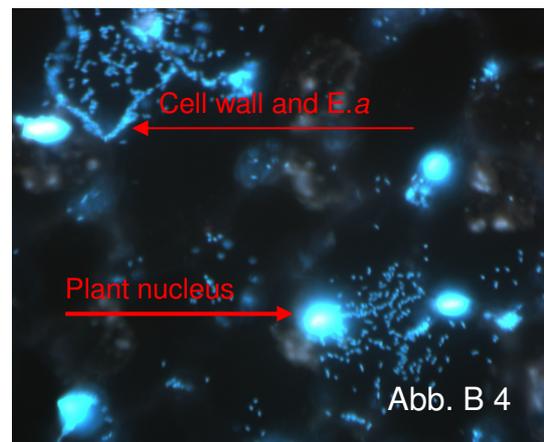
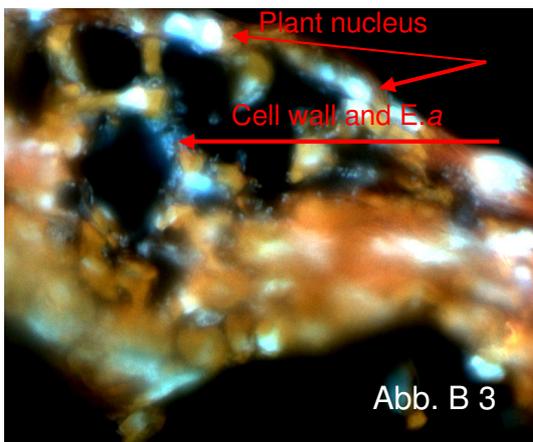
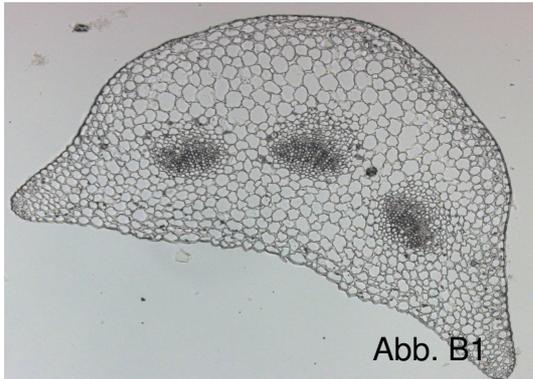


Abb. 2.63: Idared nach 48h Inokulation mit *Erwinia amylovora*

In Gewebequerschnitten von Idared-Stielen sind nach drei Tagen bakterieller Infektion aufgelöste Zellwände zu beobachten. Mit diesen großflächigen Schädigungen ist auch die massive Ausbreitung und Vermehrung der Bakterien in Zusammenhang zu bringen. Noch deutlicher wird das Schadausmaß durch Färbung mit DAPI sichtbar. DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der zur Gruppe der Indol-Farbstoffe gehört. Diese Substanz

wird zur DNA Färbung, zur Kernfärbung, für die Färbung lebender Zellen und zur Gegenfärbung bei Immunfluoreszenzfärbungen von humanem und botanischem Material sowie in der Flowcytometrie verwendet. Die Zellkerne, pflanzliche DNA, sowie auch bakterielle DNA sind mittels Fluoreszenzmikroskop zu beobachten.

Bei *M. robusta* grenzen die nekrotischen Zellen die Inokulationswunde ab, und es kommt zu keinem Austritt von Flüssigkeit aus dem umgebenden Gewebe. Dies lässt vermuten, dass die bakterielle Ausbreitung der Bakterien unterdrückt wurde. Um diese Hypothese näher zu verifizieren, wurde versucht, die bakterielle Dichte von Ea zu quantifizieren. Dazu wurde mittels Real-time PCR eine Methode nach Salm und Geider (2004) etabliert, um in Pflanzengewebe mittels wässrigem Eluat die Dichte von Ea zu detektieren. Spezifische Primer für die Standardidentifizierung des Pathogens wurden verwendet. Die Ergebnisse in Abb. 2.64 zeigen, dass nach dem 3. Tag in der anfälligen Sorte eine höhere bakterielle Dichte von Ea nachgewiesen werden kann als in der resistenten Wildart *M. robusta*. Ein niedriger 1/ct Wert in *M. robusta* weist auf eine geringere bakterielle DNA Konzentration des Pathogens im Gewebe hin. Dies bestätigt die Vermutung, dass Ea keine optimalen Vermehrungsbedingungen in der Pflanze vorfindet und daher die Ausbreitung auch unterdrückt wird. Dieses Ergebnis ist insofern wichtig, da die molekularbiologischen Untersuchungen ebenfalls darauf hinweisen, dass es sich bei den Abwehrmechanismen von *M. robusta* um konstitutive Mechanismen handelt und nicht um induzierbare Abwehrreaktionen.

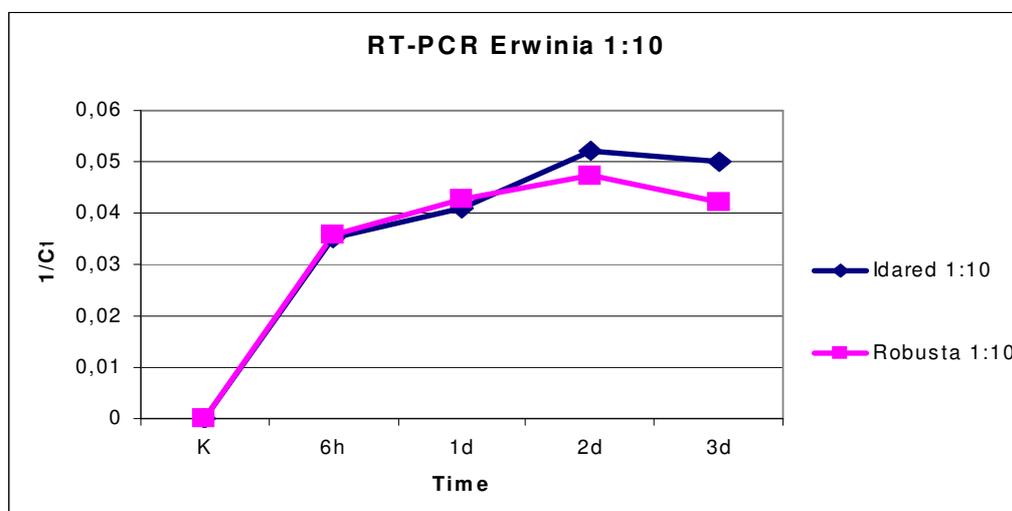


Abb. 2.64: Quantifizierung von Ea aus Sproßspitzen von Idared und *M. robusta*

Für diese Versuche wurde *in vitro* Pflanzenmaterial von Idared bzw. *M. robusta* verwendet. Als Bakterienstamm wurde Ea 295/93 (AGES) eingesetzt. Bakterien wurden in KingB - Medium bei 28° C als Übernachtskultur am Laborschüttler kultiviert.

Die Pflanzen wurden mittels steriler Zahnstocher, welche vorher in die Bakterienkultur getaucht wurden, in die Stängel inokuliert. Die Pflanzenstängel wurden 6 h, 1, 2 und 3 Tagen nach der Inokulation beprobt. Die Stängel wurden in ca 0,5 cm Länge geschnitten, in drei Sektionen geteilt und bei -80° C bis zur Analyse eingefroren. Vor der Analyse wurden die Stängel in 500 µl Wasser für ca. 15 - 30 min gespült. Dieses Eluat wurde für die real-time PCR verwendet, wobei jeweils 1 µl Probe mit Verdünnungen von 1 : 10 und 1 : 50 verwendet wurde. Die Arbeiten wurden nach der von Salm und Geider (2004) beschriebenen Methode durchgeführt. Die Oligonukleotide zur Identifizierung von Ea nach Salm und Geider sind in Tabelle 2.2 angeführt. Die PCR-Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µl mit Ea und 1 unit Taq Polymerase (BD Biosciences Clontech) durchgeführt. Das PCR-real-time Programm wurde gestartet mit 95° C für 2 min, es folgten 40 Zyklen bei 95° C für 30 s, 60° C für 15 s und Elongation bei 72° C. Das PCR Produkt wurde auf einem Agarose-Gel (2%) aufgetrennt.

Oligonucleotide	Sequence (5'-3')
Tm	
P29T - for 55° C	CACTGATGGTGCCGTTG
P29T - rev 56° C	CGCCAGGATAGTCGCATA

Tab. 2.2: Oligonucleotides für die Identifizierung von *Erwinia amylovora*

Real-time PCR assays

Die PCR wurde mit dem quantitativen iQTM SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) und nach den Angaben der Hersteller durchgeführt. Die

Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 25 µl durchgeführt. Die Proben wurden dreifach bestimmt. Weiters wurde eine Verdünnungsreihe von Ea 295/93 als Standard inkludiert. Das PCR Programm wurde mit der Polymeraseaktivierung bei 95° C für 3 min gestartet, gefolgt von 40 Zyklen bei 95° C für 30 s, 60° C für 45 s und Elongation bei 72° C. Diese Produkte wurden mit verschiedenen Schmelzpunktprogrammen und mehreren Denaturierungsschritten weiters analysiert.

Die PCR-Primer wurden mittels klassischem PCR assay verifiziert, wobei in allen Fällen jeweils nur eine einzige Bande von mehr als 100 bp im Agarosegel erhalten wurde. In der Real-time PCR wurden die beiden spezifischen Pathogenprimer verwendet. Die Amplifikation wurde mit SYBR Green detektiert. Das Fluoreszenz-Signal wurde mit bekannten Ea 295/93 - Zellkonzentrationen quantifiziert. Die Standardkurve wurde mittels fünf bekannten Zellkonzentrationen von Ea ermittelt. Um unbekannte Bakterienmengen zu quantifizieren, wurden Schmelzpunktkurven analysiert, um definierte Amplifikationsanzahlen zu bestimmen. Nur ein einziger Peak wurde in der Schmelzpunktkurve bestimmt, so dass sichergestellt werden kann, dass keine anderen unbestimmten Produkte amplifiziert wurden.

3 Differentielles Screening

3.1 Apfel-cDNA-SSH-Bibliothek (mittels CLONTECH PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit, sowie SMART cDNA Library Construction Kit)

Das differentielle Screening soll Gene detektieren, welche in der feuerbrandresistenten Wildapfelart und der anfälligen Kulturapfelsorte „Idared“ nach Inokulation mit Feuerbrand entweder up- oder downreguliert werden. Mittels cDNA-SSH-Bibliothek können Gene isoliert werden, welche in der resistenten, aber nicht in der anfälligen Apfelsorte exprimiert werden. Je 36 *in vitro* Apfelsprosse (Kulturmedium: MS BAP 1 mg/l, IBA 1 mg/l) wurden mit dem Ea - Standardstamm der AGES (295/93) in einer Konzentration von 10^8 cfu sowie mit Nährmedium (King B) behandelt. Nach 24 Stunden wurden die Proben in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C bis zur Isolierung der mRNA gelagert. Nach der Methode von Chang *et al.*, (1993) konnten große RNA-Mengen (3 µg RNA) isoliert werden. Zur weiteren Auftrennung von mRNA (Poly-A⁺) wurde eine Selektion mit Magnetic Beads durchgeführt. Mittels reverser Transkriptase wurde die mRNA in cDNA transkribiert und mit dem Restriktionsenzym (RsaI) verdaut. Die weiteren Schritte sind in der Abbildung 3.1 dargestellt. Die Hybridsequenzen wurden entfernt. Die verbleibenden nichthybridisierten cDNAs repräsentieren Gene, welche in der inokulierten resistenten *M. robusta* und in der kontrollbehandelten, resistenten *M. robusta* exprimiert wurden. Parallel dazu wurde eine zweite Genbank von der anfälligen Sorte Idared angelegt, welche ebenfalls wie *M. robusta* behandelt wurde. In einem zweiten Hybridisierungsschritt wurden die differentiell exprimierten Sequenzen angereichert. In einem anschließenden PCR-Schritt wurden diese Sequenzen amplifiziert. In einer zweiten PCR-Runde wurde der Hintergrund reduziert und die differentiell exprimierten Sequenzen nochmals angereichert.

I. Introduction *continued*

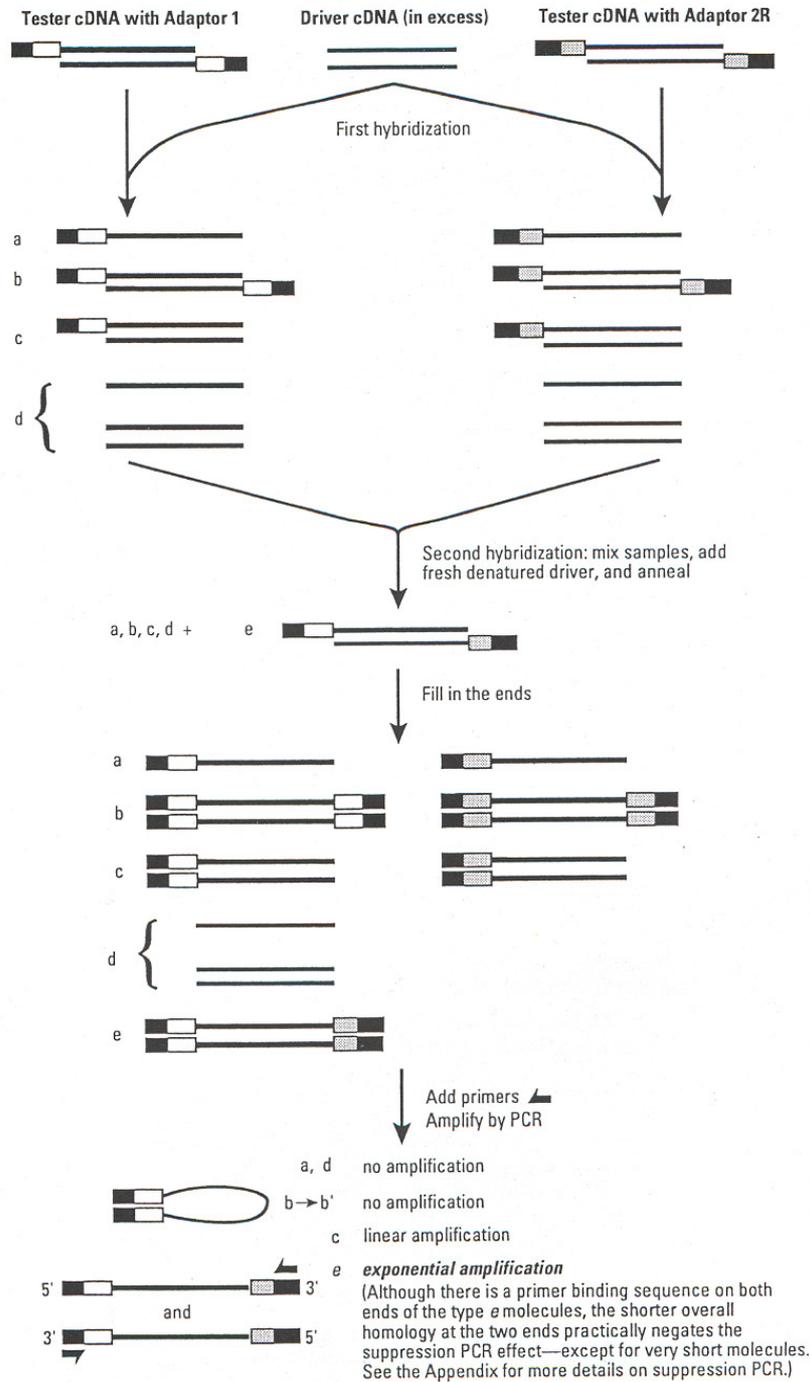


Abb. 3.1: cDNA-Substraktion

Im Zuge der umfangreichen Arbeiten zum differentiellen Screening waren verschiedene Optimierungsschritte notwendig. Verschiedene PCR-Polymerasen wurden getestet: Dynazym/(Finnzym), HOTSTAR (Quiagen), HOTFIRE (Solis Biodyne). Zusätzlich wurden verschiedene PCR-Primer (M13 und nested Primer) getestet. Die nested Primer gaben stärkere und deutlichere DNA-Banden. Insgesamt konnten ca. 4.000 Genfragmente mit einer Größe zwischen 400 und 800 bp isoliert werden. Zur Herstellung der einzelnen PCRs und zur entsprechenden Verdünnung wurde der Pipettierroboter (TECAN) verwendet, wobei unerwartet große Schwierigkeiten auftraten. In den Abb. 3.2 sind die Ergebnisse der Verdünnungen und die daraus resultierenden PCRs im Agarosegel ersichtlich. Es zeigte sich, dass die einzelnen Fragmente in ihrer Bandenstärke sehr inhomogen waren. Hingegen ergaben die Verdünnungen, welche manuell durchgeführt wurden, wesentlich stärkere und bessere Ergebnisse hinsichtlich Intensität der PCR-Produkte. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass die DNA sehr viskos war und beim Pipettierroboter an der Wand bzw. am Boden der Reaktionsgefäße nach Eppendorf kleben blieb.

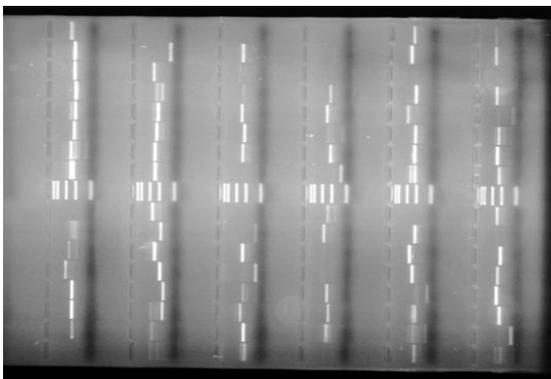
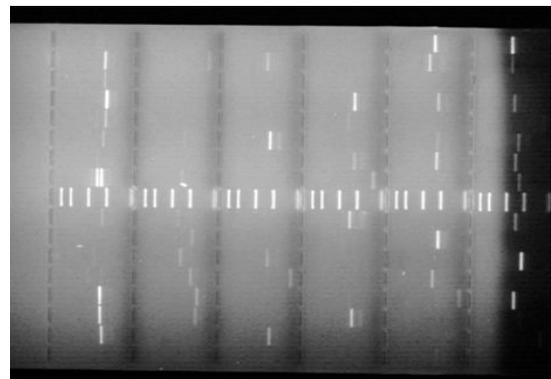


Abb. 3.2:

Idared-Reverse : Manuelle Verdünnung und PCR



Idared: Verdünnung und PCR mit dem Roboter

Zur weiteren Charakterisierung der Genfragmente werden diese im Herbst auf Mikroarrays aufgespottet und mit den mRNAs der Kontrolle als auch jener der inokulierten Apfelsprosse (welche in cDNA transkribiert wurden) hybridisiert. Dieses Vorscreening soll die Anzahl der Sonden einerseits verifizieren als auch in ihrer Anzahl reduzieren. Nach dieser Verifizierung werden die Gensonden zur weiteren Sequenzierung ausgewählt.

3.1.1 Ergebnisse des 3. Berichtsjahrs

Vier subtraktive cDNA-Bibliotheken wurden nach dem Protokoll von Clontech PCR-select cDNA subtraction kit #637401 hergestellt. Aus jeder Bibliothek wurden 1.000 Klone gewonnen, wobei die Plasmid DNA direkt aus den Bakterienkolonien mit TempliPhi Amplifikation erzeugt wurden. Die Fragmente wurden mittels FireHot - Polymerase und M13 primers vermehrt (Abb. 3.3). Die 4.000 amplifizierten Fragmente wurden für das Microarray spotting verwendet. Insgesamt wurden 35 Slides gespottet.

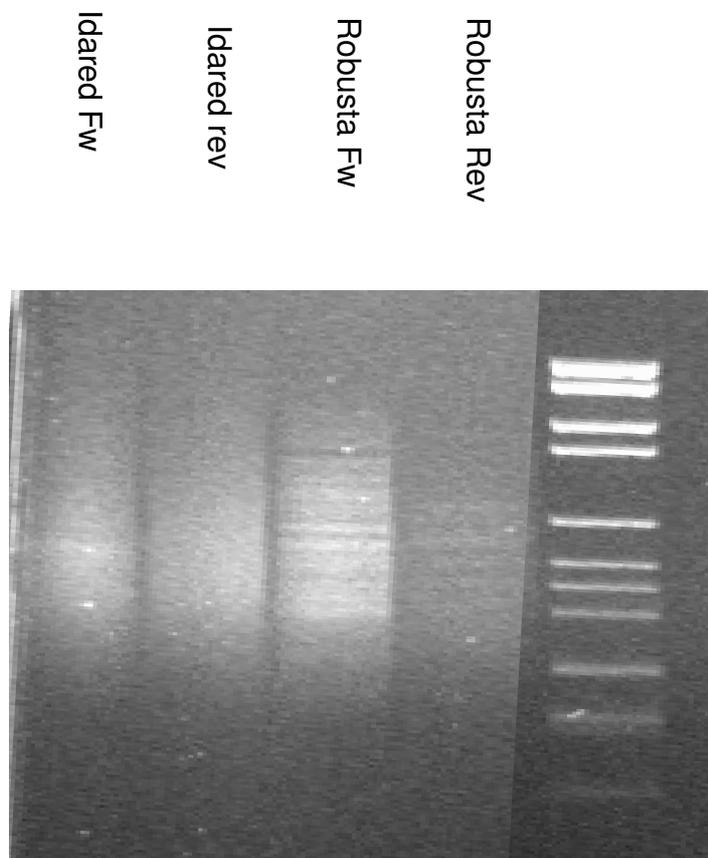


Abb. 3.3: Amplifizierung der subtraktiven Sequenzen

Robusta Forward RoF:

Robusta Reverse RoR:

Tester: infected Robusta mRNA

Tester: control Robusta mRNA

Driver: control Robusta mRNA

Driver: infected Robusta mRNA

Idared Forward IdF:

Idared Reverse IdR:

Tester: infected Idared mRNA

Tester: control Idared mRNA

Driver: control Idared mRNA

Driver: infected Idared mRNA

Verschiedene Hybridisierungsmethoden mit zwei verschiedenen Labelling Methoden wurden getestet. Als Labelling Methoden wurde einerseits eine direkte Markierungsmethode nach Invitrogen mit Alexa-Farbstoffen, sowie die indirekte Methode (Ambion Allyl MessageAmp) mit Cy-Farbstoffen erprobt. Als Hybridisierungsmethoden wurde die Tecan Hybridisierungs-Station mit 120 µl Probenvolumen für 14 Stunden bei 42° C, sowie der PCR - Hybridisierungs-Turm bei gleicher Temperatur und gleicher Zeit verwendet. Die Waschschritte wurden manuell durchgeführt. Die Hybridisierungen wurden in zwei Probenkonzentrationen durchgeführt, 2 µg markierte Probe/120 µl und 2 µg/330 µl. Beim Hybridisierungsturm wurden selbstklebende Hybridisierungskammern mit einem Volumen von 330 µl verwendet.

Die Abbildung 3.4 zeigt die unterschiedlichen Qualitäten der verschiedenen Labellingmethoden, wobei die indirekte Methode (Ambion) mit den Cy-Farbstoffen wesentlich brauchbarere Ergebnisse lieferte. Auch ist der Background geringer und die Intensität des Labellings besser, da Rot-Grün-Farben besser unterscheidbar sind.

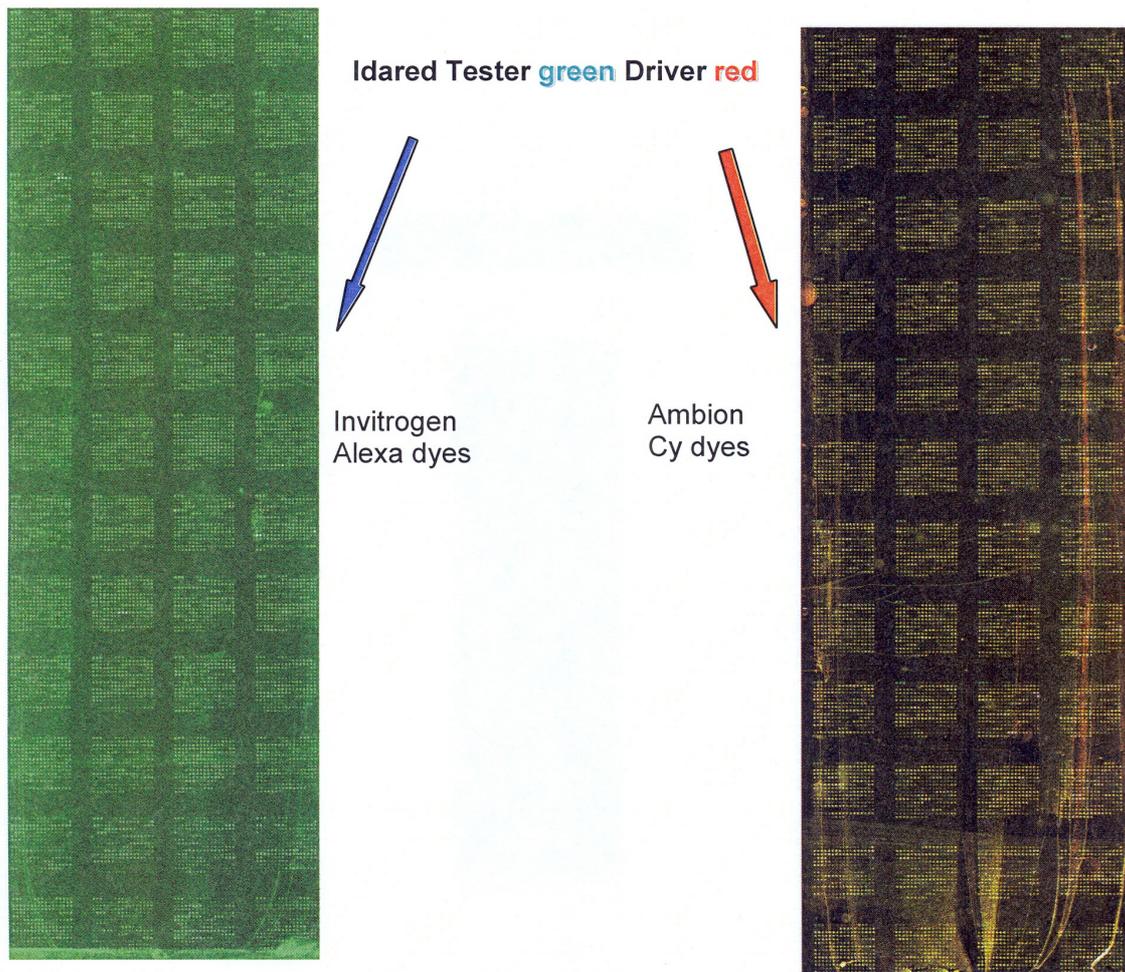


Abb. 3.4: Ergebnisse der verschiedenen Markierungsmethoden

Die Auswertung der verschiedenen Hybridisierungsmethoden (Tecan versus Tower) zeigte (Abb. 3.5), dass beide Methoden für gute Hybridisierungsergebnisse geeignet sind, dies jedoch von der RNA-Menge abhängt. Bei zu großen RNA-Mengen kommt es zu größeren Abweichungen und daher zu einer schlechteren Auswertung. Diese Ergebnisse sind auch stark von den verschiedenen Labelling-Kits abhängig.

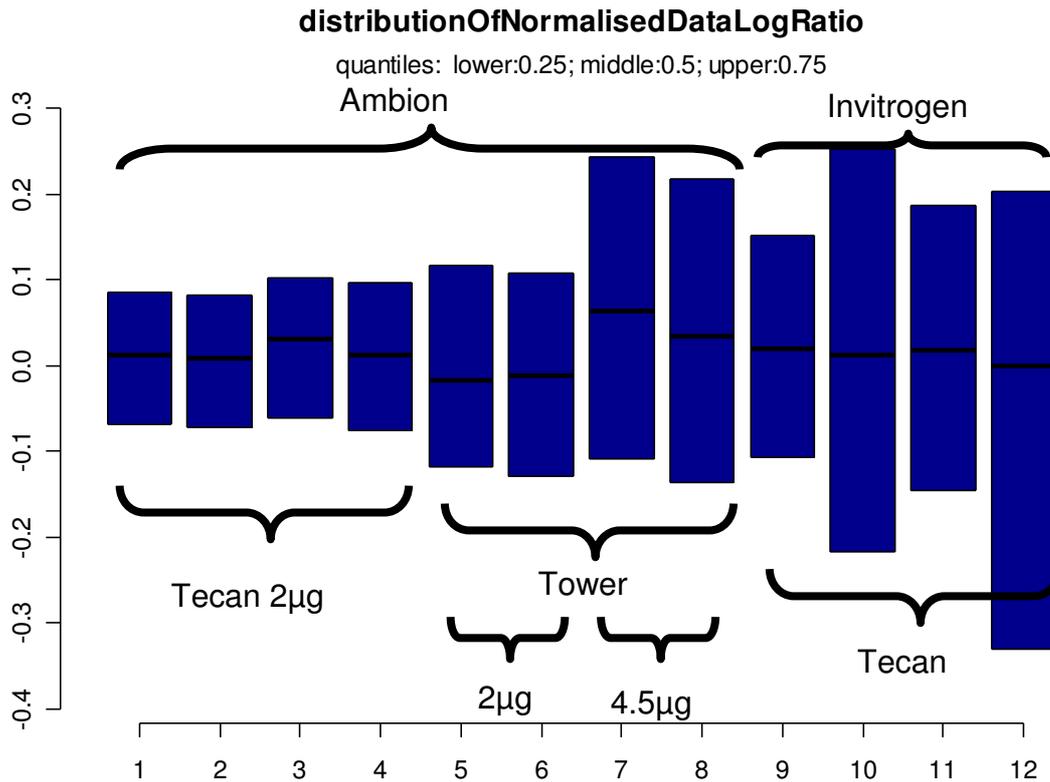


Abb. 3.5: Ergebnisse der Hybridisierungs- und Labellingmethoden

Die Auswertung der einzelnen Genfragmente hinsichtlich Up- oder Downregulierung nach der erfolgten Hybridisierung mit dem automatischen R conductor Expressionsanalyse Programm (Freeware) ergab, dass nur neun der 4.000 getesteten Klone eine interessante Expression (Up- oder Downregulierung) aufweisen. Nach Überprüfung dieser Ergebnisse und manueller Auswertung des Hybridisierungssignals zeigte sich, dass diese Ergebnisse jedoch nicht relevant sind.

Aus Mangel anderer Softwareauswertesysteme wurden daher die einzelnen Spots in zweiwöchiger Arbeit manuell analysiert. Falsche Spots wurden ausgeschieden, z. B. von drei Wiederholungen mindestens zwei gleiche Ergebnisse. Weiters wurde die Expression der Verhältnisse von Cy5 (Rot) zu Cy3 (Grün) ($635/5320$) < 0.5 downreguliert oder zwischen einem Verhältnis $> 1 - 1,5$ upreguliert auf Plausibilität überprüft. In Abbildung 3.6 werden die ausgewählten Klone dargestellt. Die meisten Klone fallen in Expressionsbereiche mit nur geringen Unterschieden, wo weder Up- oder Downregulierung festzustellen ist.

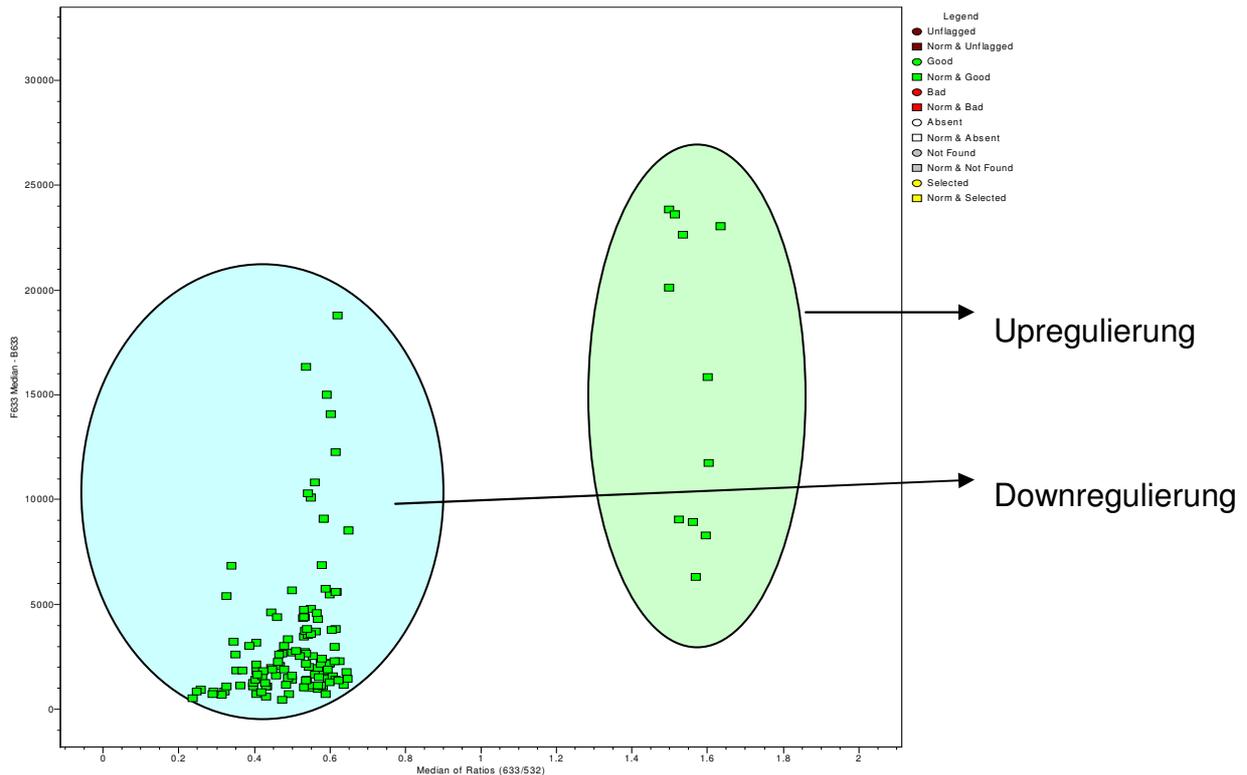


Abb. 3.6: Expressionsunterschiede der Apfel-SSH-Klone

Insgesamt wurden 10 putativ differentiell exprimierte Klone isoliert und in weiterer Folge sequenziert. Die Sequenzen dieser Gene sind teilweise ähnlich zu bereits bekannten Stressgenen (Tabelle 3.1). Jeweils fünf dieser Sequenzen stammen von *Idared* und fünf kommen aus *Malus robusta*. Zwei dieser aus *Idared* stammenden Sequenzen weisen keine Homologien zu bereits bekannten Genen auf. Aus *M. robusta* wurden zwei Gene aus dem Auxinstoffwechsel sowie Gensequenzen mit Homologien zu Trockenstress-Proteinen isoliert.

Als weiterführende Arbeiten sollen einzelne Genfragmente ausgewählt werden und diese mittels Real time-PCR in einem Inokulationsexperiment auf ihre Expression überprüft werden.

Slide	Name	Median of Ratios	Hybr	Blast	Score
59	RO_R_A6_47	3.120	RoECy3-RoKCy3	>gil92873495 gb ABE81934.1 Kunitz inhibitor ST1-like [M	Score = 106 bits (264), Expect = 4e-22
59	RO_R_A6_47	3.341		Kunitz inhibitor ST1-like	
59	RO_R_A6_47	3.607			
65	RO_R_A6_47	2.630	RoECy3-RoKCy5		
65	RO_R_A6_47	2.718			
65	RO_R_A6_47	2.939			
61	RO_R_A6_47	0.325	RoKCy3_RoECy5		
61	RO_R_A6_47	0.337			
61	RO_R_A6_47	0.344			
67	RO_R_A6_47	0.23	RoKCy3_RoECy5		
67	RO_R_A6_47	0.245			
67	RO_R_A6_47	0.273			
62	RO_R_A6_73	1.919	IdECy3-IdKCy5	auxin down regulated	
62	RO_R_A6_73	2.119		>gil296442 emb X69640.1 GMADR11A	Score = 165 bits (83), Expect = 2e-37
62	RO_R_A6_73	2.145			
63	RO_R_A6_73	0.518	IdECy5-IdKCy3		
63	RO_R_A6_73	0.54			
63	RO_R_A6_73	0.573			
72	RO_R_A6_73	0.459	IdECy5-IdKCy3		
72	RO_R_A6_73	0.565			
63	RO_R_A7_33	0.461	IdECy5-IdKCy3	>gil641903 gb AAB06586.1 putative nonspecific lipid trans	Score = 53.1 bits (126), Expect = 8e-06
63	RO_R_A7_33	0.5		putative nonspecific lipid transfer; auxin induced gene	
63	RO_R_A7_33	0.61			
72	RO_R_A7_33	0.454	IdECy5-IdKCy3		
72	RO_R_A7_33	0.572			
72	RO_R_A7_33	0.672			
Slide	Name	Median of Ratios	Hybr	Blast	Score
63	ID_F_A7_79	0.588	IdECy5-IdKCy3	No homology	
63	ID_F_A7_79	0.64			
72	ID_F_A7_79	0.505	IdECy5-IdKCy3		
72	ID_F_A7_79	0.57			
72	ID_F_A7_79	0.663			
63	ID_F_A7_89	0.536	IdECy5-IdKCy3	No seq.	
63	ID_F_A7_89	0.563			
63	ID_F_A7_89	0.583			
72	ID_F_A7_89	0.581	IdECy5-IdKCy3		
72	ID_F_A7_89	0.632			
63	ID_F_A9_80	1.539	IdECy5-IdKCy3	>gil70779677 gb AAZ08315.1 putative beta-expansin [Euc	Score = 179 bits (454), Expect = 3e-44
63	ID_F_A9_80	1.641		putative beta-expansin	
63	ID_F_A9_80	1.709			
72	ID_F_A9_80	1.512	IdECy5-IdKCy3		
72	ID_F_A9_80	1.594			
72	ID_F_A9_80	1.644			
62	ID_R_A10_90	0.629	IdECy3-IdKCy5	No homology	
62	ID_R_A10_90	0.641			
63	ID_R_A10_90	1.578	IdECy5-IdKCy3		
63	ID_R_A10_90	1.695			
63	ID_R_A10_90	1.708			
72	ID_R_A10_90	1.507	IdECy5-IdKCy3		
72	ID_R_A10_90	1.583			
63	ID_R_A5_59	0.645	IdECy5-IdKCy3	>gil32879790 dbj AB077442.2	Score = 969 bits (489), Expect = 0.0
63	ID_R_A5_59	0.647		U alus x domestica SAMDC mRNA for S-adenosylmethionine decarboxylase	
72	ID_R_A5_59	0.535	IdECy5-IdKCy3	S-adenosylmethionine decarboxylase	
72	ID_R_A5_59	0.546			
63	RO_R_A1_41	0.592	IdECy5-IdKCy3	>gil416639 sp P32292 ARG2_PHAAU Indole-3-acetic acid	Score = 72.8 bits (177), Expect = 6e-12
63	RO_R_A1_41	0.617		Indole-3-acetic acid-induced protein ARG2	
63	RO_R_A1_41	0.623		>gil56900730 gb AAW31666.1 putative late-embryogenes	Score = 75.9 bits (185), Expect = 7e-13
72	RO_R_A1_41	0.587	IdECy5-IdKCy3	putative late-embryogenesis protein-like protein	
72	RO_R_A1_41	0.643			
72	RO_R_A1_41	0.652			
62	RO_R_A2_27	1.591	IdECy3-IdKCy5	auxin down regulated	
62	RO_R_A2_27	1.646		>gil296442 emb X69640.1 GMADR11A	Score = 165 bits (83), Expect = 2e-37
62	RO_R_A2_27	1.689		U Gax ADR11 mRNA	
72	RO_R_A2_27	0.567	IdECy5-IdKCy3	>gil48375046 gb AAT42190.1 putative proline-rich protein	Score = 87.0 bits (214), Expect(2) = 8e-26
72	RO_R_A2_27	0.604		putative proline-rich protein	
72	RO_R_A2_27	0.651			

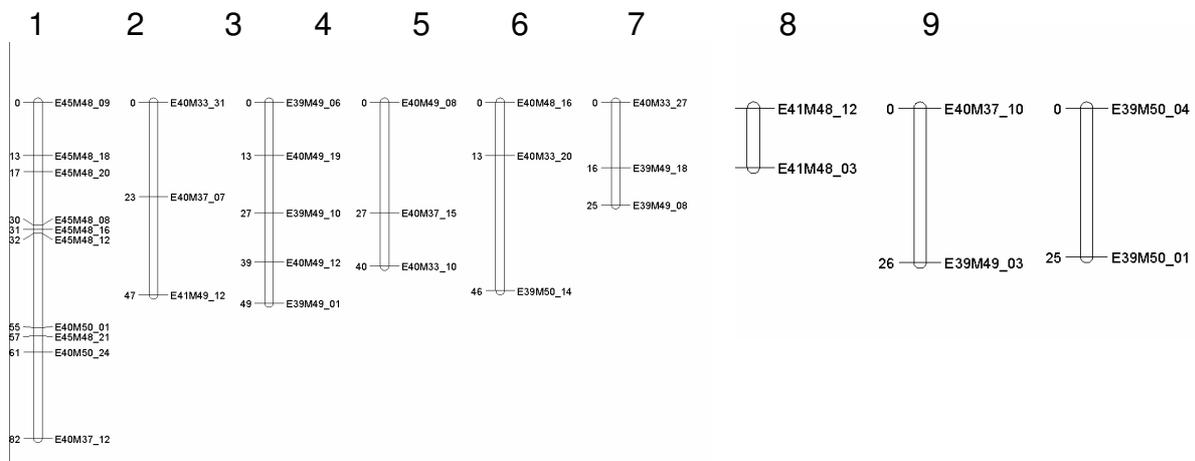
Tab. 3.1: Liste der isolierten Gensequenzen

3.2 Kreuzung, sowie Kartierung mit AFLPs und Mikrosatellitenmarker

Die Arbeiten sind das Ergebnis der engen Kooperation mit dem Institut für Obstforschung der Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen in Dresden - Pillnitz, insbesondere mit Dr. Andreas Peil.

Amplified fragment length polymorphisms (AFLP) wurden eingesetzt, um eine genetische Rahmenkarte der Genome von *M. domestica* (Sorte Idared) und *M. robusta* (Pollenelter) an einer Kartierungspopulation bestehend aus 150 Nachkommen dieser beiden Kreuzungseltern, zu erarbeiten. Die Rahmenkarten (Abb. 3.7) haben momentan 9 (Idared) und 8 (*M. robusta*) Gruppen gekoppelter AFLP-Marker. Jede Gruppe besteht aus 2 - 10 Markern, wobei weitere 40 bzw. 60 Marker vorläufig nicht gekoppelt vorliegen (und nicht in der Rahmenkarte aufscheinen).

Idared linkage map



Malus Robusta linkage map

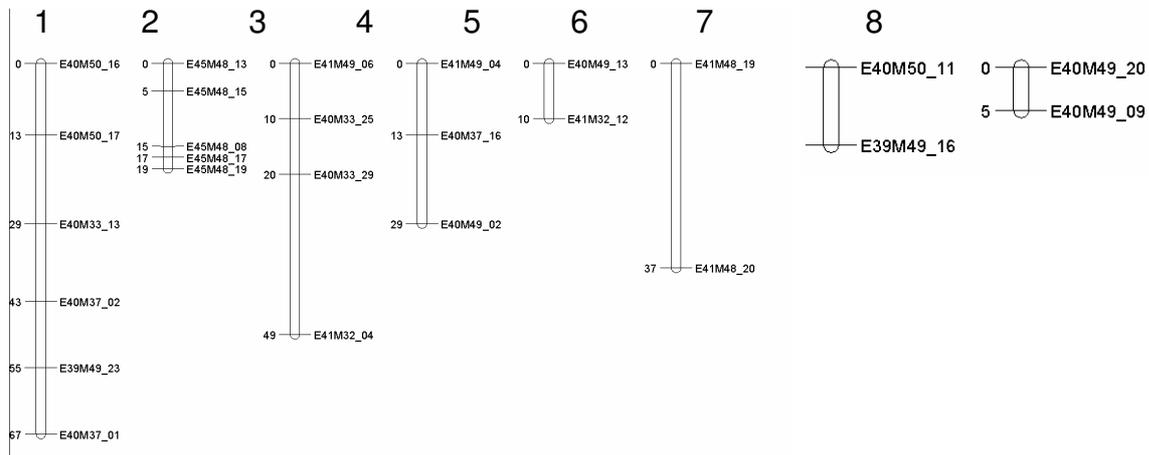


Abb. 3.7: AFLP-Rahmenkarte

3.3 Mikrosatelliten - Marker

Zusätzlich zu den AFLP-Markern wurden weitere molekulare Marker, simple sequence repeats (SSR) oder Mikrosatelliten erfolgreich zur genetischen Identifikation von 16 der 17 individuellen Chromosomen des Apfels eingesetzt. Neben den Kreuzungsnachkommen der Population 04 208 von *Malus robusta* 5 und Idared wurden auch verschiedene Accessionen von *Malus robusta*, *M. fusca* und drei Herkünfte von *M. robusta*, welche aus Amerika stammen, mittels Mikrosatelliten analysiert.

Die DNA-Konzentrationen der beiden Eltern sowie der 150 Nachkommen wurden bestimmt. Von 16 Nachkommen waren zu geringe DNA-Mengen vorhanden, sodass nochmals Blattmaterial von BAZ Dresden - Pillnitz beschafft werden musste. Diese 16 zusätzlichen Nachkommen waren notwendig, da nicht alle 150 Nachkommen der Population 04 208 im Feuerbrand-Sprossinokulationsassay getestet werden konnten. Die genomische DNA wurde isoliert und in zwei 96-well Platten mit DNA-Konzentrationen (5 - 10 ng/μl) der beiden Eltern und 166 Nachkommen getestet.

Insgesamt wurden 78 Mikrosatelliten, welche in der existierenden Linkage Map vom Apfel vorhanden sind, auf ihre Polymorphismen getestet. Dazu wurden die beiden Eltern und vier Nachkommen der Kreuzungspopulation oder 6 Nachkommen ohne Eltern getestet. Die Eltern konnten wegen der geringen DNA-Mengen nicht mit allen Mikrosatellitenmarkern getestet werden. Nur 62 der 78 getesteten SSRs waren in den analysierten Pflanzen polymorph. Diese polymorphen Marker sind nicht gleichmäßig auf den 17 Apfelchromosomen verteilt (Tabelle 3.2). Während drei bis sechs SSRs auf den Linkage Groups 1, 2, 3, 8 -15 lokalisiert sind, gehören nur 1 bis 2 Mikrosatelliten zu den Linkage groups 4, 7, 16 und 17. Keine Mikrosatelliten wurden auf Linkage group 6 gefunden, hingegen 8 Mikrosatelliten finden sich auf Linkage group 5. Drei Mikrosatelliten lokalisiert auf Linkage group 6 wurden auf ihren Polymorphismus getestet, aber kein Marker ergab Fragmente. Nichtsdestotrotz wurden 62 polymorphe Mikrosatelliten gefunden, welche zu 16 der 17 Linkagegruppen von Apfel gehören.

Linkage group	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
MS tested	3	6	4	3	8	3	2	6	4	6	4	8	5	7	4	2	3
MS polymorphic	3	6	4	2	8	-	1	4	4	5	3	6	4	6	3	1	2

Tabelle 3.2: Anzahl der getesteten Mikrosatelliten (MS) und Polymorphismus für jede Linkagegruppe

3.3.1 Austestung der multiplex PCR und Zusammenstellung der Multiplexgruppen

Im ersten Ansatz sollten drei verschiedene Farbstoffe für die Primer getestet werden: jeder Farbstoff für zwei verschiedene Mikrosatelliten in unterschiedlichen Fragmentgrößen und der vierte Farbstoff als Längenstandard. Daher wurden die 62 polymorphen SSRs in 11 Gruppen für das Multiplexing geteilt. Um die Machbarkeit des Multiplexings zu prüfen, wurden alle sechs Primerpaare einer Multiplexgruppe bestellt und getestet. Daher wurden die sechs Primerpaare mit einer Primerlösung gemischt und die PCR-Reaktionen mit den beiden Eltern und den vier Nachkommen durchgeführt (MP2, Abb. 3.7). Die PCR-Produkte wurden auf dem ABIprism 3100 Gene Sequencer aufgetrennt und mittels GeneScan und GenoTyperprogramme analysiert. Interessanterweise stimmen die Fragmentgrößen der MultiplexPCR mit den Fragmentgrößen der einzelnen Primerpaare überein, während die Kombination von zwei Primerpaaren in leicht unterschiedliche Fragmentgrößen resultiert. Neben der Fragmentgröße ist auch die Menge des PCR-Produktes zwischen multiplex und single primer PCR unterschiedlich. Die Menge des PCR-Produktes ist auch für „shadowbands“ verantwortlich. Dies bedeutet, dass ein starkes Signal eines Farbstoffes einen Peak in einem anderen Farbstoff und in einer anderen Kapillare verursachen kann. Ein zusätzliches Problem waren die Unterschiede in der Signalstärke der verschiedenen Farbstoffe. Daher war eine Verdünnungsreihe der PCR-Produkte notwendig. Die Verdünnungen wurden mittels Sequenzierer analysiert. Die Verdünnung von 1 (PCR Product): 75 (Wasser) wurde als optimaler Kompromiss zwischen Signalstärke und Auftreten von Schattenbanden gefunden. Nach dem Test von sechs Primerpaaren mittels Multiplexing (drei Farbstoffe) wurde ein vierter Farbstoff zur Markierung der Primer und ein fünfter Farbstoff als Längenstandard eingesetzt. Acht Mikrosatelliten wurden in einer Multiplex PCR gruppiert und mit einzelnen Primer-PCRs verglichen. Die Ergebnisse waren vergleichbar mit den sechs Primerpaar-multiplex PCR. Daher wurden die verbleibenden 48 MS in 6 Multiplex-Gruppen zusammengefasst, wobei jede Gruppe aus acht Mikrosatelliten besteht. Diese acht MS wurden mit vier verschiedenen Farbstoffen markiert, wobei jeder Farbstoff zwei MS mit unterschiedlich großen Fragmentgrößen repräsentiert.

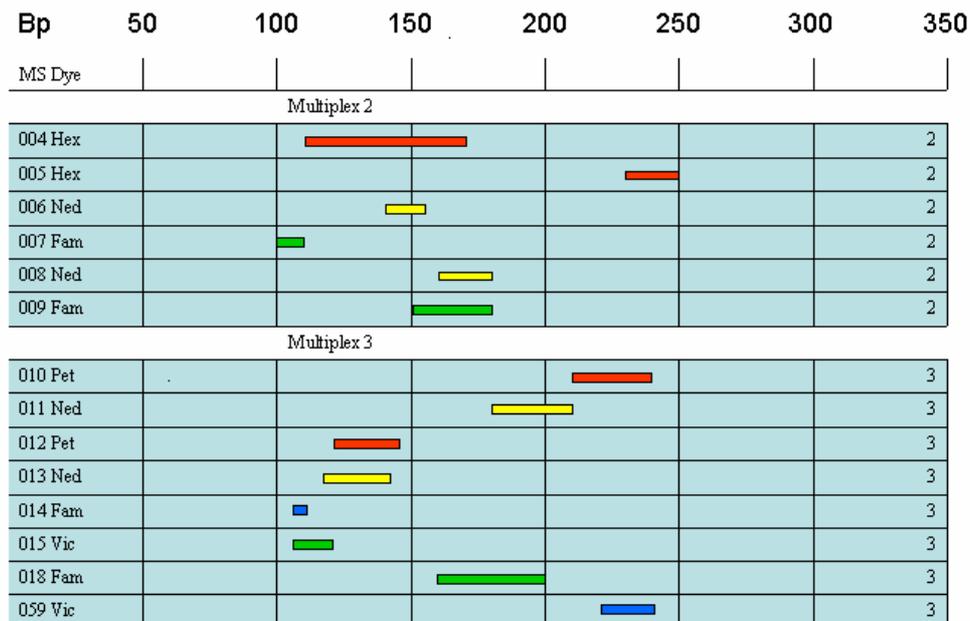


Abb. 3.7: Zusammenstellung der Multiplexe. Die Größe der erwarteten Fragmente sind in farbigen Balken für jeden Mikrosatelliten dargestellt

3.3.2 Multiplex - PCR von allen Individuen und erste Ergebnisse

Die Auswertung der Ergebnisse ist noch nicht abgeschlossen. Bisher konnten die Daten von drei Multiplexreaktionen (1 multiplex mit 6 und 2 multiplexe mit 8 MS) mittels GeneScan and GenoTyper analysiert werden. Ein Marker wurde nicht amplifiziert, aber ein Mikrosatellitenmarker weist zwei Loci auf. Zwei Loci weisen nur zwei unterschiedliche Fragmentgrößen (Allele) auf, 13 Loci zeigen drei Allele und 6 Loci sind durch vier verschiedene Allele repräsentiert. Insgesamt konnten 69 Allele detektiert werden, 8 von ihnen konnten in beiden Eltern gefunden werden.

Veredelungen von Population 04 208 wachsen zurzeit in den Klimakammern in Quedlinburg und werden für die Feuerbrandinokulation vorbereitet. Sobald erste Ergebnisse vorliegen, wird mit der Erstellung der Genkarte begonnen.

Fünf von den 166 Nachkommen konnten als Selbstbestäuber identifiziert werden, und zwei Nachkommen weisen Allele, welche nicht in den Elternpflanzen vorkommen, auf. Dies weist auf Fremdbestäubung hin.

3.3.3 Anwendung eines SCAR (Sequence characterized amplified region) Markers linked mit PI1

Zusätzlich zu den 62 getesteten SSRs wurde auch ein SCAR-Marker, welcher mit dem Mehltreueresistenzgen (PI1) gekoppelt ist, an der Kreuzungspopulation getestet. *Malus robusta* 5 weist den SCAR-Marker PI1 auf, nicht jedoch Idared. Außerdem segregiert dieser Marker in der verwendeten Kreuzungspopulation 04 208.

Die effiziente Hochdurchsatzmethode des Multiplexings mit DNA Analyse im Sequenzierer mit vier parallelen Farbmarkern wurde erstmals erfolgreich am ARC eingesetzt. Insgesamt wurden von 78 SSR Markern, die von Dr. Andreas Peil am BAZ Institut auf Polymorphismus in der Kartierungspopulation getestet worden waren, 62 Marker ausgewählt und an der gesamten Population eingesetzt. Die Reaktionen zur Detektion der Marker wurden auf dem ABI Prism Sequenzierer unter Verwendung der Fluoreszenzfarbstoffe Pet, Fam, Hex, Ned und Vic durchgeführt. Die zu detektierenden SSRs wurden derart gruppiert, dass zwei bzw. drei gleichzeitig detektiert und anhand ihrer unverwechselbaren Fragmentgröße eindeutig identifiziert werden konnten. Durch dieses Multiplexing war es möglich, die Anzahl der durchzuführenden Sequenzierreaktionen von 9450 (im Fall von Einzeldetektion) auf ca. 3000 (maximal 2370, wenn nur Triplets gebildet werden) zu reduzieren und Kosten sowie Arbeitsaufwand entsprechend zu senken. Die Analyse der Daten war relativ unkompliziert, die Mehrzahl der SSRs war eindeutig zuzuordnen, und die Bestimmung der Allele gelang für praktisch alle Nachkommen in der Kartierungspopulation. Zudem war es möglich, unerwünschte Selbstungen und Fehler, die in geringem Umfang bei den vorangehenden vielfältigen Schritten der Aufarbeitung auftreten, zu erkennen und auf diese Weise die Qualität des Ergebnisses zu verbessern.

Zusätzlich wurden weitere AFLP - Marker - Kombinationen vorbereitet (unter Verwendung eines weiteren Restriktionsenzym), deren Detektion bevorsteht. Das Ziel ist, die Rahmenkarte durch Erreichen der Kopplung schon vorhandener, noch ungekoppelter Marker zu verfeinern. Diese Aufgabe beinhaltet die Detektion weiterer AFLP (die schon vorbereitet sind) sowie die rechnerische Integration der SSR

Marker, die wiederum als Indikatoren für die jeweiligen Chromosomen des Apfels dienen. Diese Arbeiten basieren zu 70 % auf bioinformatischen Verfahren.

Mit Hilfe dieser Ergebnisse und der verfeinerten genetischen Karte sollte es noch in diesem Kalenderjahr möglich werden, die Suche nach quantitative trait loci (QTL) für die Interaktion des Apfels mit den Feuerbrandbakterien zu beginnen.

Das Auftreten und die Stärke des Feuerbrandbefalls werden durch die Wechselwirkung zwischen dem Erreger, günstigen Wetterbedingungen und der Empfindlichkeit / Toleranz der Wirtspflanze bestimmt (Thomson, 2000). Es gibt nur begrenzte Möglichkeiten einen Feuerbrandbefall zu kontrollieren. Dabei handelt es sich um Quarantäne und Ausrottung der befallenen Pflanzen, oder die Behandlung mit Antibiotika (verboten in vielen Ländern) (McManus *et al.*, 2002; Norelli *et al.*, 2003).

Präzise QTL Analyse beginnt mit der Erstellung von genetischen Kopplungskarten mit hoher Molekularmarkerdichte und ausreichender Abdeckung des Genoms (Paterson *et al.*, 1988; Darvasi *et al.*, 1993). Seitdem verschiedene genetische Kopplungskarten von Apfelgenomen verfügbar sind, wurden in den letzten 10 Jahren auf dem Gebiet der QTL Analyse erhebliche Fortschritte erzielt (Lawson *et al.*, 1995; Conner *et al.*, 1998; King *et al.*, 2000; King *et al.*, 2001; Liebhard *et al.*, 2002, 2003; Hemmat *et al.*, 1994; Weeden, 1994; Weeden *et al.*, 1994, Calenge *et al.*, 2005, Conner *et al.*, 1997; King *et al.*, 1997; Gianfranceschi *et al.*, 1998; Maliepaard *et al.*, 1998, Maliepaard *et al.*, 1999; Kellerhals *et al.*, 2000; van de Weg *et al.*, 2000).

Für die vergleichende QTL Kartierung ist es hilfreich, wenn genetische Kopplungskarten verschiedener Sorten ähnliche Marker enthalten, um eine Abdeckung in der Karte zu erreichen.

Die Identifizierung von Resistenz QTLs kann durch das Konstruieren einer genomischen Karte für eine spezifisch isolierte F₁ Population und anschließende Bewertung der Resistenz der einzelnen Jungpflanzen erfolgen. Als erster Schritt zur Erstellung einer genetischen Kopplungskarte ist die AFLP Technik (Vos *et al.*, 1995) der angemessenste Ansatz. Mit relativ geringem Arbeits- und Zeitaufwand erlaubt

diese Technik, eine große Menge sicherer Marker zu produzieren, welche weit über das Genom verteilt sind (Vuylsteke *et al.*, 1999; van de Weg *et al.*, 2000; Hurtado *et al.*, 2002). Viele der entwickelten Apfelnarten basieren auf dominanten RAPD und AFLP Markern (Weeden *et al.*, 1994; Conner, 1997). Deswegen ist deren Nützlichkeit für die F₁ Population begrenzt, da sie in dieser entwickelt wurden.

Als zweiter Schritt eignen sich SSR Marker aufgrund ihrer codominanten Erbmasse, ihrer allgemeinen Anwendbarkeit in verschiedenen Laboratorien, ihres hohen Polymorphiegrades und der Tatsache, dass SSRs generell in verschiedenen Apfelsorten konserviert sind. Deshalb besitzen sie viele Vorteile gegenüber anderen Markern für die genetische Kartierung (Guilford *et al.*, 1997; Gianfranceschi *et al.*, 1998; Hemmat *et al.*, 2003; Hokanson *et al.*, 1998; Liebhard *et al.*, 2002, 2003).

Heute existieren keine kommerziellen, feuerbrandresistenten Apfelsorten. Allerdings wird von enormen Variabilitäten unter Apfel Genotypen bezüglich Feuerbrandanfälligkeit und -toleranz berichtet. Über die genetische Basis dieser Toleranzen ist nur wenig Wissen vorhanden (Norelli *et al.*, 2003). Monogenetische Resistenz gegen Feuerbrand wurde bis jetzt in Äpfeln noch nicht identifiziert. Dies liegt daran, dass die Krankheitsresistenz eine quantitative Folge ist (Korban *et al.*, 1988; Brisset *et al.*, 2002; Dondini *et al.*, 2004). Durch die „Quantitative Trait Loci“ (QTL) Kartierung ist es möglich, chromosomale Regionen, welche die quantitativen Folgen kontrollieren, zu identifizieren.

Etliche Krankheitsresistenz - Gene sind in den letzten Jahren (Whitham *et al.*, 1994) aus einer großen Auswahl von Pflanzenarten isoliert worden. Geklonte Genstrukturen weisen einen beachtlichen Ähnlichkeitsgrad auf, wobei spezifisch konservierte domains in der Protein-Protein-Wechselwirkung und der Signalweitergabe (Signaltransduktion) (Staskawicz *et al.*, 1995) eine Rolle spielen. Basierend auf der angenommenen Struktur ihrer Proteinprodukte werden diese Gene in verschiedene Klassen zusammengefasst. Die am häufigsten vorkommende Klasse sind Proteine mit einer vorhergesagten Nukleotid-Bindungsstelle NBS, die an einen C-terminal Leucine-Rich Repeat (LRR) verschiedener Länge angehängt sind. Die konservative Struktur dieser Gene macht es möglich, Primer davon abzuleiten. RGAs, welche häufig in Clustern angeordnet und innerhalb eines einzelnen Clusters

kodiert sind, können Resistenzen gegen verschiedenartigste Krankheitserreger verursachen. Auf der Basis ihrer gebündelten Verteilung und den Ergebnissen von anderen Zell-Zell Erkennungssystemen wurden RGAs als kodiert funktionell und evolutionär verbundene Mitglieder von pflanzlichen Erregererkennungssystemen festgestellt. Ein möglicher Ansatz, um QTLs mit Feuerbrandresistenz zu identifizieren, ist das Integrieren von RGA - Markern in die Karte (Dondini *et al.*, 2002).

Nachfolgend werden zwei genetische Apfelkarten, bestehend aus AFLPs, SSRs, RAPDs und AFLP-RGA (veränderte AFLP Technik, bei der einer der zwei AFLP Primer durch einen RGA Primer ersetzt wird (Hayes *et al.*, 2000), beschrieben. Die Apfelkarte enthält eine Region, wo sich der phänotypische Marker befindet. Dieser Locus ist bereits als Ort für die Feuerbrandresistenz identifiziert.

Materialien und Methoden

Pflanzenmaterial

Es wurde eine segregierte F_1 Population, eine Kreuzung aus den Apfelsorten „Idared“ und „*Malus robusta 5*“ verwendet. ‘*Malus robusta 5*’ wurde als Pollenelternteil und feuerbrandresistente Quelle benutzt. 140 Setzlinge der Bundesanstalt für Züchtungsforschung und Kulturpflanzen, Institut für Obstzüchtung (BAZ) Dresden - Pillnitz wurden zur Untersuchung der Resistenz-Segregationsverteilung und für die Molekularanalyse verwendet.

Analyse des Resistenzphänotyps

Die Feuerbrandresistenz der Nachkommenschaft wurde in Aschersleben (BAZ Institut für Obstzüchtung) in einem Bioassay an gepropften Jungbäumen ermittelt und die Daten wurden dem ARC zur Verfügung gestellt. Die Daten wurden nach Transformation zur Erhöhung der Vergleichbarkeit mit der Normalverteilung einer Segregationsanalyse unterzogen.

DNA Isolierung und Molekulare Marker

Für jeden Genotyp wurden junge Blätter in Flüssigstickstoff gemörsert. Die DNA-Extraktion wurde nach dem Doyle und Doyle-Protokoll durchgeführt (Doyle und Doyle, 1987). Die DNA Qualität wurde in einem Agarose Gel (1 %) getestet. Die Menge wurde durch Verwendung des Gewichtsmarkers MassRuler™ DNA Ladder (Fermentas) bestimmt.

Für die AFLPs wurde ein Aliquot von 500 ng genomischer DNA mit 40 µl Digestion-Ligation Mix vermischt. Der Digestion-Ligation Mix besteht aus 10 µl 5x RL Puffer (50 mM Trisacetat pH 7,5, 25 mM MgCl₂, 250 mM Kaliumacetat, 25 mM DTT, 250 ng/µl BSA), 5 U EcoRI oder PstI (Vos *et al.*, 1995 beziehungsweise Vuylsteke *et al.*, 1995), 5 U MseI, 1 µl EcoRI oder PstI Adapter (5 /µM), 1 µl MseI Adapter (50 /µM), 1 µl ATP (10mM) mit Wasser auf ein Reaktionsvolumen von 40 µl verdünnt. Der Ansatz wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert. Danach wurde ein Teil auf ein Agarose Gel (1,5 %) aufgetragen. Der Rest des Verdau wurde mit 120 µl TE0.1 (10 mM Tris-HCl, pH 7,6 und 0,1 mM EDTA) verdünnt und bei -20 °C gelagert.

Die darauf folgende Preamplifikation wurde aus jeweils zwei Primern, EcoRI 01 oder Pst00 und Mse01 oder Mse02 hergestellt. Die Reaktion ist mit 5 µl der Ligation-Digestion DNA Produkte, 0,25 mM dNTPs (Invitrogen), 45 ng EcoRI 01 (oder Pst00) Primer + 45 ng Mse 01 oder Mse 02 und 2 U der DyNAzyme Polymerase und 1 x Puffer (Finnzymes) durchgeführt worden. Die PCR Reaktion erfolgte in einem GeneAmp PCR 9700 Thermocycler (Applied Biosystems). Die PCR Produkte wurden in einem 1,5%igem Agarose Gel aufgetrennt.

Anschließend wurde die Selektive Amplifikation mit 2 µl der Preamplifikation durchgeführt. Das Reaktionsvolumen betrug 20 µl. Der 1 x Puffer (Gold Puffer Applied Biosystems oder Fire Puffer Solis Biodyne) wurde mit 3 mM MgCl₂ (Gold Applied Biosystems oder Fire Pol Solis Biodyne), 0,2 mM dNTPs (Invitrogen) und 30 ng E+NNN oder P+NNN sowie M+NNN Primer vermischt. Jeder dieser Primer hatte drei selektive Nukleotide. Der M+NNN Primer ist mit 6 FAM an seinem 5' Ende gekennzeichnet worden. Als Primerkombinationen wurden 5 U von Gold Polymerase Taq für EcoRI-MseI sowie 5 U von Fire Gold Polymerase für PstI-MseI verwendet.

Die Preamplifikation und Selektive Amplifikation PCR Programme werden im Anhang beschrieben. Insgesamt wurden 120 AFLP Primer-Kombinationen auf Vorkommen und Häufigkeit von polymorphen (d.h. kartierbaren) Markern an einer geringen Anzahl der Nachkommen getestet. Im Ergebnis dieses Polymorphietests wurden 24 (6 Eco-Mse; 17 Pst-Mse) Primerkombinationen mit je mindestens 3 polymorphen Banden (Markern) ausgewählt und an der gesamten Kreuzung „Idared x *Malus robusta* 5“ Kreuzungspopulation angewendet.

Die besonders veränderte AFLP Technik, AFLP-RGA genannt, besteht aus den gewöhnlichen AFLP Protokollen. 2 µl der Preamplifikation von EcoRI oder PstI + MseI selektive Primer sind für eine selektive Amplifikation mit einem spezifischen RGA Primer benutzt worden. Die RGA Primer werden in der Tabelle 3.5 im Tabellenverzeichnis gezeigt (Trognitz, 2002). Elf AFLP-RGA Primerkombinationen wurden in der Kartierung der F1 Population analysiert.

Insgesamt wurden 78 single sequence repeat (SSR) Marker auf Funktionalität in der kartierten Population unter Verwendung von fluoreszierendem Farbstoff (Qiagen Multiplex PCR Kit, Qiagen, Hilden Germany) getestet. Davon wurden 68 Marker, die polymorph waren, für die Kartierungsarbeiten verwendet. Das PCR Programm wurde mit den nachfolgend beschriebenen Parametern durchgeführt (Tabelle 3.6).

Insgesamt 5 Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) Marker sind getestet worden (Tabelle 3.7). Die PCR Amplifikation wurde im PTC 100 Thermocycler unter folgenden PCR Konditionen durchgeführt: 1 x Puffer (Fire Pol, Solis Biodyne), 1,5 mM MgCl₂ (Fire Pol, Solis Biodyne), 0,2 mM dNTPs, 0,6 µM Primer, 50 ng DNA, 0,5 U Fire Pol Taq Polymerase (Solis Biodyne) mit Wasser auf ein Volumen von 22,0 µl verdünnt. Das PCR Programm wurde mit den nachfolgend beschriebenen Parametern durchgeführt (Tabelle 3.8).

Elektrophorese und Färbung der Gele

Die insgesamt 0,5 µl vom selektiven Amplifikationsprodukt sind aus 1,0 µl Hi- Di Formamidpuffer (Applied Biosystems, Forster City, CA). und 0,3 µl GeneScan 500 Size Standard (Applied Biosystems, Warrington, UK) hergestellt worden. Daraufhin folgte eine Denaturation (3 Min bei 95 °C). Die Elektrophorese wurde in einem automatisierten AB 3100 sequencer (Applied Biosystems) durchgeführt. Die AFLP- und AFLP-RGA - Fragmente sowie die Mikrosatelliten-Fragmente als codominante Marker wurden unter Anwendung der Fragment-Analyse-Software „Gene-scan“ und „Genotyper“ ausgewertet.

Die RAPD Fragmente wurden in einem 1,5 %-igen Agarose getrennt. Die PCR-Produkte wurden mit Ethyidium-Bromid eingefärbt und unter UV-Licht visualisiert. Die Fragmentgröße wurde mit dem Gewichtmarker FastRuler DNA Ladder Middle Range (Fermentas) verglichen.

Kartierungs-Prozess

Die genetischen Kopplungskarten wurden über die Programme Joinmap V3.0, (van Ooijen, 2000) unter Anwendung der Kosambi Kartierungsfunktion und dem LOD-Wert 4 (van Ooijen, 1999), um die verschiedenen Kopplungsgruppen zu identifizieren, sowie nachfolgend dem QTL-Cartographer V2,5 und MapQTL V4,0 (van Ooijen *et al.*, 2002), erstellt. Die Kartierungspopulation und die Phänotyp-Daten wurden vom Projektpartner aus Dresden - Pillnitz zur Verfügung gestellt.

Ergebnisse und Diskussion

Die genetische Kopplungskarte von Idared enthält: 152 polymorphe Marker, davon 90 AFLPs (von denen 57 % 1 : 1 und 43 % 3 : 1 segregierten) 1 AFLP-RGA (Pst001-BULB-174, Chromosom 11), 59 SSRs (Mikrosatelliten), 1 RAPD (OPE19-500, Chromosom 14), sowie 1 SCAR (AT20-SCAR, Chromosom 12). Die Karte hat eine Gesamtlänge von 977 cM mit einer mittleren Entfernung zwischen den Markern von 6 cM. Insgesamt wurden 16 von allen 17 Chromosomen im haploiden Satz des Apfelgenoms detektiert. Es fehlt Chromosom 6, weil von den drei getesteten

Chromosom-6-spezifischen Mikrosatelliten in der Population Idared x *M. robusta* 5 keiner polymorph war.

Die genetische Kopplungskarte von *M. robusta* 5 enthält 158 polymorphe Marker, darunter 99 AFLPs (64 % 1 : 1 und 36 % 3 : 1), 1 AFLP-RGA (EcoMse01-NBS-2-79, Chromosom 16), 55 Mikrosatelliten-Marker, 1 RAPD (OPE19-390), 1 SCAR (AT20-SCAR, Chromosom 12) und den Marker des Feuerbrand-Resistenz Phänotyps FB05 (auf Chromosom 3). Die Karte hat eine Länge von 796 cM und der mittlere Abstand zwischen je zwei benachbarten Markern beträgt 5 cM. Diese Kopplungskarte enthält 15 von den 17 Kopplungsgruppen. Chromosom 7 fehlt, weil kein Marker gefunden wurde, der mit dem Chromosom-7-spezifischen Mikrosatellit-Marker CH04E05 gekoppelt war.

Die Feuerbrandresistenz wurde als genetischer Locus kartiert, nachdem bekannt geworden war, dass die Segregation deutlich dem erwarteten Muster für ein dominantes Hauptgen entspricht. Anfängliche QTL Kartierung hatte diese Hypothese unterstützt, es wurde jeweils ein einziger QTL gefunden in dem Bereich des Genoms, der der Lage des hier gezeigten genetischen Locus entspricht (hier nicht gezeigt). Nach den vorläufigen Ergebnissen befindet sich der Locus für Feuerbrand-Resistenz in der *M. robusta* 5 Karte am distalen Ende des Chromosoms 3, in einer genetischen Distanz von 8 cM zum nächsten genetischen Marker (AFLP Marker P12M32-226, vgl. Abb. 3.10). Der am nächsten liegende Mikrosatellit-Marker (CH03E03) ist 12 cM entfernt. Nach dem Ergebnis des Kruskal-Wallis Tests für die Assoziation des Resistenzphänotyps mit dem Genotyp ist dieser Marker am wahrscheinlichsten mit dem Resistenzlocus gekoppelt.

Ein QTL für Feuerbrandresistenz wurde auch von Calenge *et al.* (2005) auf der Karte der Sorte Fiesta in der Kreuzung Prima x Fiesta an vergleichbarer Stelle wie in *M. robusta* 5 detektiert. Es ist an diesem Punkt jedoch spekulativ zu fragen, ob die beiden Loci identisch oder benachbart sind.

Beide Marker (P12M32-226 und CH03E03) sind aufgrund ihrer relativen Nähe zum Feuerbrand-Resistenz-Locus in *M. robusta* 5 bedingt als Marker für eine eventuelle Selektion in Erwägung zu ziehen. Jedoch ist die genetische Distanz zu groß, um ein

praktisch einsetzbares Verfahren der Markerselektion jetzt schon einzuführen. Die Suche nach weiteren Markern mit größerer Kopplung zur Resistenz sollte fortgesetzt werden.

Anhang

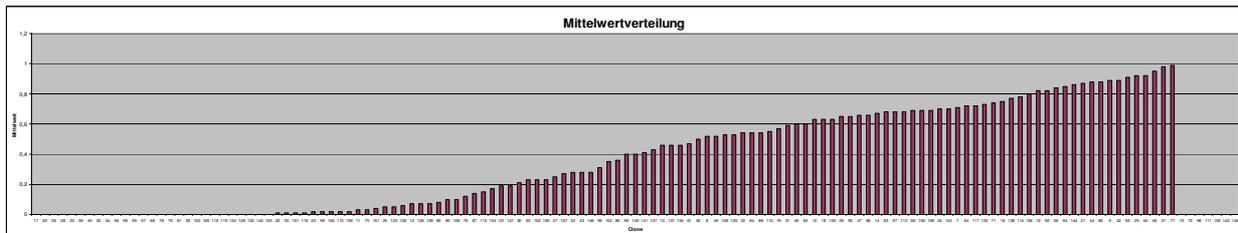


Abb. 3.8: Phenotypische Daten der Kartierungspopulation

	Temperatur	Zeit	
I	94 ° C	1 Min	
II	94 ° C	30 Sek	
III	56 ° C	60 Sek	Zurück zum Schritt II 25 Zyklen
IV	72 ° C	60 Sek	
V	4 ° C	∞	
VI	Ende		

Tabelle 3.3: Preamplifikation: PCR-Programm

Schritt	Temperatur	Zeit	
I	94 ° C	5 Min	
II	94 ° C	30 Sek	
III	65 ° C	30 Sek	1 ° C pro Zyklus herabgesetzt
IV	72 ° C	2 Min	Zurück zum Schritt II (9 x)
V	94 ° C	30 Sek	
VII	56 ° C	30 Sek	
VII	72 ° C	2 Min	Zurück zum Schritt II 9 Mal
VIII	60 ° C	30 Min	
IX	4 ° C	∞	
XI	Ende		

Tabelle 3.4: Selektive Amplifikation: PCR Programm

Primer Name	Quelle
S-SAP-R1	Trognitz (2004)
S-SAP-Kinase 1	Jia <i>et al.</i> (2000)
LMPCR-Kinase 2	
P-loop LMPCR	
R bulb	Trognitz (2004)
NBS2	
NBS5	
NBS7	

Tabelle 3.5: RGA Primers für AFLP-RGA

Schritt	Temperatur	Zeit
I	94 ° C	5 Min
II	94 ° C	1 Min
III	56 ° C	1 Min 30 Sek Zurück zum Schritt II (37 Zyklen)
IV	72 ° C	1 Min 30 Sek
V	72 ° C	5 Min
VI	4 ° C	∞

Tabelle 3.6: SSR-Marker: PCR Programm

Primer Name	Sequenz
OPA-06	5'-GGTCCCTGAC-3'
OPD-01	5'-ACCGCGAAGG-3'
OPD-05	5'-TGAGCGGACA-3'
OPE-19	5'-ACGGCGTATG-3'
OPF-05	5'-CCGAATTCCC-3'

Tabelle 3.7: RAPD Primer

Schritt	Temperatur	Zeit
I	94 ° C	3 Min
II	94 ° C	1 Min
III	35 ° C	2 Min Zurück zum Schritt (40 Zyklen)
IV	72 ° C	2 Min
V	72 ° C	8 Min
VI	4 ° C	∞

Tabelle 3.8: RAPD Marker: PCR Programm

Kopplungsgruppe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
SSR getestet	3	6	4	3	8	3	2	6	4	6	4	8	5	7	4	2	3
SSR Polymorphic	3	6	4	2	8	-	1	4	4	5	3	6	4	6	3	1	2

Tabelle 3.9: Getestete Mikrosatelliten

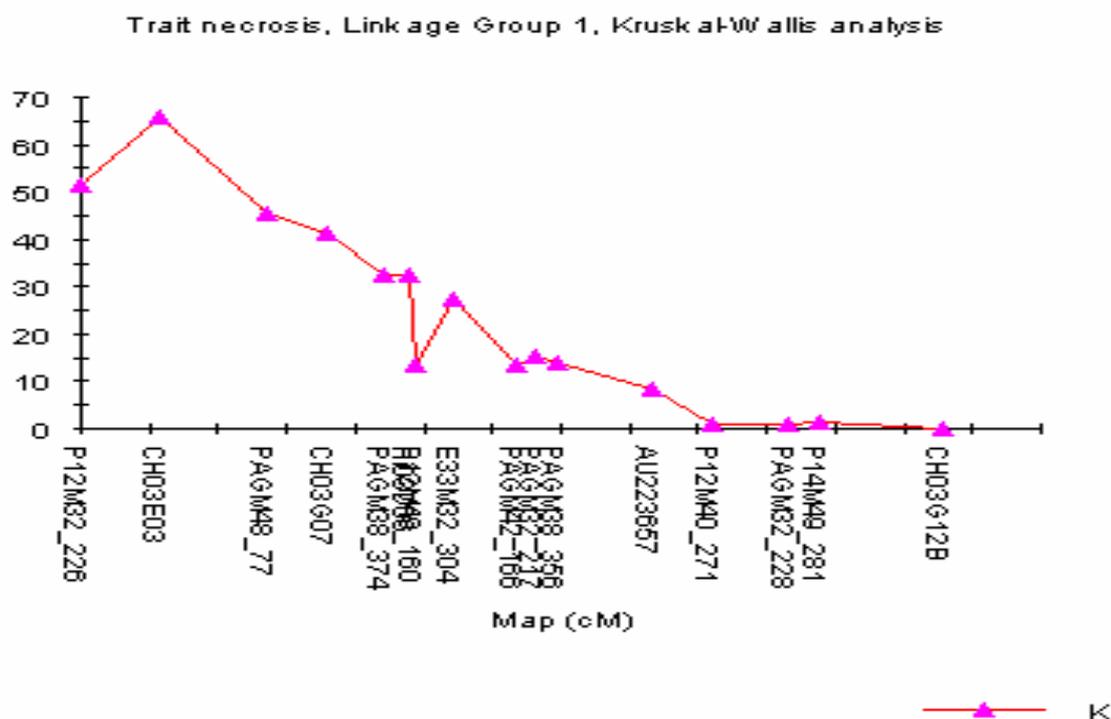


Abb. 3.9: Trait necrosis – Linkage group 1

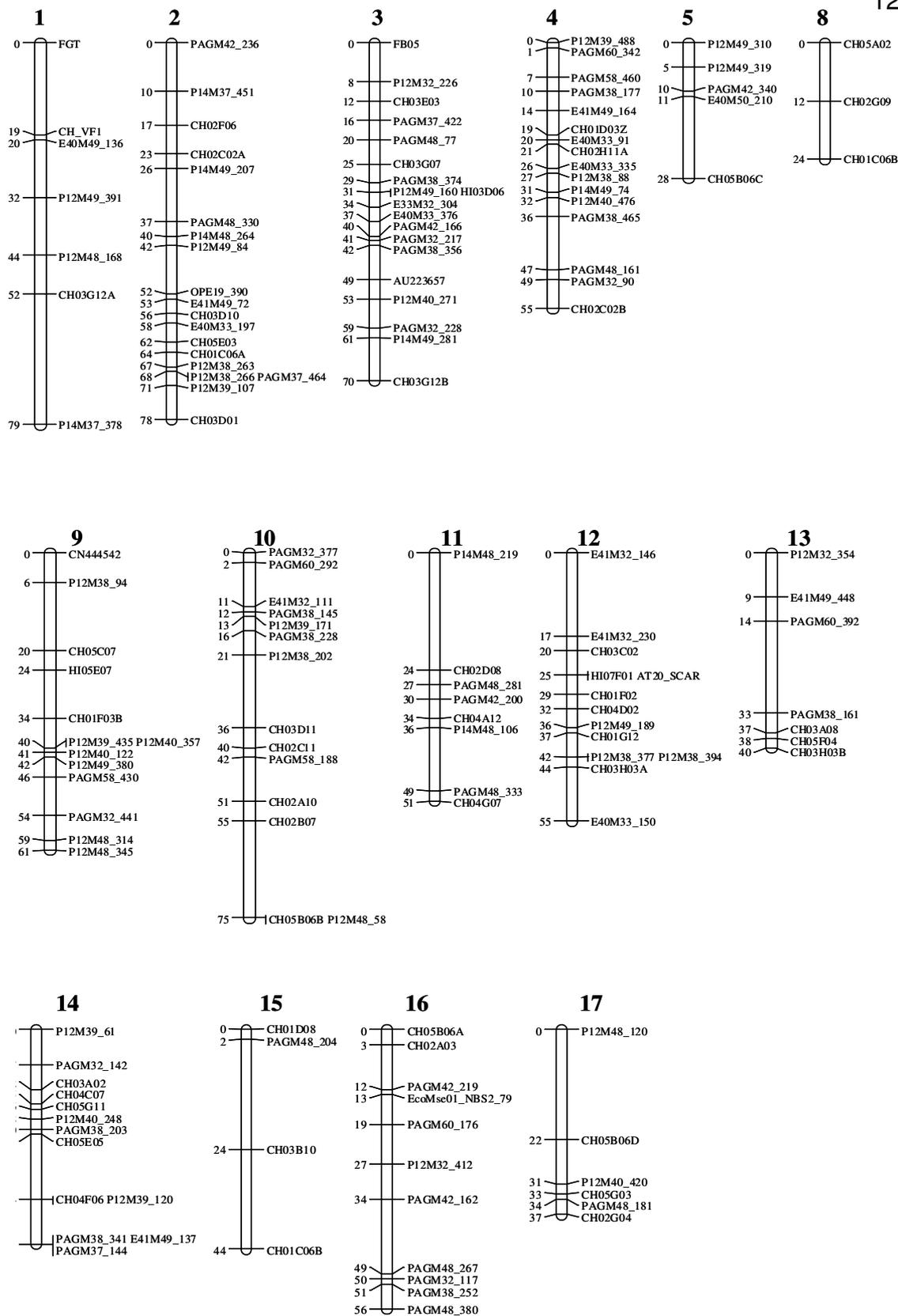


Abb. 3.10: Genetische Kopplungskarte von *M. robusta*

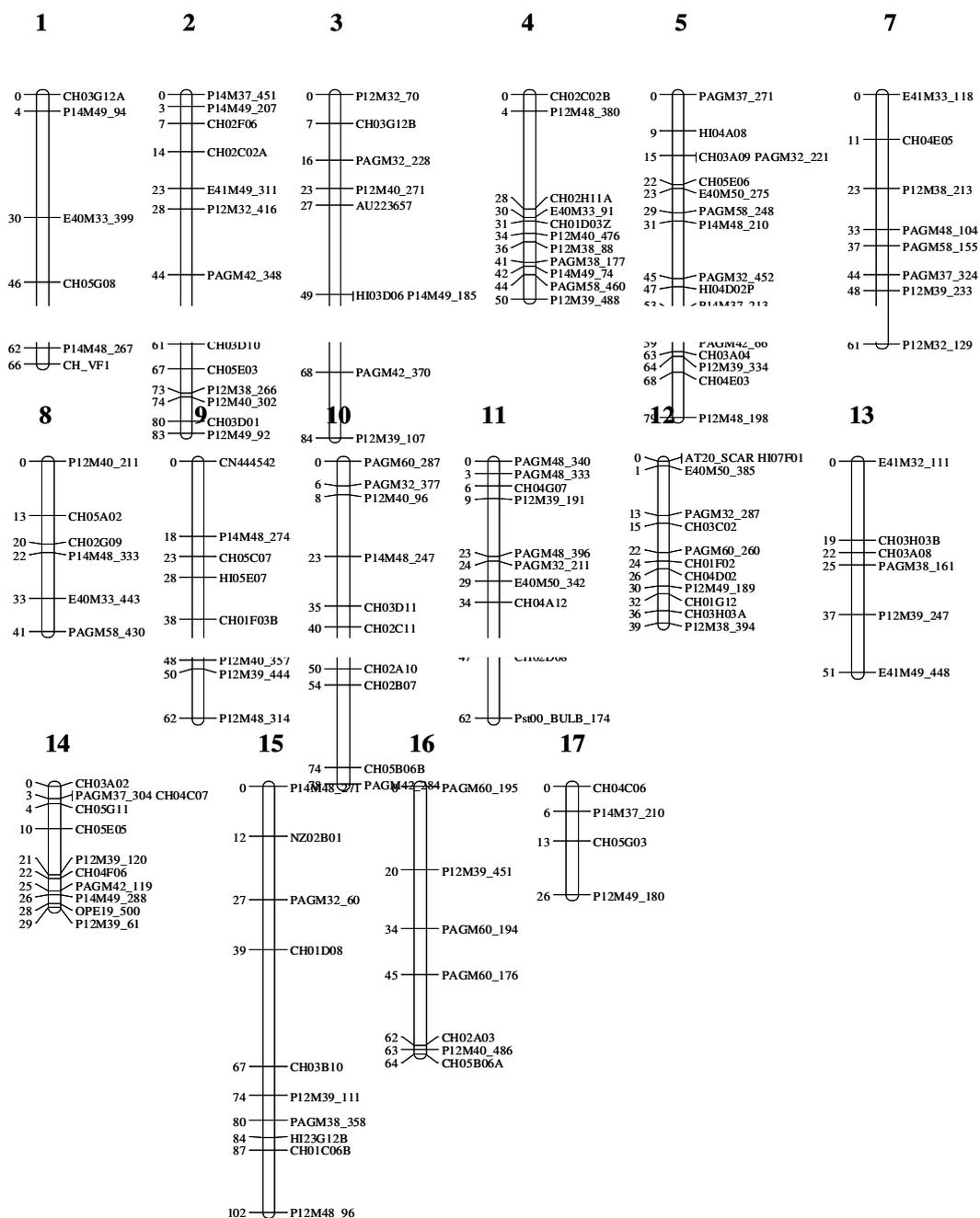


Abb. 3.11: Genetische Kopplungskarte von Idared

3.4 Salizylsäure als potentieller Pathogenitätsfaktor, Analyse des Gehalts von Salizylsäure in *Malus robusta* und Idared

Seit einigen Jahren ist das Pflanzenhormon Salizylsäure (SA) als wichtiger endogener Faktor in Pflanzen-Pathogen-Interaktionen und als Schlüsselement der Pflanzenabwehr in Angiospermen bekannt (Malamy *et al.*, 1990; Metraux *et al.*, 1990). Viele induzierte Resistenzmechanismen wie Hypersensitive Response (HR), systemisch induzierte Resistenz (SAR), PR-Genexpression, der Oxidative Burst und der Programmierte Zelltod (PCD) laufen mittels Salizylsäure-Signalling ab (Mur 1997, Shirasu 1997, Gaffney 1993, Vernooij 1994, Mauch- Mani 1996, Gaffney 1993, Delaney 1994, Mur 1997, Shirasu 1997).

SA wurde in Apfelgewebe (Idared und *Malus robusta*) bestimmt. Die Analysen wurden freundlicherweise von Hr. Mag. Wilfried Rozhon (Max F. Perutz Laboratories, Wien) durchgeführt. Es wurde sowohl der Gehalt an freier (free) SA als auch der Total-SA-Gehalt bestimmt. Folgende Versuche wurden analysiert:

In vitro-Inokulationsversuch

Pflanzengewebe in dreifacher Wiederholung, *in vitro* Sprosse samt Blätter, sowohl von Idared als auch von *M. robusta*, nach Inokulation mit Ea im zeitlichen Verlauf (6 h, 1 d, 2 d, 3 d). Die Kontrolle wurde mit KingB inokuliert. Es wurde der SA-Gehalt in Abhängigkeit von der Zeit gemessen (0 h (ohne Verwundung), 6 h, 1 d, 2 d, 3 d).

Ergebnisse

Die Analysen dieses Versuches zeigen, dass es zwischen Idared und *Malus robusta* signifikante Unterschiede in den Totalgehalten an Salicylsäure (Abb. 3.11) gibt. In der resistenten Wildart *M. robusta* sind diese fünfmal so hoch wie in der anfälligen Sorte Idared. Die Inokulation mit dem Pathogen führt am dritten Tag bei Idared zu einer signifikanten Erhöhung der SA im Vergleich zur Kontrollbehandlung mit dem Nährmedium (King B). Bei *M. robusta* führt die Infektion mit Ea bereits am 1. Tag zu einer signifikanten Erhöhung der Total-SA gegenüber der Kontrolle und sinkt dann

wieder ab. Bei dem Gehalt an freier SA (Abb. 3.11) ist vor allem der Anstieg bei der Pathogen versus Kontrollbehandlung von Idared am 2. wie auch am 3. Tag sehr auffällig.

Diese Ergebnisse sind in zweierlei Hinsicht interessant: Die Tatsache, dass die resistente Sorte einen fünffach so hohen Ausgangsgehalt an SA aufweist wie Idared ist bemerkenswert. Als potentieller Resistenzfaktor sollte dies näher analysiert werden, Screening von Sorten mit unterschiedlicher Anfälligkeit bzw. einzelne Kreuzungsnachkommen, deren Nekrosenanfälligkeit bekannt ist, sollten auf diesen Faktor analysiert werden. Weiters zeigt sich, dass die resistente Art bereits am 1. Tag signifikant auf das Pathogen reagiert, was zu einer Erhöhung der SA-Werte führt. Bei Idared wird das Pathogen erst am 2. bzw. deutlich am 3. Tag erkannt. Zu diesem Zeitpunkt setzen mögliche Pflanzenabwehrmaßnahmen aber zu spät ein, da die Bakterien sich bereits massiv in der Pflanze ausgebreitet haben.

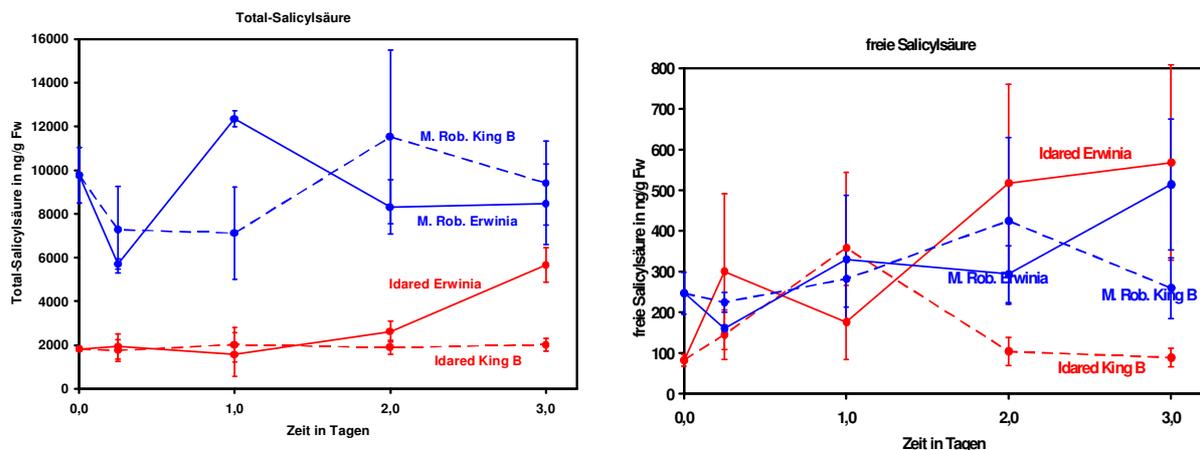


Abb. 3.11: Salicylsäuregehalte: Gesamt- und Freie-SA von Idared und *M. robusta* *in vitro*

Quarantäneglashausversuch AGES 2005

Für das erste Screening, ob SA als Faktor näher analysiert werden soll, wurden die abgeernteten Spross-Spitzen des Versuches vom Frühjahr 2005 verwendet. Dabei ergaben sich erste Anhaltspunkte über die unterschiedlichen Gehalte zwischen Idared und *M. robusta*, die jedoch nicht ausreichend statistisch abgesichert waren.

Quarantäneglashausversuch AGES 2006

Die Versuchsbeschreibung wurde bereits detailliert bei den molekularbiologischen Untersuchungen (RT-PCR) beschrieben. Es wurde das gleiche Pflanzenmaterial wie für die RT-PCR - Analysen sowie für die enzymatischen Untersuchungen verwendet. Idared (1+ 2. Blatt), Idared (3.Blatt), *M.robusta* (1+2. Blatt), *M.robusta* (3. Blatt) und dies jeweils mit Ea bzw. Kontrolle (King B) im zeitlichen Verlauf von 6 h, 1 d, 2 d und 3 d nach erfolgter Inokulation.

Ergebnisse

Die Analysen der SA-Gehalte des Glashausversuches bestätigen die *in vitro* Versuchsergebnisse. Auch hier zeigt sich wieder ein deutlich unterschiedlicher Grundgehalt der Gesamt-SA in Idared und *M. robusta*. Die SA-Werte in *M. robusta* sind ca. fünfmal so hoch wie in Idared.

Die Ergebnisse zeigen weiters, dass die mechanische Verletzung (Kontrolle) als Stress-Faktor keinen nennenswerten Einfluss, weder auf den Gesamtgehalt noch auf den Gehalt an freier SA hat. In den anfälligen Idared-Pflanzen konnte ein leichter Anstieg zwischen 6 h und 2 Tagen beobachtet werden, am 3. Tag jedoch sanken die SA-Werte wieder auf das Niveau der Ausgangsgehalte. Im Gegensatz dazu nahm der SA-Gehalt (sowohl freie als gesamt) in *M. robusta* nach der Kontrollbehandlung leicht zu (Abb. 3.12).

Dieser Effekt war sowohl im *in vitro* Versuch als auch im Glashausversuch zu beobachten. Ein Vergleich zwischen *in vitro* und Glashausversuch zeigt jedoch, dass der zeitliche Verlauf der SA-Gehalte unterschiedlich ist. Der Gehalt an Gesamt-SA steigt bei Idared *in vitro* Pflanzen bereits am 2. Tag nach der Infektion mit Ea an und nimmt noch weiter bis zum 3. Tag auf 5.000 ng/g zu. Im Gegensatz dazu zeigen die Glashauspflanzen bereits einen ähnlichen Wert am 1. Tag nach Infektion und am 2. Tag fällt der SA-Gehalt bereits wieder auf den Ausgangswert zurück (Abb. 3.12) Weiters waren die Werte an freier SA bei den *in vitro*-Pflanzen ebenfalls steigend, 500 ng/g wurden am 3. Tag nach der Infektion gemessen, während im Glashaus bei Idared keine Veränderungen am Gehalt der freier SA durch die Pathogeninvasion

festgestellt wurden (Abb. 3.14). Die resistente Art *M.robusta* jedoch, weist sehr variable Gehalte an freier SA auf. Der Gehalt an Gesamt-SA nahm am 1. Tag nach der Inokulation ab und stieg auf mehr als 25.000 ng/g am 3. Tag nach Pathogeninokulation (Abb. 3.13).

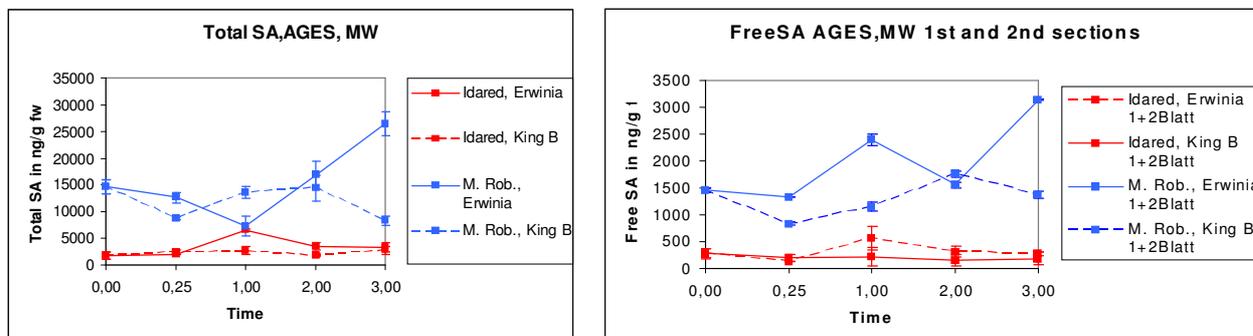


Abb. 3.12: Salicylsäuregehalte von AGES 2006 (Mittelwerte der 1. + 2. Sektion)

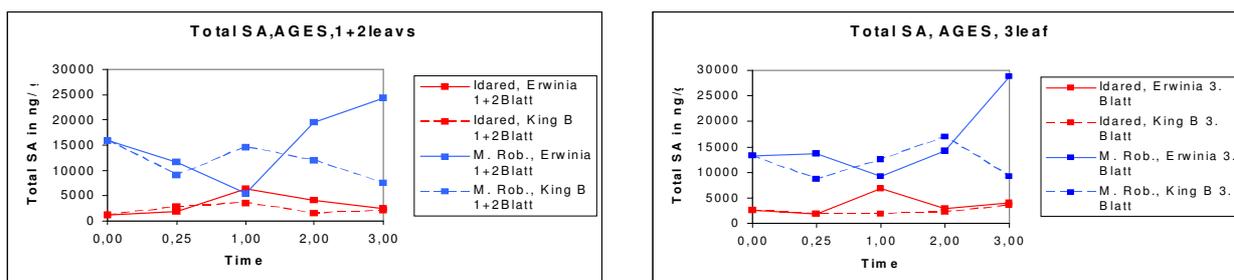


Abb. 3.13: Gesamtsalicylsäuregehalte von AGES 2006 (1+2. Blatt) sowie 3. Blatt

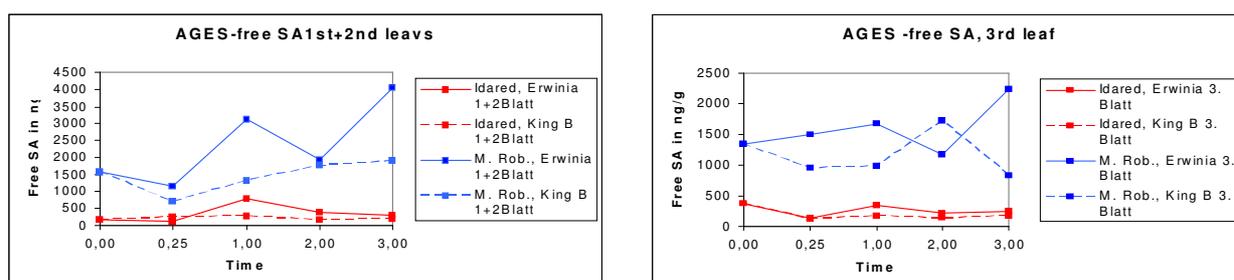


Abb. 3.14: Freie Salicylsäuregehalte von AGES 2006 (1+2. Blatt) sowie 3. Blatt

Generell konnten die Ergebnisse der SA-Gehalte als möglicher Pathogenitätsfaktor untermauert werden. Tatsache ist, daß die resistente Wildart wesentlich höhere SA-Werte als die anfällige Sorte Idared aufweist. Weiters scheint SA eine Bedeutung beim Apfel im Komplex „Pflanzen-Resistenz-Pathogenität-Signalling“ zuzukommen.

Eine Erklärung für die teilweise unterschiedlichen Ergebnisse der SA-Analyse zwischen *in vitro*-Versuch und Glashaus könnte einerseits in der unterschiedlichen Inokulationsmethode liegen. Weiters sind die Glashauspflanzen veredelt, sodass eine Auswirkung der Unterlage möglich ist. Aus den Ergebnissen zeigt sich weiters, dass die Werte der SA ziemlich starke Schwankungen aufweisen. Der *in vitro* Versuch ist durch dreifache Wiederholung und Mehrfachbestimmungen der SA eindeutig statistisch abgesichert, während aufgrund des geringen Pflanzenmaterials bei dem Glashausversuch keine Wiederholungen durchgeführt werden konnten.

4 Literatur

Akashi T., Sawada Y., Shimada N., Sakurai N, Aoki T. und Ayabe S. (2003)
cDNA cloning and biochemical characterization of S-adenosyl-L-methionine: 2,7,4'-trihydroxyisoflavanone 4'-O-methyltransferase, a critical enzyme of the legume isoflavonoid phytoalexin pathway.
Plant Cell Physiology 44: 103 - 112

Brisset M. N., Faize M., Heintz C., Cesbron S., Chartier R., Tharaud M. and Paulin P. J. (2002)
Induced resistance to *Erwinia amylovora* in apple and pear.
Acta Hort. 590: 335 - 338

Calenge F., Drouet D., Denance C., van de Weg W. E., Brisset M. N., Paulin J. P. and Durel C. E. (2005)
Identification of a major QTL together with several minor additive or epistatic QTLs for resistance to fire blight in apple in two related progenies.
Theor. Appl. Genet. 111: 128 - 135

Chang S., Puryear und Cairney J. (1993)
A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees.
Plant Molecular Biology Reporter 11: 113 - 116

Cooley M. B., Pathirana S., Wu H. J., Kachroo P. and Klessig D. F. (2000)
Members of the *Arabidopsis* *HRT/RPP8* family of resistance genes confer resistance to both viral and oomycete pathogens.
Plant Cell 12: 663 - 676

Conner P. J., Brown S. K. and Weeden N. F. (1997)
Randomly amplified polymorphic DNA-based genetic linkage maps of three apple cultivars.
J. Amer. Soc. Hort. Sci. 122: 350 - 359

Conner P. J., Brown S. K. and Weeden N. F. (1998)

Molecular marker analysis of quantitative traits for growth and development in juvenile apple trees.

Theor. Appl. Genet. 96: 1027 - 1035

Darvasi A., Weinreb A., Minke V., Weller J. I. and Soller M. (1993)

Detecting marker-QTL linkage and estimating QTL gene and map location using a saturated genetic map.

Genetics 134: 943 - 951

Dondini L., Tartarini S., Nocelli E., Sansavini S. (2002)

Cloning and characterization of 'Resistance Gene Analogous' RGA in European pear.

Acta Hort. 596: 211 - 214

Doyle J. J. and Doyle J. L. (1987)

A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf.

Phytochem. Bull 19: 11 - 15

Elstner E. F., Oßwald W. und Schneider I. (1996)

Phytopathologie: Allgemeine und biochemische Grundlagen.

Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

Gianfranceschi L., Seglias N., Tarchini R., Komjanc M. and Gessler C. (1998)

Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple.

Theor. Appl. Genet. 96: 1069 - 1076

Guilford P., Prakash S., Zhu J. M., Rikkerink E., Gardiner S., Bassett H. and Forster R. (1997)

Microsatellites in *Malus domestica* (apple): abundance, polymorphism and cultivar identification.

Theor. Appl. Genet. 94: 249 - 254

Halbwirth H., Kampan W., Stich K., Fischer T. C., Meisel B., Forkmann G. and Rademacher W. (2002)

Biochemical and molecular biological investigations with respect to induction of fire blight resistance in apple and pear by transiently altering the flavonoid metabolism with specific enzyme inhibitors

Acta Horticulturae 590: 485 - 492

Hayes A. J., Saghai Maroof M. A. (2000)

Targeted resistance gene mapping in soybean using modified AFLPs.

Theor. Appl. Genet. 100: 1279 - 1283

Hemmat M., Weeden N. F. and Brown S. K. (2003)

Mapping and evaluation of *Malus domestica* microsatellites in apple and pear.

J. Amer. Soc. Hort. Sci. 128: 515 - 520

Hokanson S. C., Szewc-McFadden A. K., Lamboy W. F. and McFerson J. R. (1998)

Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in a *Malus domestica* *Malus borkh.* core subset collection.

Theor. Appl. Genet. 97: 671 - 683

Hrazdina G. (2003)

Response of scab-susceptible (McIntosh) and scab-resistant (liberty) apple tissues to treatment with yeast extract and *Venturia inaequalis*.

Phytochemistry 64: 485 – 492

Hurtado M. A., Romero C., Vilanova S., Abbott A. G., Llacer G. and Badenes M. L. (2002)

Genetic linkage maps of two apricot cultivars (*Prunus armeniaca* L.) and mapping of PPV (sharka) resistance.

Theor. Appl. Genet. 105: 182 - 191

- Jia, Y., McAdams S. A., Bryan G.T., Hershey H. P. and Valent, B. (2000)
Direct interaction of resistance gene and avirulence gene product confers rice blast resistance.
EMBO J. 19: 4004 - 4014
- Kellerhals M., Gianfranceschi L., Seglias N. and Gessler C. (2000)
Marker-assisted selection in apple breeding.
Acta Hort. 521: 255 - 261
- King G. J., Lynn J. R., Dover C.J., Evans K. M. and Seymour G. B. (2000)
Resolution of quantitative trait loci for mechanical measures accounting for genetic variation in fruit texture of apple (*Malus pumila* Mill.).
Theor. Appl. Genet. 102: 1227 - 1235
- King G. J., Maliepaard C., Lynn J. R., Alston F. H., Durel C. E., Evans K. M., Grion B., Laurens F., Manganaris A. G., Guilford P., Prakash S., Zhu J. M., Rikkerink E., Gardiner S., Bassett H. and Forster R. (1997)
Microsatellites in *Malus domestica* (apple): abundance, polymorphism and cultivar identification.
Theor. Appl. Genet. 94: 249 - 254
- King G. J., Maliepaard C., Lynn J. R., Alston F. H., Durel C. E., Evans K. M., Grion B., Laurens F., Manganaris A. G., Schrevens E., Tartarini S. and Verhaegh J. (2001)
Quantitative genetic analysis and comparison of physical and sensory descriptors relating to apple (*Malus pumila* Mill).
Theor. Appl. Genet. 100: 1074 - 1084
- Korban S. S., Ries S. M., Klopmeier M. J., Morrissey J. F. and Hattermann D. R. (1998)
Genotypic response of scab-resistant apple cultivars/selections to two strains of *Erwinia amylovora* and the inheritance of resistance to fire blight.
Ann. Appl. Biol. 113: 101 - 105

Liebhard R., Gianfranceschi L., Koller B., Ryder C. D., Tarchini R., van de Weg E. and Gessler C. (2002)

Development and characterisation of 140 new microsatellites in apple (*Malus domestica* Borkh.).

Mol. Breed. 10: 217 - 241

Liebhard R., Kellerhals M., Pfammatter W., Jertmini M. and Gessler C. (2003)

Mapping quantitative physiological traits in apple (*Malus domestica* Borkh.).

Plant Mol. Biol. 52: 511 - 526

Lawson D. M., Hemmat M. and Weeden N. F. (1995)

The use of molecular markers to analyze the inheritance of morphological and developmental traits in apple.

J. Amer. Soc. Hort. Sci. 120: 532 - 537

Malamy J., Carr J. P., Klessig D. F., and Raskin I. (1990)

Salicylic acid: A likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viralinfection.

Science 250:1002 - 1004

Maliepaard C., Alston F. H., van Arkel G., Brown L. M., Chevreau E., Dunemann F., Evans K. M., Gardiner S., Guilford P., van Heusden A. W., Janse J., Laurens F., Lynn J. R., Manganaris A. G., den Nijs A. P. M., Periam N., Rikkerink E., Roche P., Ryder C., Sansavini S., Schmidt H., Tartarini S., Verhaegh J. J., Vrielink-van Ginkel M. and King G. J. (1998)

Aligning male and female linkage maps of apple (*Malus pumila* Mill) using multi-allelic markers.

Theor. Appl. Genet. 97: 60 - 73

Maliepaard C., Alston F., van Arkel G., Brown L., Chevreau E., Dunemann F., Evans K., Gardiner S., Guilford P., van Heusden S., Janse J., Laurens F., Lynn J., Manganaris S., den Nijs T., Periam N., Rikkerink E., Roche P., Ryder C., Sansavini S., Schmidt H., Tartarini S., Verhaegh J., Vrielink R. and King G. (1999)

The European apple map.

Acta Hort. 484: 325 - 330

McManus P. S., Stockwell V. O., Sundin G. W. and Jones A. L. (2002)

Antibiotic use in plant agriculture.

Ann. Rev. Phytopathology 40: 443 - 465

Metraux J. P., Signer H., Ryals, J., Ward E., Wyss-Benz M., Gaudin J., Raschdorf K., Schmid E., Blum W. and Inverardi, B. (1990)

Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber.

Science 250: 1004 - 1006

Mudgett M. B. (2005)

New insights to the function of phytopathogenic bacterial Type III effectors in plants.

Ann. Rev. Plant Biol. 56: 509 - 531

Mur L. A. J., Bi Y. M., Darby R. M., Firek S. and Draper J. (1997)

Compromising early salicylic acid accumulation delays the hypersensitive response and increases viral dispersal during lesion establishment in TMV-infected tobacco.

Plant J. 12: 1113 - 1126

Norelli J. L., Jones A. L. and Aldwinckle H. S. (2003)

Fire blight management in the twenty-first century.

Plant Dis. 87: 756 - 765

Paterson A. H., Lander E. S., Hewitt J. D., Peterson S., Lincoln S. E. and Tanksley S. D. (1998)

Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms.

Nature 335: 721 - 726

Picinelli, A., Dapena E. and Mangas J. J. (1995)

Polyphenolic pattern in apple tree leaves in relation to scab resistance. A preliminary study.

J. Agric. Food Chem. 43: 2273 - 2278

Rylott E., Rogers C. A., Gilday A. D., Edgell T., Larson T. R. and Graham I. A. (2003)

Arabidopsis Mutants in Short- and Medium-chain Acyl-CoA Oxidase Activities Accumulate Acyl-CoAs and Reveal That Tatty Acid β -Oxidation Is Essential for Embryo Development.

The Journal of Biological Chemistry 278: 21370 - 21377

Salm H. und Geider K. (2004)

Real-time PCR for detection and quantification of *Erwinia amylovora*, the causal agent of fireblight.

Plant Pathology 53: 602 - 610

Shirasu K., Nakajima H., Rajasekhar V. K., Dixon R. A., Lamb C. (1997)

Salicylic Acid Potentiates an Agonist-Dependent Gain Control That Amplifies Pathogen Signals in the Activation of Defense Mechanisms
Plant Cell 9: 261 - 270

Staskawicz B. J., Ausubel F. M., Baker B. J., Ellis J. G. and Jones J. D. G. (1995)

Molecular genetics of plant disease resistance.

Science 268: 661 - 667

Thomson S. V. (2000)

Epidemiology of fire blight. In: Vanneste J. L. (ed.), Fire Blight: the Disease and its Causative Agent, *Erwinia amylovora*.

CABI Publishing, Wallingford, UK, pp. 9 - 37

Trognitz F. (2004)

Genetic and molecular characterisation of late blight resistance in *Solanum caripense*.

Ph.D Thesis, *Universität Für Bodenkultur, Vienna, Austria*

Urban P. C., Mignotte M., Kazmaier F., Delorme und Pompon D. J. (1997)

Cloning, yeast expression, and characterization of the coupling of two distantly related *Arabidopsis thaliana* NADPH-Cytochrome P450 reductases with p450 CYP73A5.

J. Biol. Chem. 272: 19176 – 19186

van de Weg E., Koller B., Dunemann F., Durel C. E., Kodde L., Liebhard R., Manganaris A. G. and Tartarini S. (2000)

Five new molecular maps. European project fair5 CT 97 - 3898

D.A.R.E. newsletter, nr 3: 6 - 8

van Ooijen J. W. (1999)

LOD significance thresholds for QTL analysis in experimental populations of diploid species.

Heredity 83: 613 - 624

van Ooijen J. W., Boer M. P., Jansen J. W. and Maliepaard C. (2000)

MapQTL (r) Version 4.0, Software for the calculation of QTL Positions on Genetic Maps.

Plant Research International, Wageningen, The Netherlands

van Ooijen J. W. and Voorrips R. W. (2002)

Joinmap 3.0, Software for the calculation of genetic linkage maps.

Plant Research International, Wageningen, The Netherlands

- Venisse J. S., Malnoy M., Faize M., Paulin J. P. und Brisset M. N. (2002)
Modulation of Defense Responses of *Malus* ssp. During compatible and incompatible Interaction with *Erwinia amylovora*.
MPMI 15: 1204 - 1212
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M. and Zabeau M. (1995)
AFLP: a new technique for DNA fingerprinting.
Nucl. Acids Res. 23: 4407 - 4414
- Vuylsteke M., Mank R., Antonise R., Bastiaans E., Senior M.L., Stuber C. W., Melchinger A. E., Lubberstedt T., Xia X. C., Stam P., Zabeau M. and Kuiper M. (1999)
Two high-density AFLP linkage maps of *Zea mays* L.: analysis of distribution of AFLP markers.
Theor. Appl. Genet. 99: 921 - 935
- Weeden N. F. (1994)
Approaches to mapping in horticultural crops. In: Gressho. P.M. (ed.),
Plant Genome Analysis. CRC Press, Boca Raton, FA, pp. 57 - 68
- Weeden N. F., Hemmat M., Lawson D. M., Lodhi M., Bell R. L., Manganaris A. G., Reisch B. I., Brown S. K. and Ye G. N. (1994)
Development and application of molecular linkage maps in woody fruit crops.
In: Schmidt H. and Kellerhals M. (eds.), Progress in Temperate.
Fruit Breeding. Kluwer Academic Publishers, Boston, pp. 269 - 273
- Whitham S., Dinesh-Kumar S., Choi D., Hehl R., Corr. C. and Baker B. (1994)
The product of the tobacco mosaic virus resistance gene *N*: similarity to toll and the interleukin-1 receptor.
Cell 78: 1101 - 1115

Zhang X. H. und Chiang V. L. (1997)

Molecular cloning of 4-coumarate: coenzym A ligase in loblolly pine and the roles of this enzyme in the biosynthesis of lignin in compression wood.

Plant Physiology 113: 65 - 74