

Induktion von Resveratrol- Derivaten in Wein-Kallus, -Blüten und -Blättern durch *Aureobasidium pullulans* Stämme.

Susanne Rühmann

susanne.ruehmann@wzw.tum.de

Fachgebiet Obstbau der Technischen Universität München

Weihenstephan (Prof. Dr. Treutter)

Induktion von Resveratrolderivaten in Weinblüten (*Vitis vinifera*) durch *Aureobasidium pullulans* Stämme.

Rühmann Susanne, Dieter Treutter

Fachgebiet für Obstbau, Technische Universität München Weihenstephan, Alte Akademie 16, 85350 Freising, Germany

In Versuchsansätzen zur Entwicklung von biologischen Pflanzenschutzmaßnahmen im Obstbau spielt der Einsatz von nicht-pathogenen, epiphytischen Mikroorganismen eine zunehmende Rolle. In diesem Rahmen wurden Pflanzenstärkungsmittel auf der Basis des hefeähnlichen Pilzes *Aureobasidium pullulans* entwickelt. Deren Wirkung ist jedoch weitgehend unbekannt.

In zahlreichen Untersuchungen konnten wir zeigen, dass Extrakte von *Aureobasidium pullulans* in Kalluskulturen von Wein (*Vitis vinifera*) die Phenylpropanoid- und Flavonoid-Biosynthese stimulieren sowie eine Neusynthese von Stilben-Phytoalexinen induzieren. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Wirkmechanismus der Hefepreparate auf Resistenzinduktion beruht. Um diese Ergebnisse auf praxisnahe Bedingungen zu übertragen, sollte das Induktionsverhalten von Weinblüten nach Anwendung des Extraktes sowohl unter Gewächshaus- als auch unter Freilandbedingungen untersucht werden.

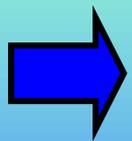
Dazu wurden die Gescheine der Sorten „Müller Thurgau“, „Regent“ und „Blauer Spätburgunder“ zum Zeitpunkt der Vollblüte zweimal im Abstand von 24 h in Extrakt getaucht und 0, 24, 48 und 72 Stunden nach der Behandlung (HNB) entnommen. Der Phenylpropanoidgehalt der Blüten wurde mittels HPLC-Analyse bestimmt.

Durch die Behandlung der Blüten mit dem Kulturfiltrat von *Aureobasidium pullulans* wurde in verschiedenen Versuchsreihen eine deutliche Zunahme an Resveratrol-Derivaten festgestellt. Die Blüten zeigten schon 24 Stunden nach der Elicitation eine Akkumulation. Ferner zeigte sich durch die Elicitation eine beschleunigte Akkumulation von Flavanolen.

wissenschaftliche Erkenntnisse

- phenolischen Verbindungen sind an Abwehrstrategien gegen Pathogene beteiligt
- Nicht Pathogene Mikroorganismen können Pathogene hemmen

- phenolischen Verbindungen sind an Abwehrstrategien gegen Pathogene beteiligt
- Nicht Pathogene Mikroorganismen können Pathogene hemmen



Können nicht pathogene Mikroorganismen phenolische Verbindungen in Pflanzen induzieren um somit das Abwehrpotential der Pflanze zu steigern ?

Untersuchungen auf Zellebene

- Kalluskulturen von *Vitis vinifera*

Untersuchungen auf Pflanzenebene

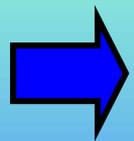
- Blüten und Blätter von *Vitis vinifera* Pflanzen

Untersuchungen auf Zellebene

- Kalluskulturen von *Vitis vinifera*

Untersuchungen auf Pflanzenebene

- Blüten und Blätter von *Vitis vinifera* Pflanzen



Behandelt mit einem Kulturfiltrat von *Aureobasidium pullulans* (hefeähnlicher Pilz)

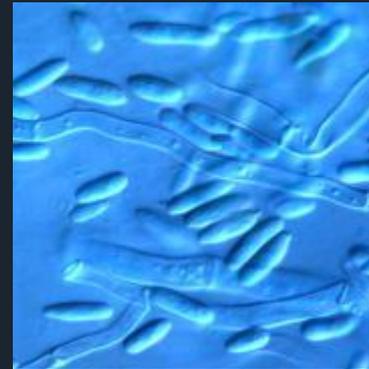
Weinkallus



- Versuchsmaterial:
Weinkalli der Sorten „Regent“ und „Nero“
- Kulturmedium:
(K2) ein MS-Medium (Murashige und Skoog) mit 5 ppm Indolelessigsäure (IES) und 0,2 ppm BAP

nicht pathogener Mikroorganismus

Weinkallus



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

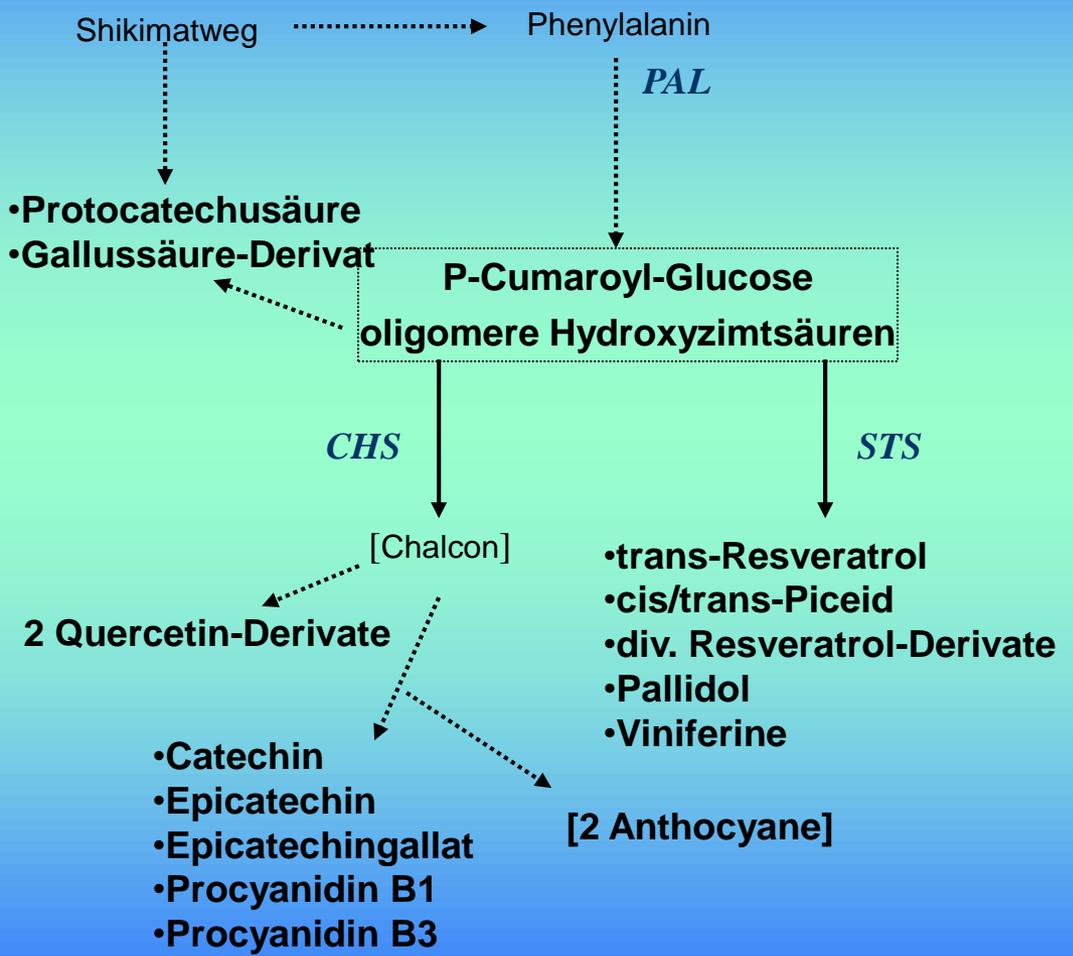
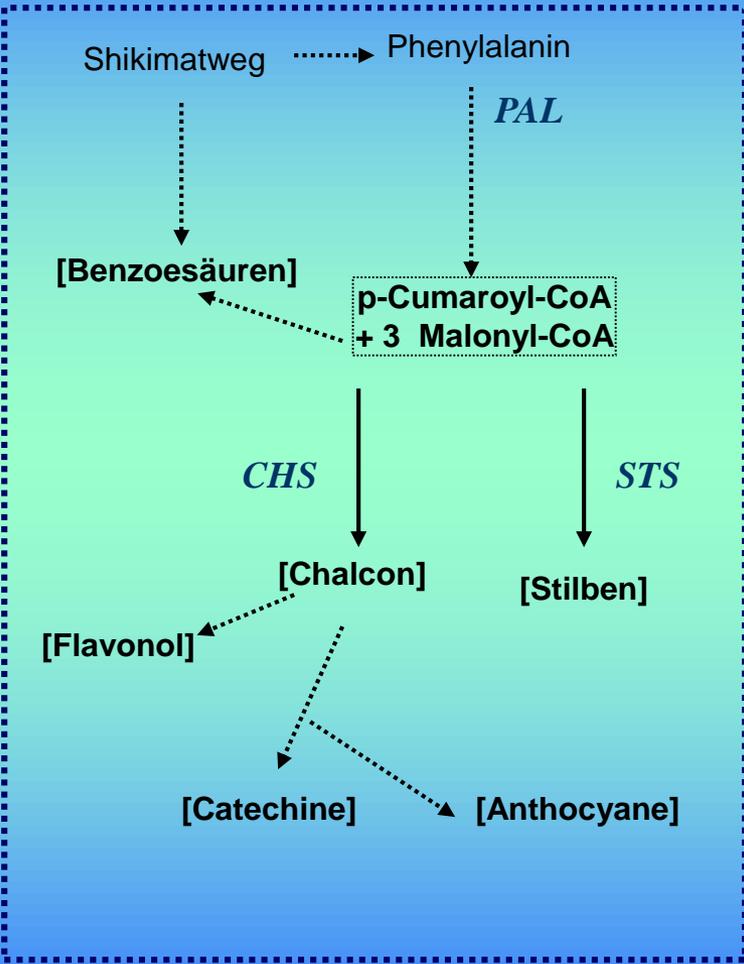
- Versuchsmaterial:
Weinkalli der Sorten „Regent“ und „Nero“
- Kulturmedium:
(K2) ein MS-Medium (Murashige und Skoog) mit 5 ppm Indolessigsäure (IES) und 0,2 ppm BAP
- Anzucht:
Schüttelkultur in „Plate Count“ (PC)-Medium oder K2-Medium
- Extrakterstellung:
autoklavieren der Hefesuspension 10 min. bei 121°C; Nach dem Abzentrifugieren wird der Überstand als Extrakt verwendet.



Probenname nach
5h, 10h, 24h, 48h

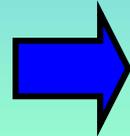
- Gefriergetrocknete Kalli wurden methanolisch extrahiert
- Extrakte wurden charakterisiert mittels:
 - HPLC (Hochdruckflüssigkeitschromatographie)
 - UV-Spektroskopie
 - Dünnschichtchromatographie

Phenylpropanoid-Stoffwechsel im Weinkallus



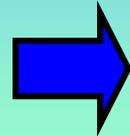
PAL: Phenylalaninammonium-lyase
CHS: Chalconsynthase
STS: Stilbensynthase

Weinkallus ist also in der Lage, alle beschriebenen Stoffklassen zu synthetisieren.



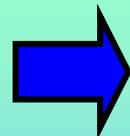
Weinkallus ist als Modellsystem für Induktionsversuche geeignet

Weinkallus ist also in der Lage, alle beschriebenen Stoffklassen zu synthetisieren.



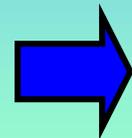
Weinkallus ist als Modellsystem für Induktionsversuche geeignet

Weinkallus synthetisiert sowohl monomere als auch oligomere Resveratrol-Derivate (die Phytoalexine der Weinpflanzen)



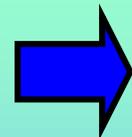
Weinkallus ist als Modellsystem für Induktionsversuche geeignet

Weinkallus ist also in der Lage, alle beschriebenen Stoffklassen zu synthetisieren.



Weinkallus ist als Modellsystem für Induktionsversuche geeignet

Weinkallus synthetisiert sowohl monomere als auch oligomere Resveratrol-Derivate (die Phytoalexine der Weinpflanzen)



Weinkallus ist als Modellsystem für Induktionsversuche geeignet

Weinkallus synthetisiert jedoch keine Tatrane (Weinsäure-Hydroxyzimtsäure-Verbindungen) wie Blätter, Blüten und Trauben es tun.



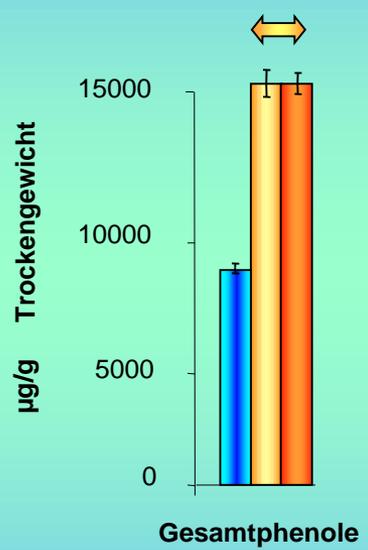
Weinpflanzen als reelles Modellsystem werden für reelle Untersuchungen benötigt

Elicitation mit *Aureobasidium pullulans*-Extrakt



Legend for elicitation conditions:

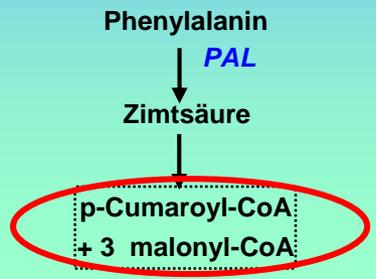
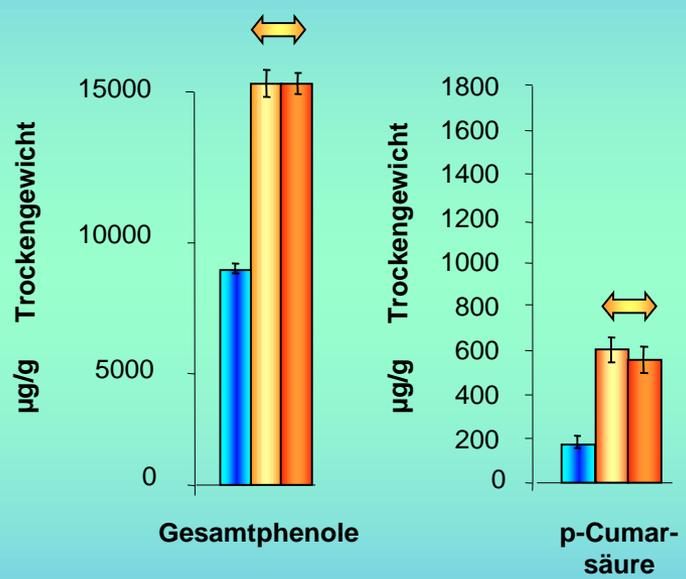
- unbehandelt
- 5% Hefeextrakt
- 50% Hefeextrakt



Phenylalanin

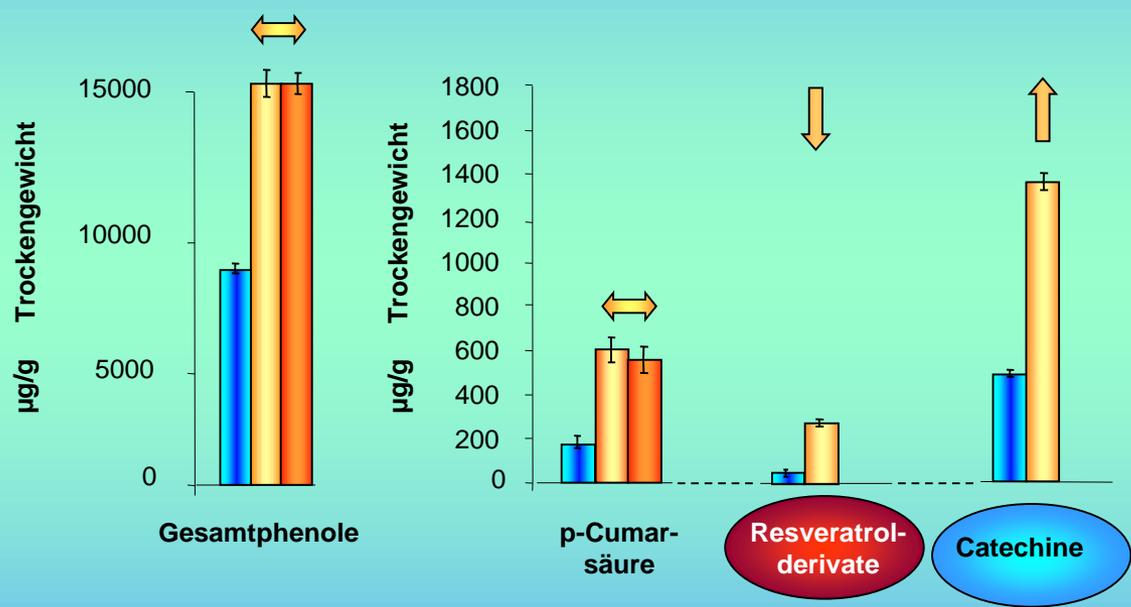
unbehandelt 5% Hefeextrakt 50% Hefeextrakt

PAL: phenylalaninammonia-lyase
CHS: chalconsynthase
STS: stilbensynthase

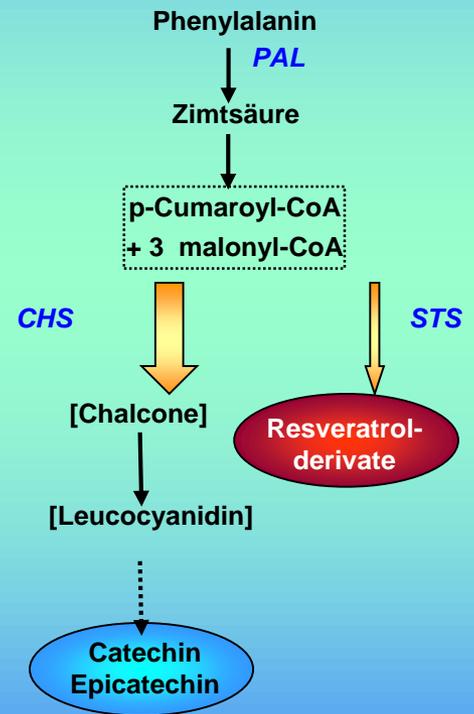


unbehandelt 5% Hefeextrakt 50% Hefeextrakt

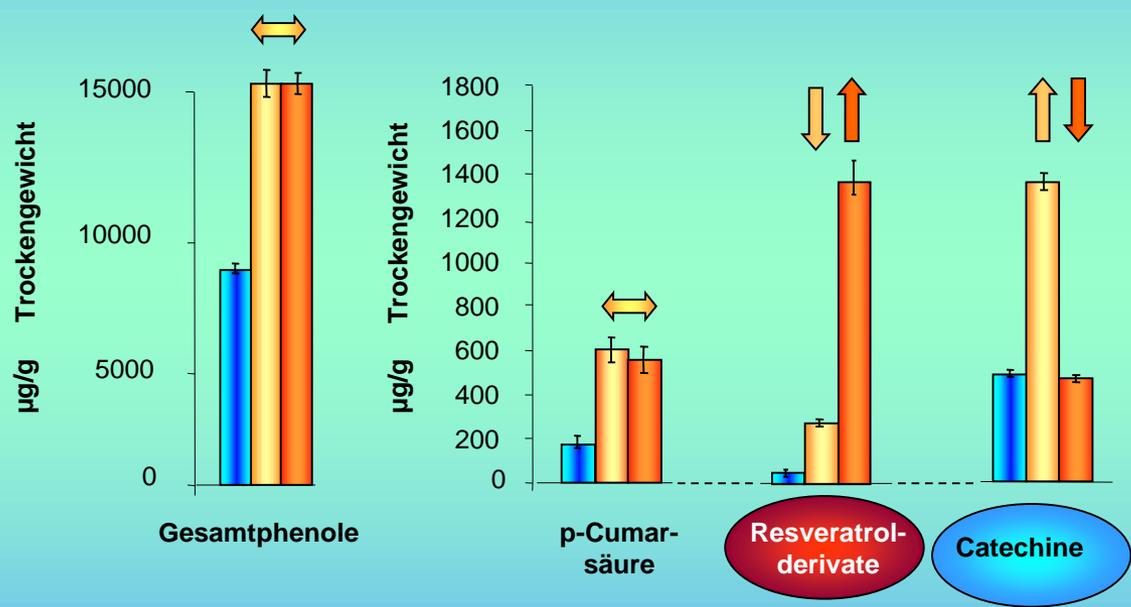
PAL: phenylalaninammonia-lyase
CHS: chalconsynthase
STS: stilbensynthase



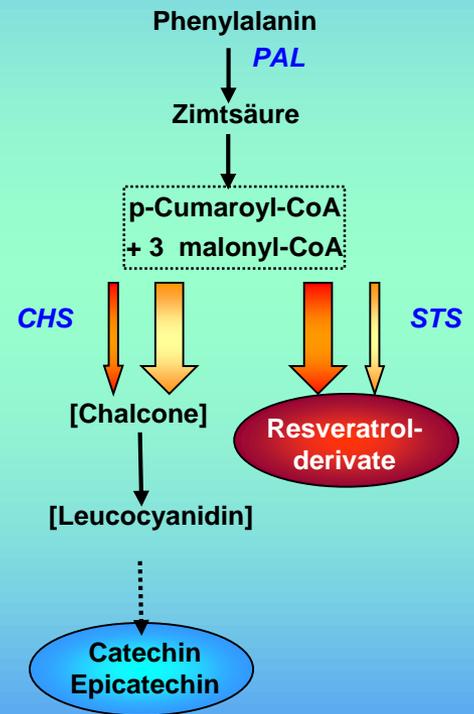
■ unbehandelt
 ■ 5% Hefeextrakt
 ■ 50% Hefeextrakt



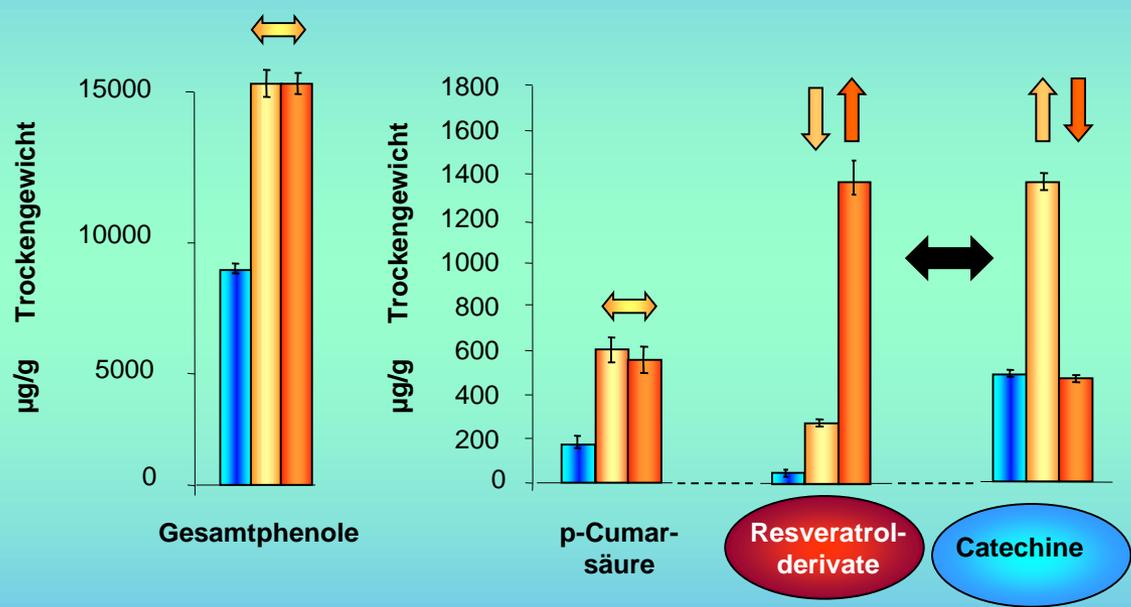
PAL: phenylalaninammonia-lyase
 CHS: chalconsynthase
 STS: stilbensynthase



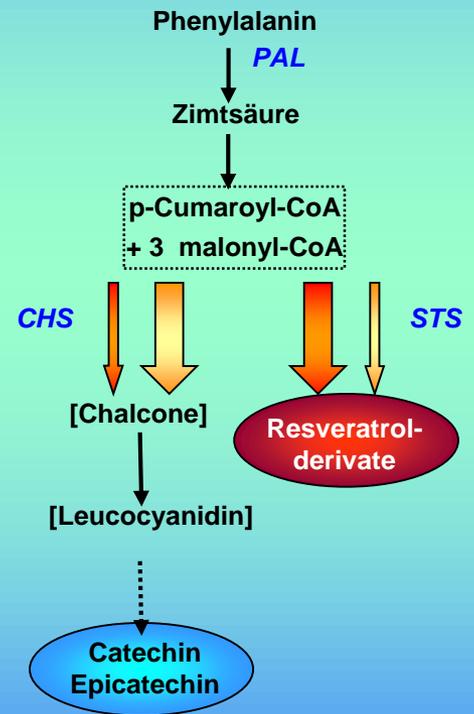
■ unbehandelt
 ■ 5% Hefeextrakt
 ■ 50% Hefeextrakt



PAL: phenylalaninammonia-lyase
 CHS: chalconsynthase
 STS: stilbensynthase



■ unbehandelt
 ■ 5% Hefeextrakt
 ■ 50% Hefeextrakt



PAL: phenylalaninammonia-lyase
 CHS: chalconsynthase
 STS: stilbensynthase

Was bewirkt das A.p. Extrakt im Weinkallus?

➔ **Gesamtgehalt** Phenylpropanoide und **p-Cumarsäure** werden **induziert**

Was bewirkt das A.p. Extrakt im Weinkallus?

➔ **Gesamtgehalt** Phenylpropanoide und **p-Cumarsäure** werden **induziert**

Was bewirkt das A.p. Extrakt im Weinkallus?

➔ **Gesamtgehalt** Phenylpropanoide und **p-Cumarsäure** werden induziert

- ➔ Aktivierung der Genexpression von **PAL** (Phenylalanin-Ammonium-Lyase)
- ➔ erhöhte Enzymaktivität von **PAL**

Was bewirkt das A.p. Extrakt im Weinkallus?

- ➔ **Gesamtgehalt** Phenylpropanoide und **p-Cumarsäure** werden induziert
- ➔ Aktivierung der Genexpression von **PAL** (Phenylalanin-Ammonium-Lyase)
- ➔ erhöhte Enzymaktivität von **PAL**
- ➔ **Catechine** werden induziert

Was bewirkt das A.p. Extrakt im Weinkallus?

➔ **Gesamtgehalt** Phenylpropanoide und **p-Cumarsäure** werden induziert

- ➔ Aktivierung der Genexpression von **PAL** (Phenylalanin-Ammonium-Lyase)
- ➔ erhöhte Enzymaktivität von **PAL**

➔ **Catechine** werden induziert

- ➔ Hemmung der Genexpression von **CHS** (Chalkonsynthase), **LAR** (Leukoanthocyanidinreduktase) und **ANR** (Anthocyanidinreduktase)
- ➔ unveränderte Enzymaktivität der **CHS**

Was bewirkt das A.p. Extrakt im Weinkallus?

➔ **Gesamtgehalt** Phenylpropanoide und **p-Cumarsäure** werden induziert

- ➔ Aktivierung der Genexpression von **PAL** (Phenylalanin-Ammonium-Lyase)
- ➔ erhöhte Enzymaktivität von **PAL**

➔ **Catechine** werden induziert

- ➔ Hemmung der Genexpression von **CHS** (Chalkonsynthase), **LAR** (Leukoanthocyanidinreduktase) und **ANR** (Anthocyanidinreduktase)
- ➔ unveränderte Enzymaktivität der **CHS**

➔ **Resveratrol**-Derivate werden induziert

Was bewirkt das A.p. Extrakt im Weinkallus?

➔ **Gesamtgehalt** Phenylpropanoide und **p-Cumarsäure** werden induziert

- ➔ Aktivierung der Genexpression von **PAL** (Phenylalanin-Ammonium-Lyase)
- ➔ erhöhte Enzymaktivität von **PAL**

➔ **Catechine** werden induziert

- ➔ Hemmung der Genexpression von **CHS** (Chalkonsynthase), **LAR** (Leukoanthocyanidinreduktase) und **ANR** (Anthocyanidinreduktase)
- ➔ unveränderte Enzymaktivität der **CHS**

➔ **Resveratrol**-Derivate werden induziert

- ➔ Aktivierung der Genexpression von **STS** (Stilbensynthase)
- ➔ erhöhte Enzymaktivität der **STS**

Können auch andere Hefeextrakte elicetieren?

„Regent“



„Nero“





„Regent“

„Nero“

Lebende
Bäckerhefe-Zellen

Bäckerhefe-Zellen
Extrakt

Lebende
Bäckerhefe-Zellen

Bäckerhefe-Zellen
Extrakt

1%
5%
25%
50%

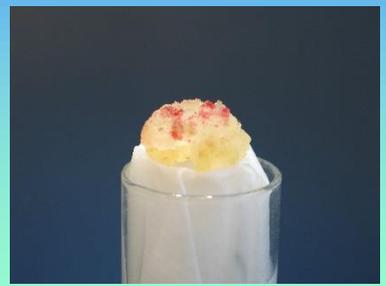
1%
5%
10%
25%
30%
40%
50%

1%
5%
10%
25%
50%

1%
5%
10%
20%
30%
50%

Kulturmedium (K2) behandelter Kallus

K0 unbehandelt



K0 unbehandelt

Kulturmedium (K2) behandelter Kallus

„Regent“

„Nero“

Lebende Bäckerhefe-Zellen

Bäckerhefe-Zellen Extrakt

Lebende Bäckerhefe-Zellen

Bäckerhefe-Zellen Extrakt

1%
5%
25%
50%

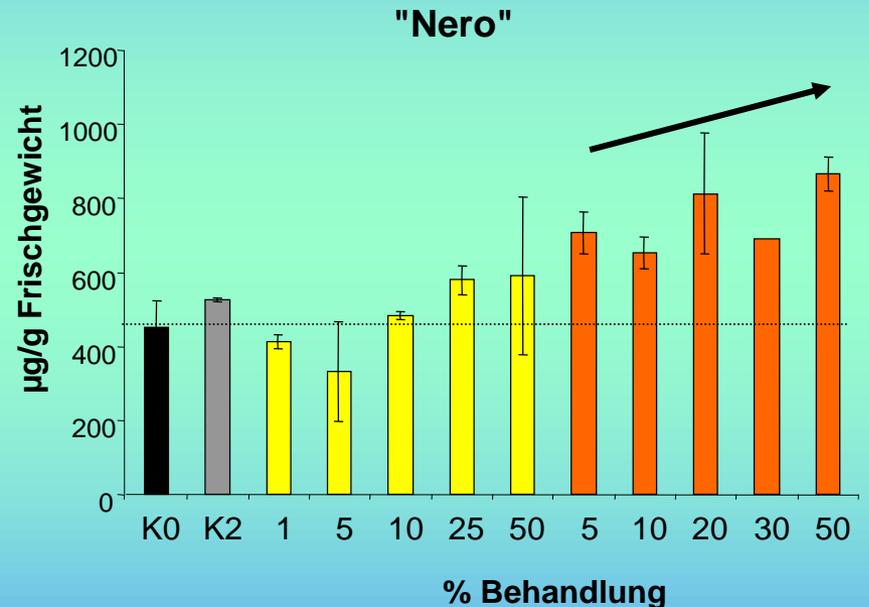
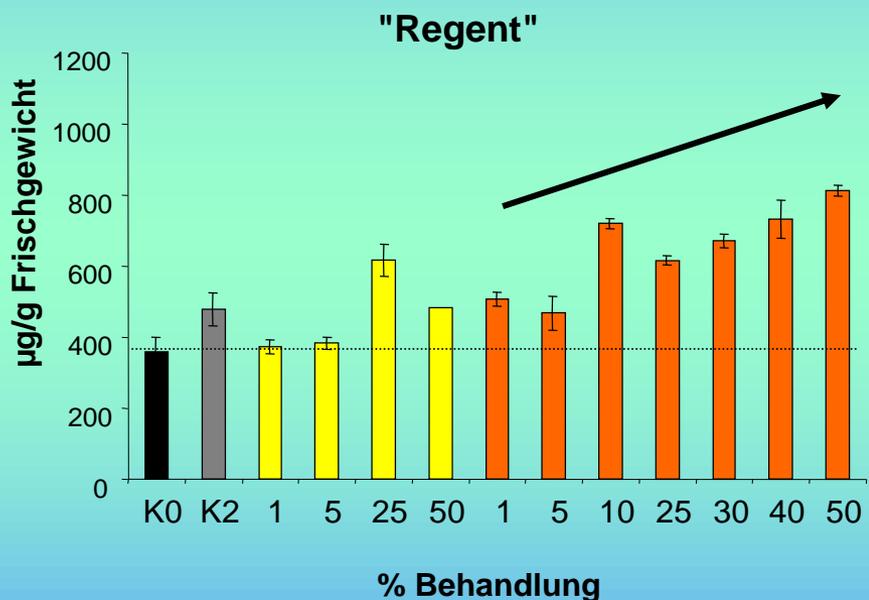
1%
5%
10%
25%
30%
40%
50%

1%
5%
10%
25%
50%

1%
5%
10%
20%
30%
50%

Summe der gesamten Phenylpropanoide

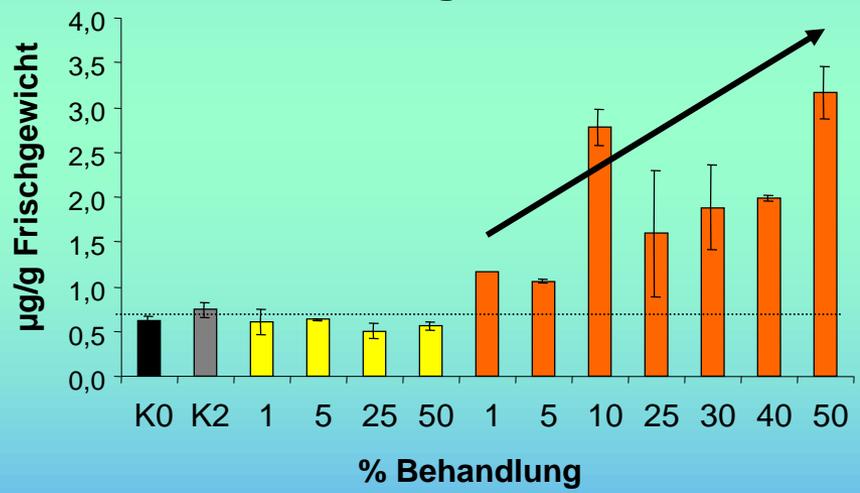
- Hefezellen
- Hefeextrakt



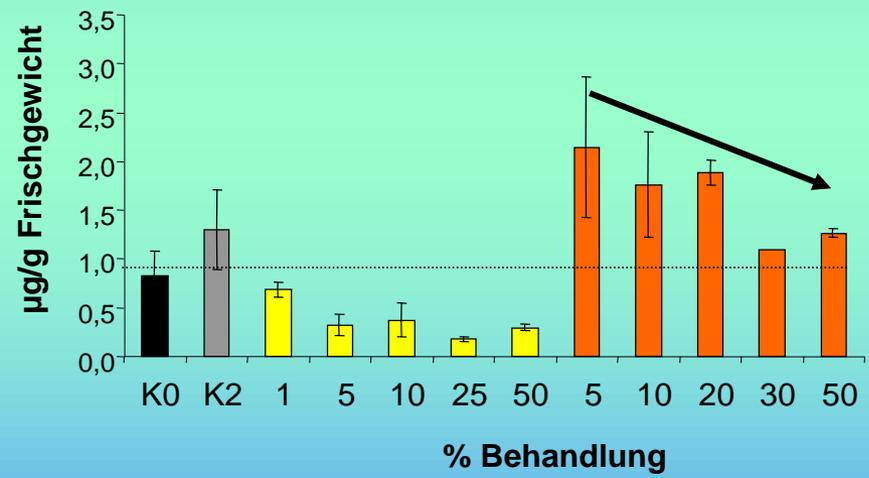
p-Cumarsäure

- Hefezellen
- Hefeextrakt

"Regent"



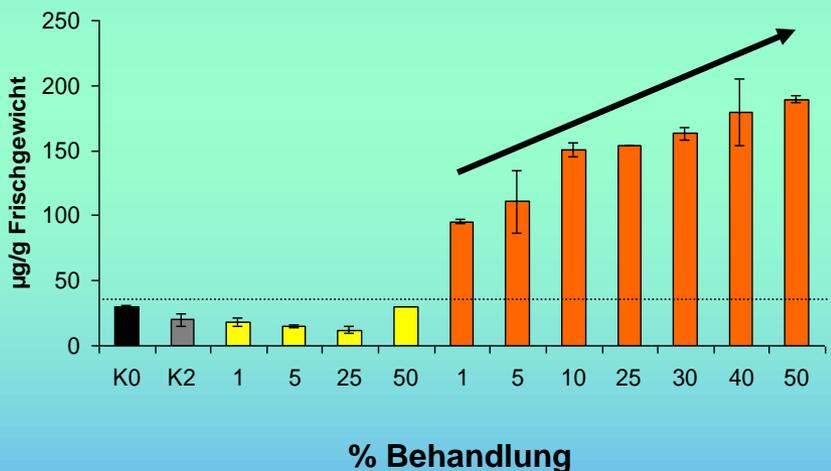
"Nero"



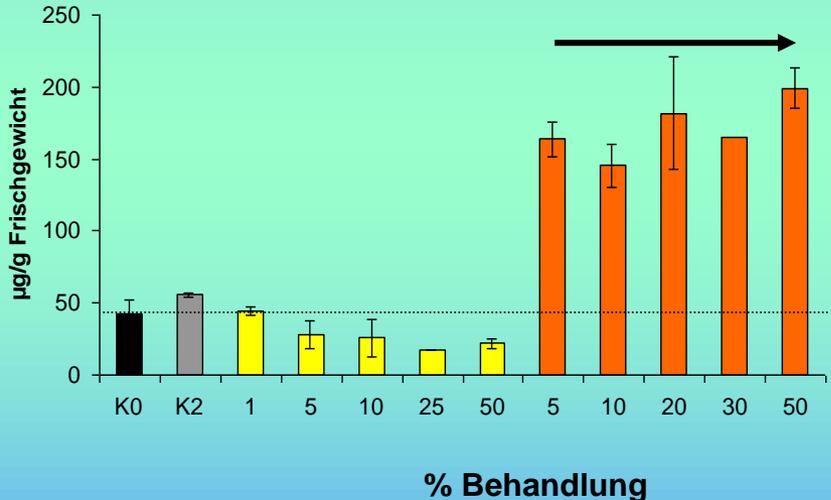
Flavanole (Catechine)

- Hefezellen
- Hefeextrakt

"Regent"



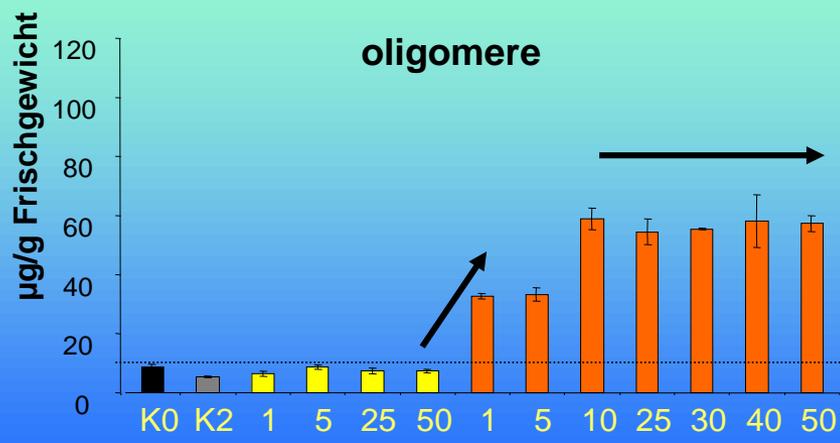
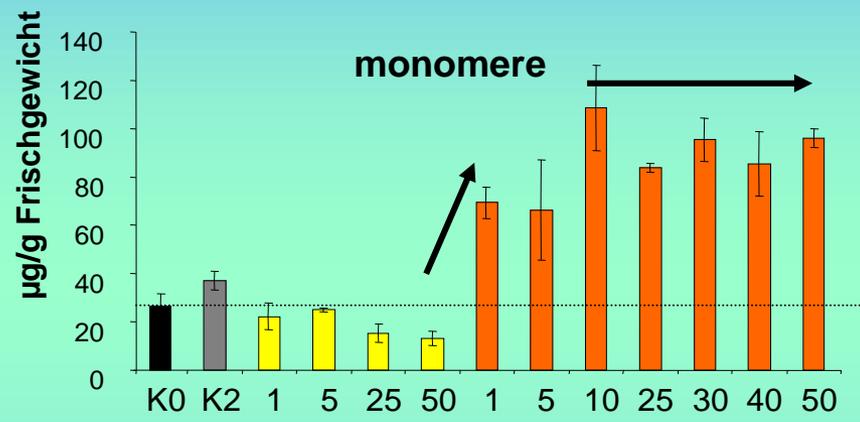
"Nero"



Resveratrol-Derivate

„Regent“

- Hefezellen
- Hefeextrakt



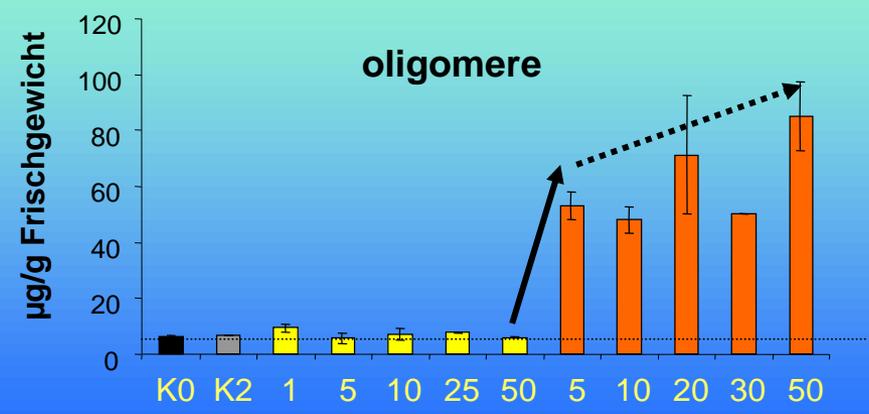
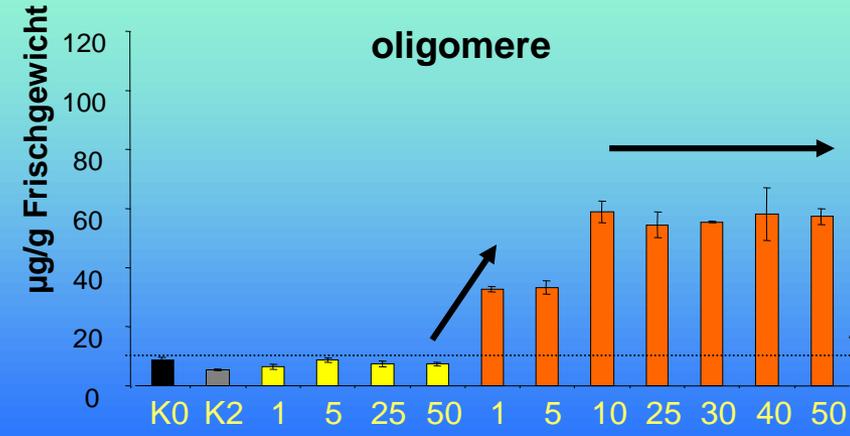
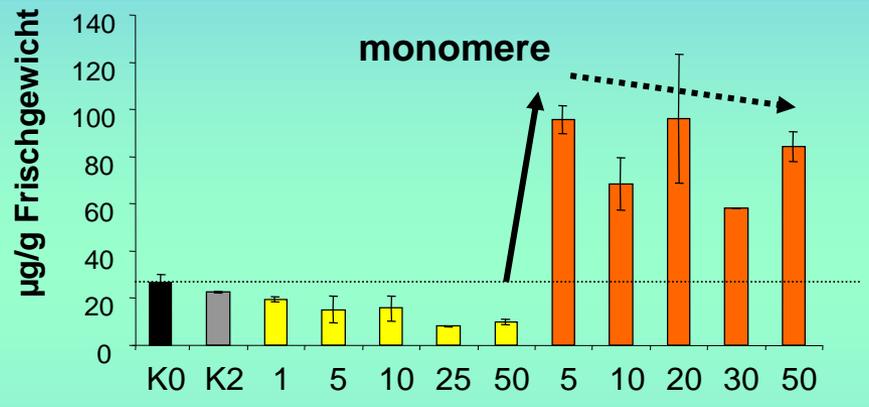
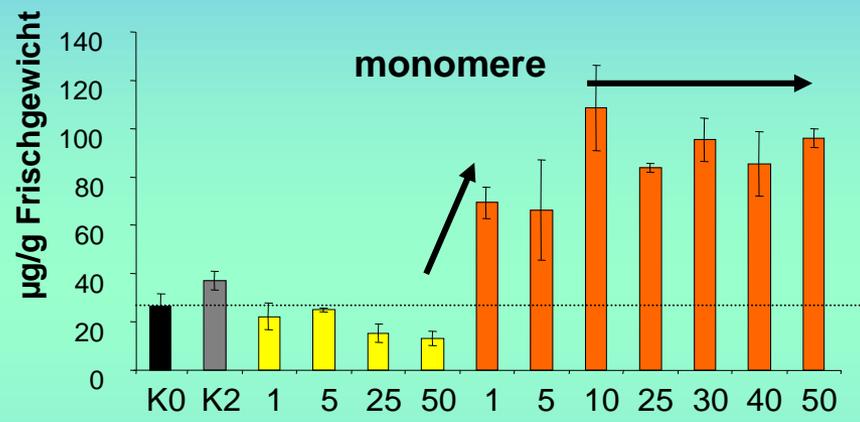
% Behandlung

Resveratrol-Derivate

„Regent“

- Hefezellen
- Hefeextrakt

„Nero“



% Behandlung

% Behandlung

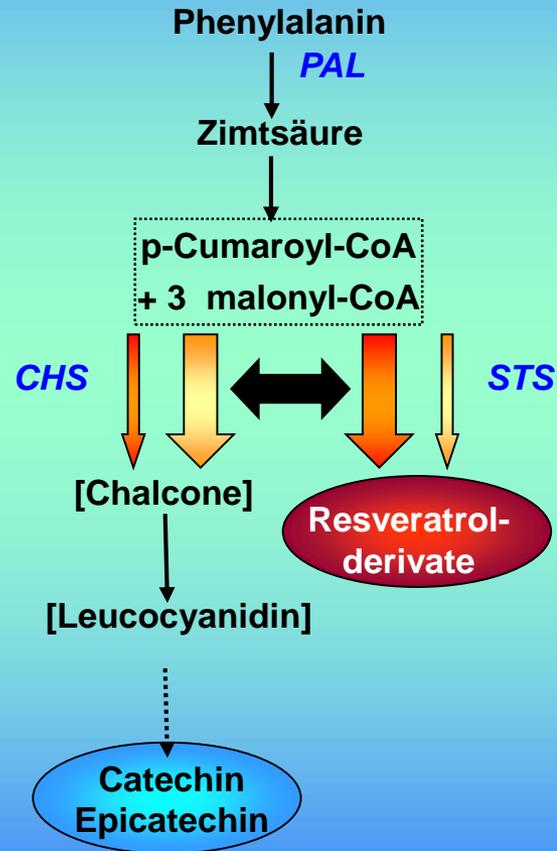
Elicitation mit Bäckerhefe-Extrakt

- ➔ **Gesamtgehalt** an Phenylpropanoiden **und** der **p-Cumarsäure** werden **induziert**
- ➔ Der Grad der Induktion nimmt mit zunehmender Elicitorkonzentration zu

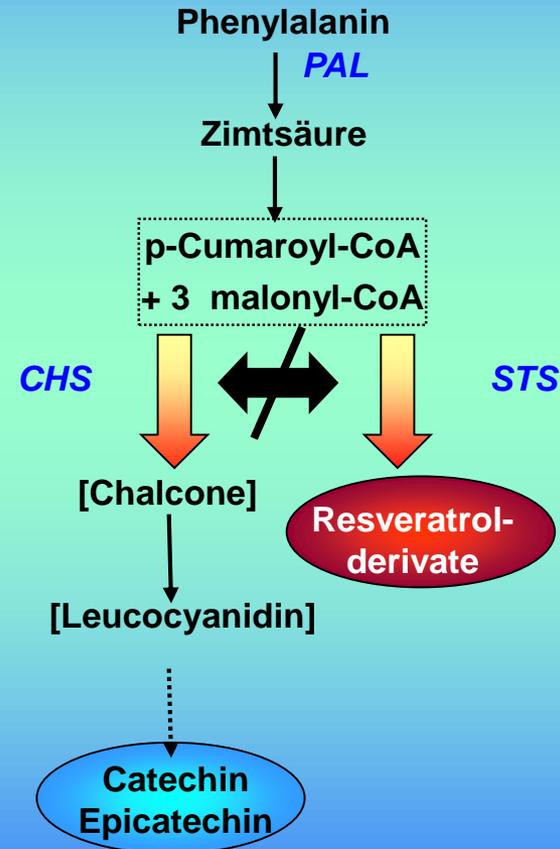
- ➔ **Catechine** werden durch eine Elicitation mit Bäcker-Hefekulturfiltrat **induziert**
- ➔ Der Grad der Induktion nimmt mit zunehmender Elicitorkonzentration zu

- ➔ **Resveratrol**-Derivate werden durch eine Elicitation mit Bäckerhefekulturfiltrat **induziert**
- ➔ schon eine geringe Elicitorkonzentration führt zu einer maximalen Induktion

Aureobasidium pullulans Extrakt



Bäckerhefe Extrakt



PAL: phenylalaninammonia-lyase
CHS: chalconsynthase
STS: stilbensynthase

Hypothesen:

- das Extrakt von *Aureobasidium pullulans* elizitiert den Sekundärstoffwechsel selektiver als das Bäckerhefe-Extrakt

Hypothesen:

- das Extrakt von *Aureobasidium pullulans* elizitiert den Sekundärstoffwechsel selektiver als das Bäckerhefe-Extrakt
- das Bäckerhefe-Extrakt elicitiert die Resveratrol-Synthese schon bei 1%iger Lösung maximal, sodass sich Catechine weiter anreichern. Bei 50% *Aureobasidium pullulans* Extrakt ist dieser Punkt noch nicht erreicht.

Elicitation von Weinblüten mit *Aureobasidium pullulans*-Extrakt

- Sorten: Müller Thurgau (sehr anfällig)

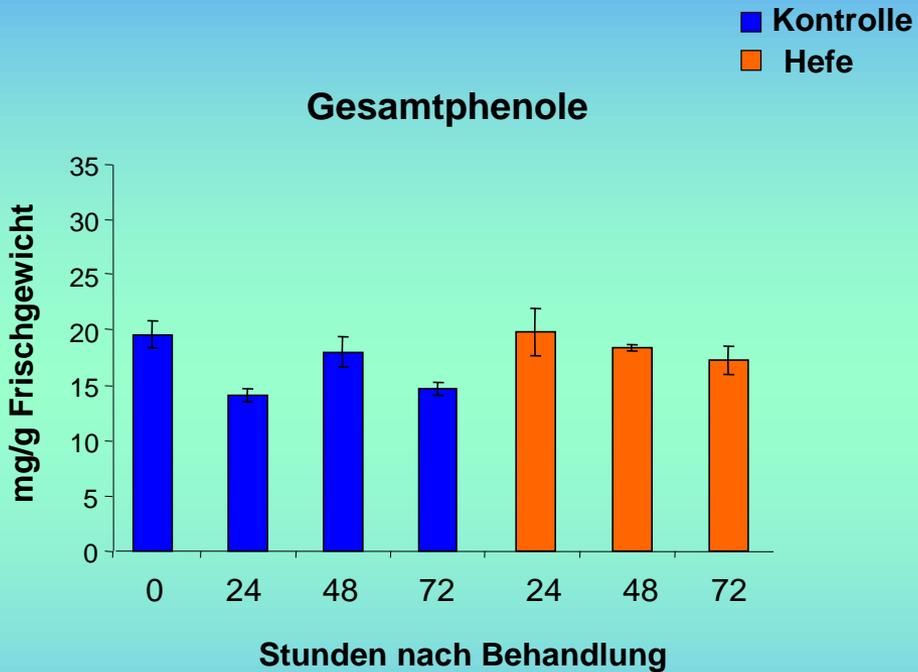
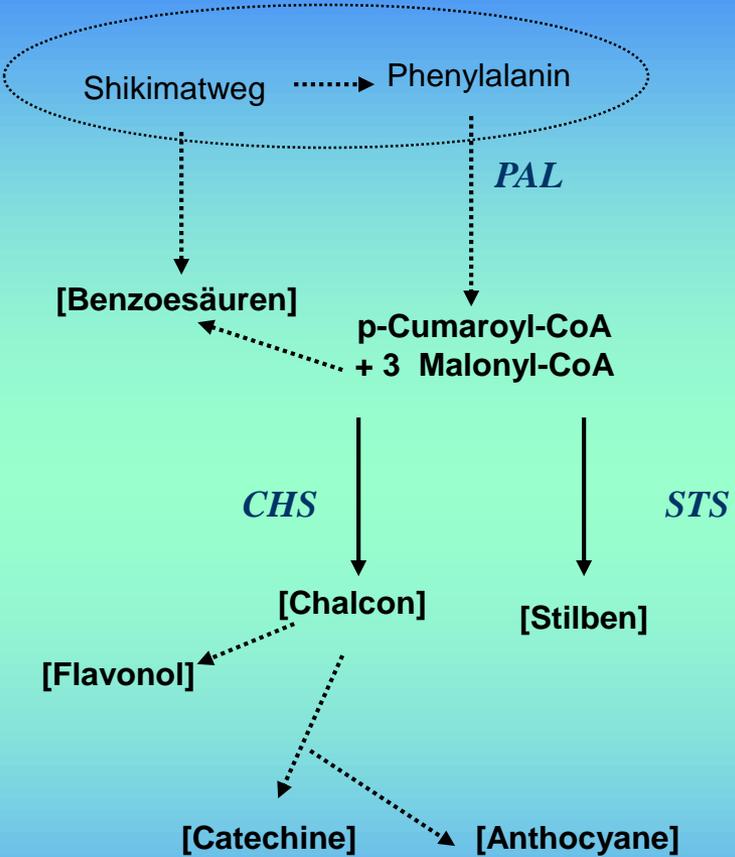
Blauer Spätburgunder

Regent (resistent gegen div. Pilze)



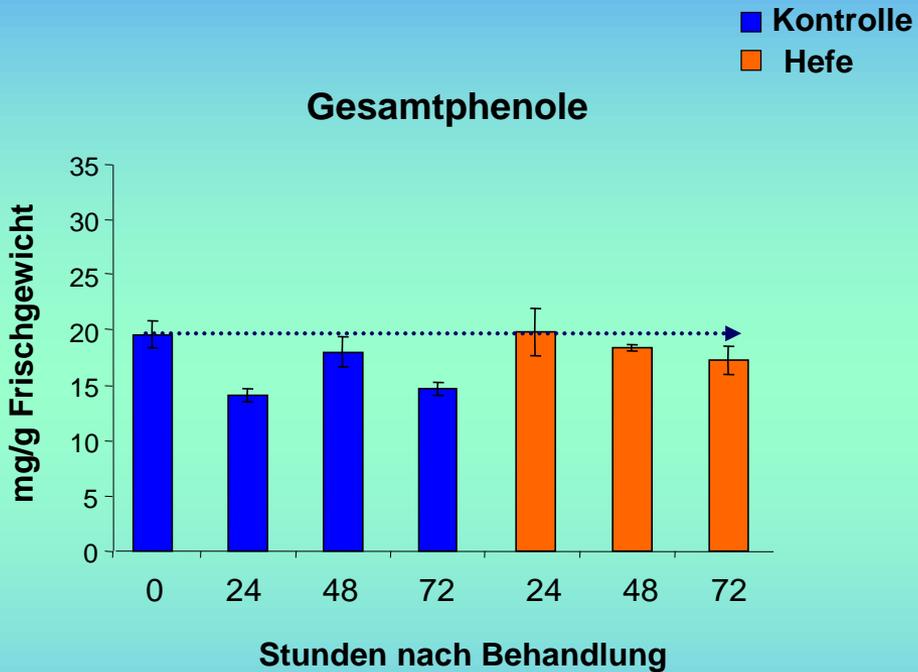
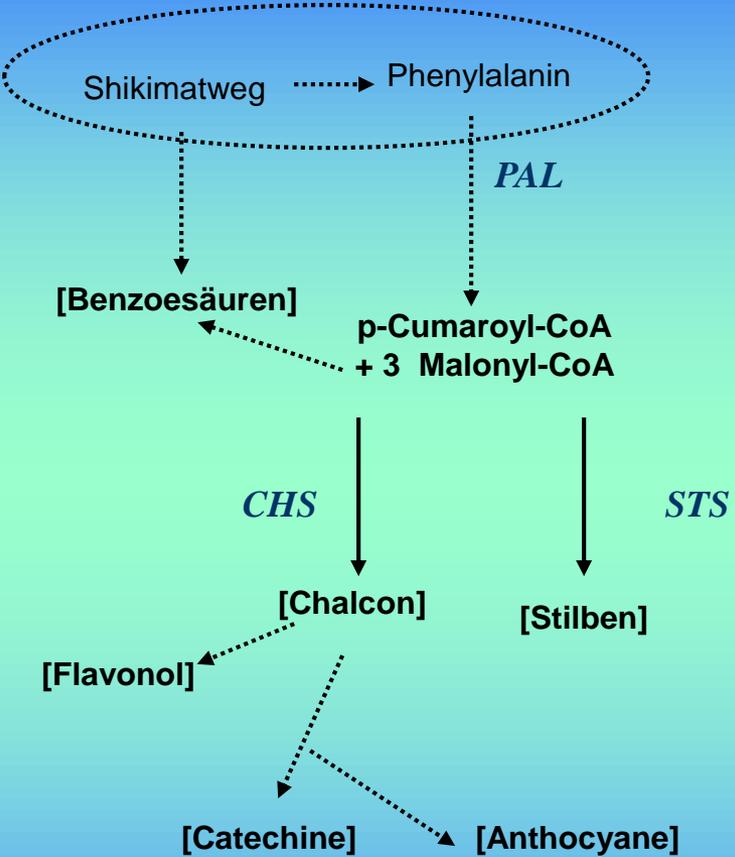
- Behandlung mit Hefeextrakt bzw. Plate Count Medium (Kontrolle) in die Blüte
- Probenahme nach 24, 48 und 72 h
 - ➡ HPLC-Analyse (Frischextraktion)
 - ➡ Untersuchungen von Enzymaktivitäten

„Blauer Spätburgunder“



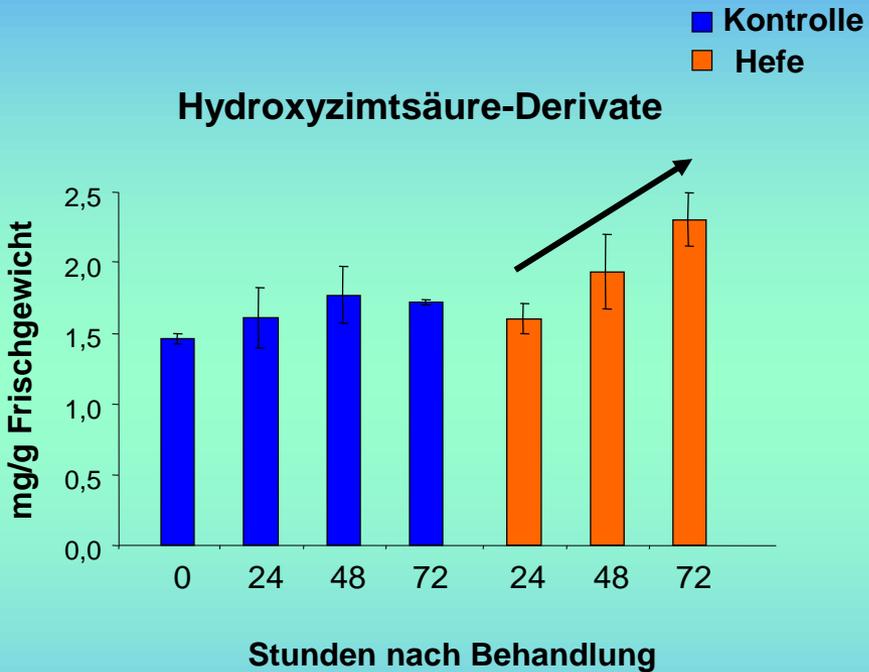
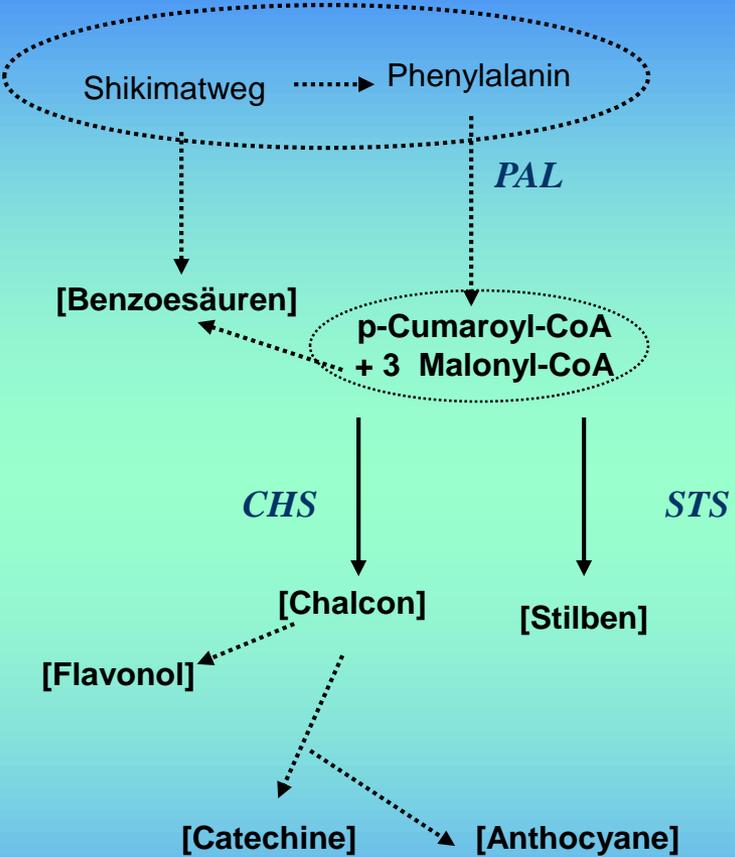
PAL: Phenylalaninammonium-lyase
CHS: Chalconsynthase
STS: Stilbensynthase

„Blauer Spätburgunder“



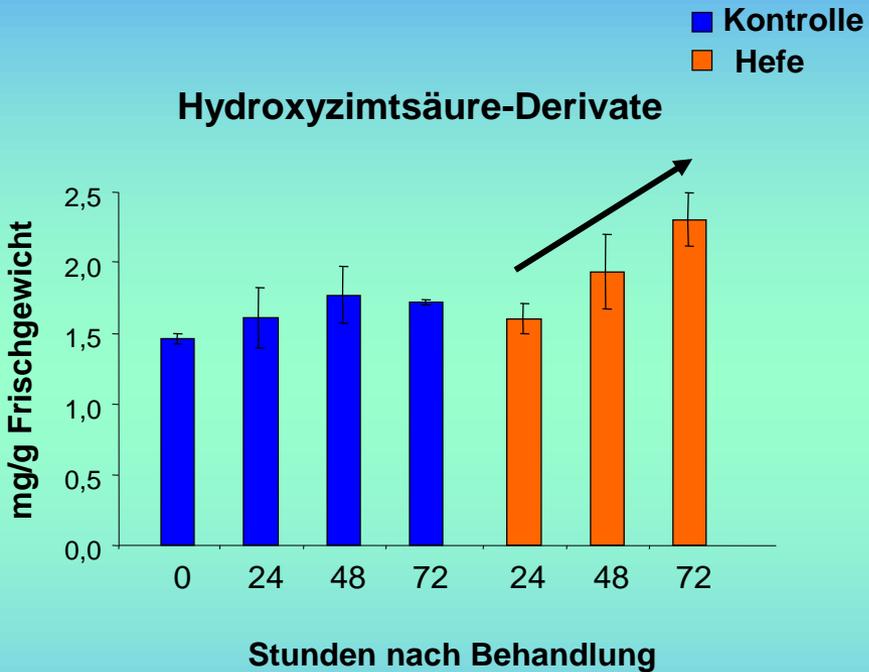
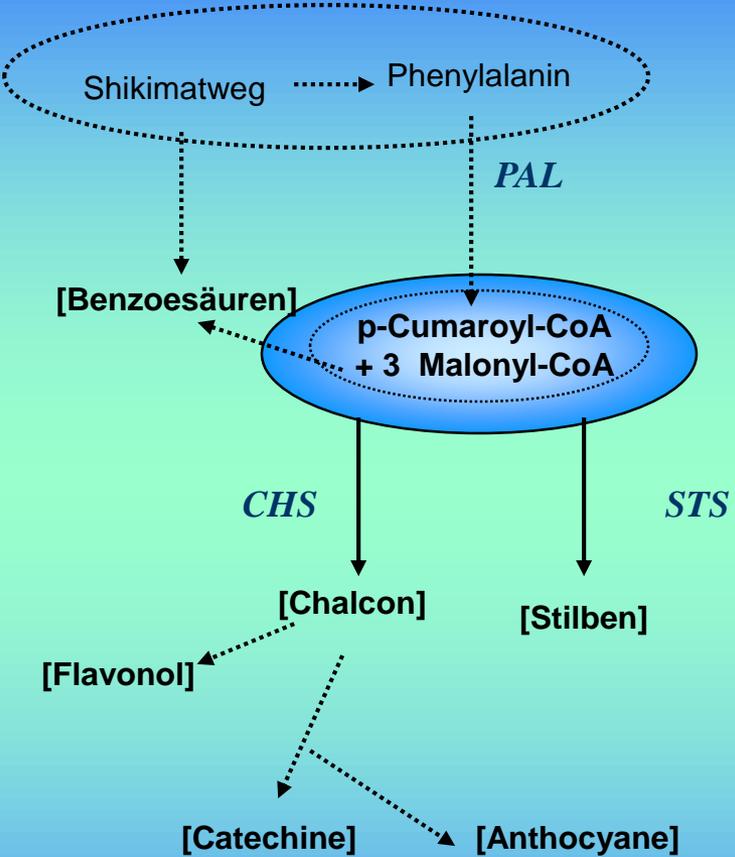
PAL: Phenylalaninammonium-lyase
CHS: Chalconsynthase
STS: Stilbensynthase

„Blauer Spätburgunder“



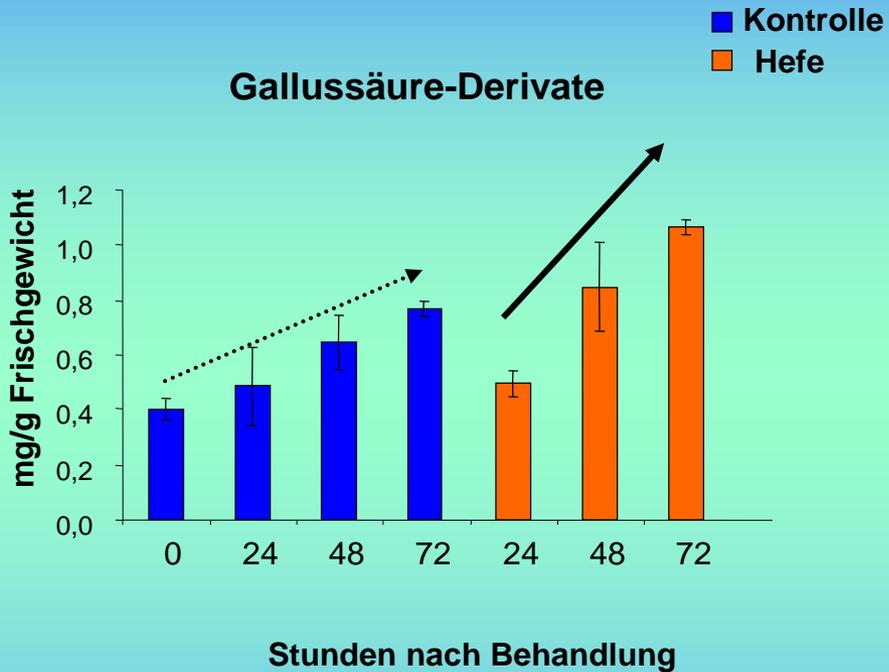
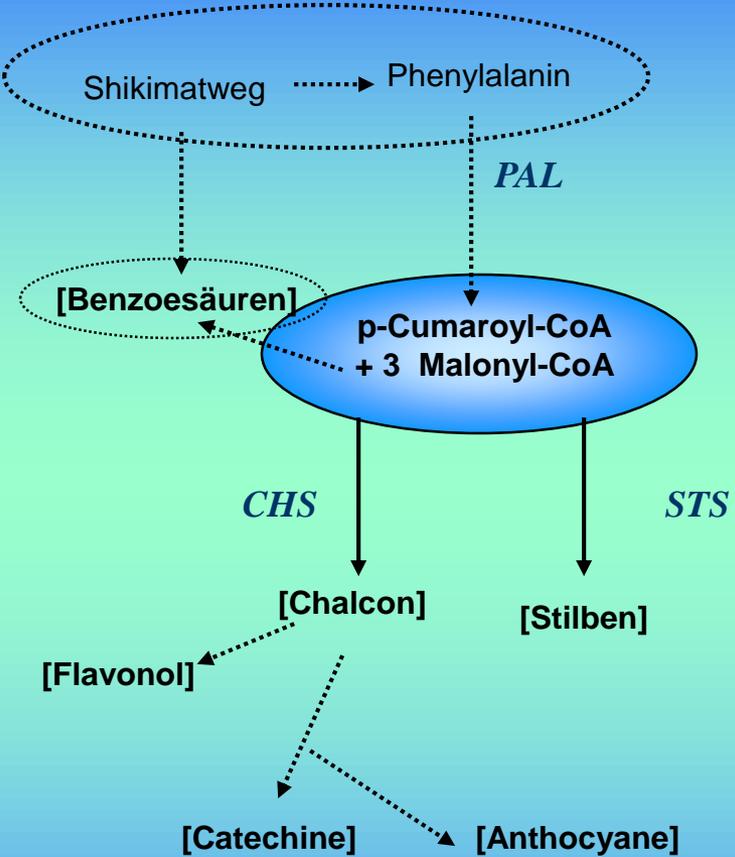
PAL: Phenylalaninammonium-lyase
CHS: Chalconsynthase
STS: Stilbensynthase

„Blauer Spätburgunder“



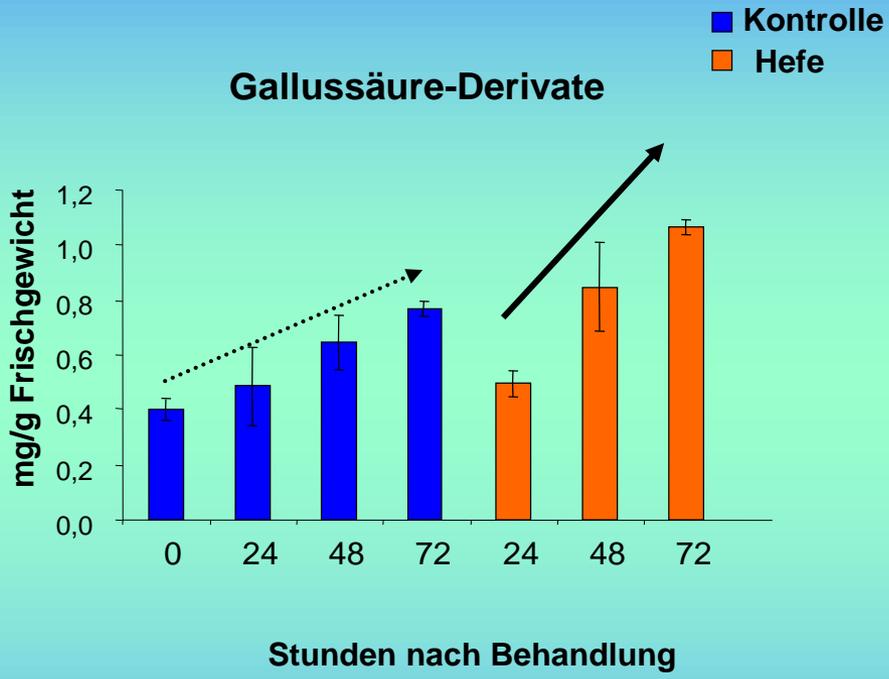
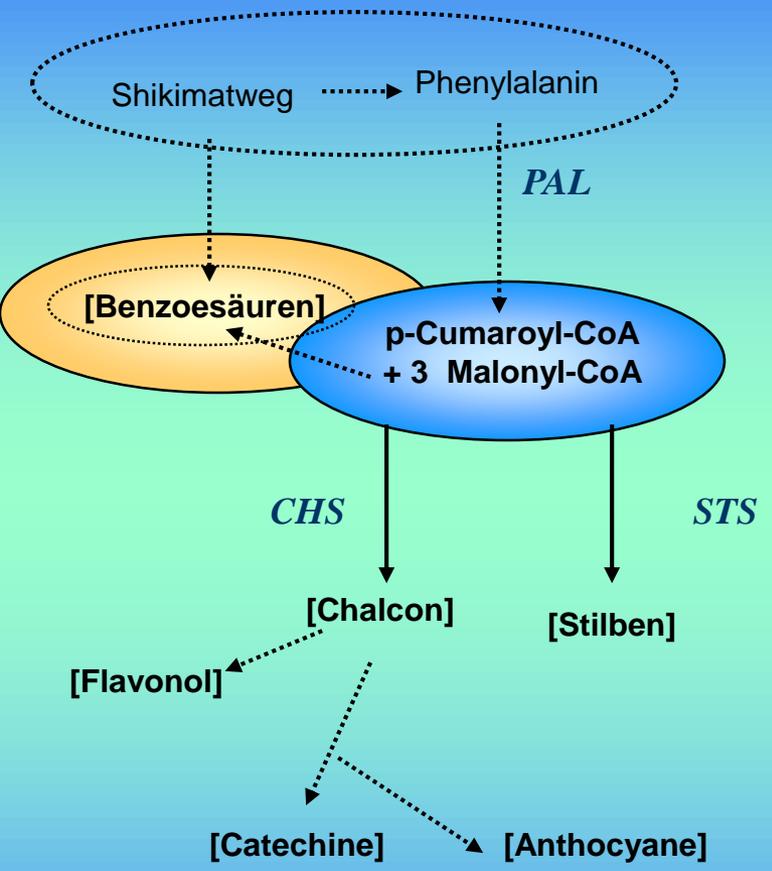
PAL: Phenylalaninammonium-lyase
CHS: Chalconsynthase
STS: Stilbensynthase

„Blauer Spätburgunder“



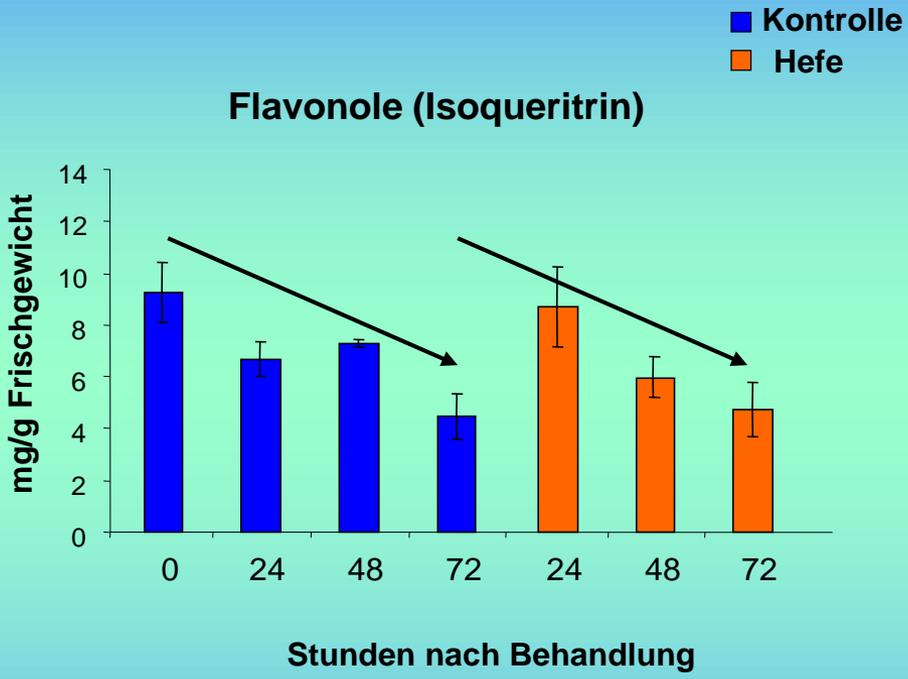
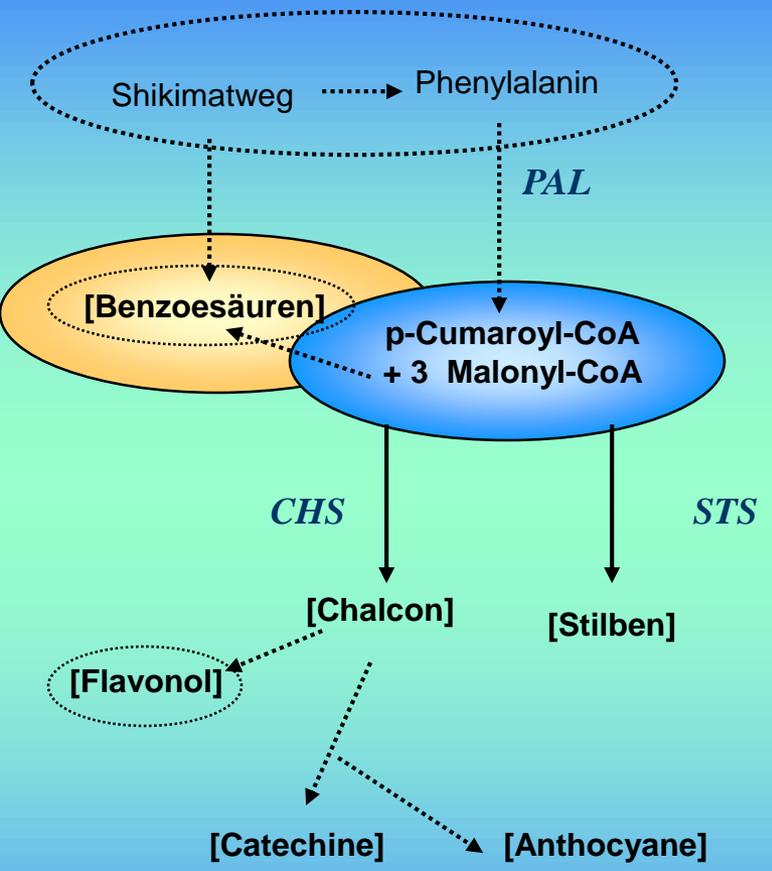
PAL: Phenylalaninammonium-lyase
CHS: Chalconsynthase
STS: Stilbensynthase

„Blauer Spätburgunder“



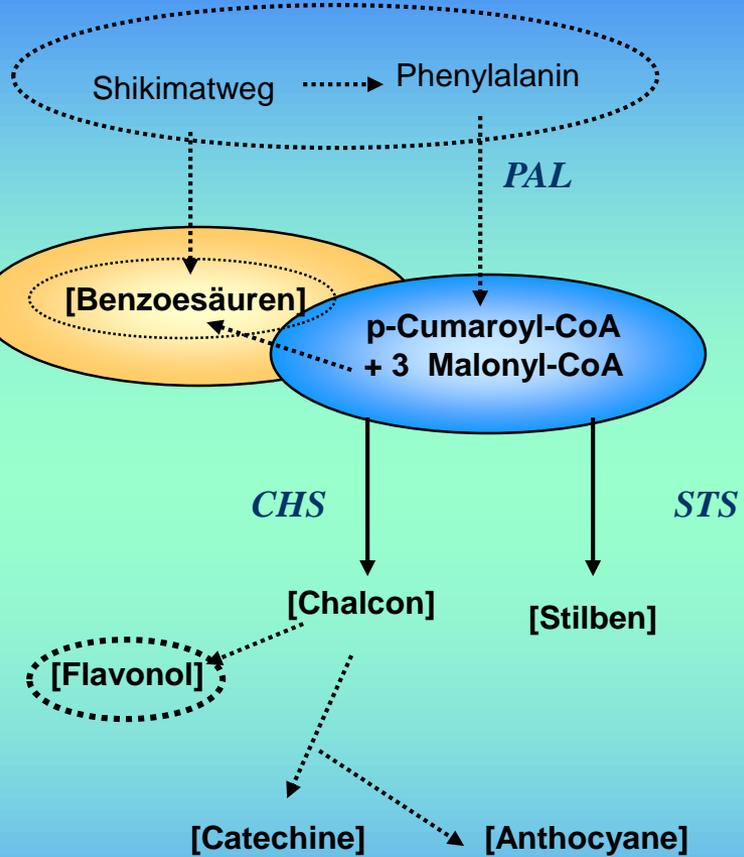
PAL: Phenylalaninammonium-lyase
CHS: Chalconsynthase
STS: Stilbensynthase

„Blauer Spätburgunder“

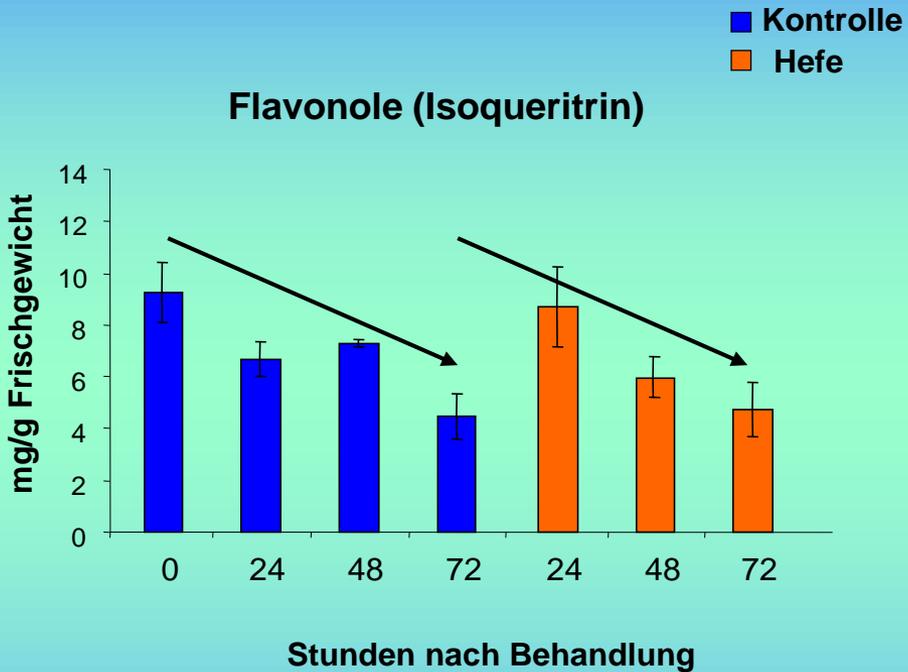


PAL: Phenylalaninammonium-lyase
CHS: Chalconsynthase
STS: Stilbensynthase

„Blauer Spätburgunder“

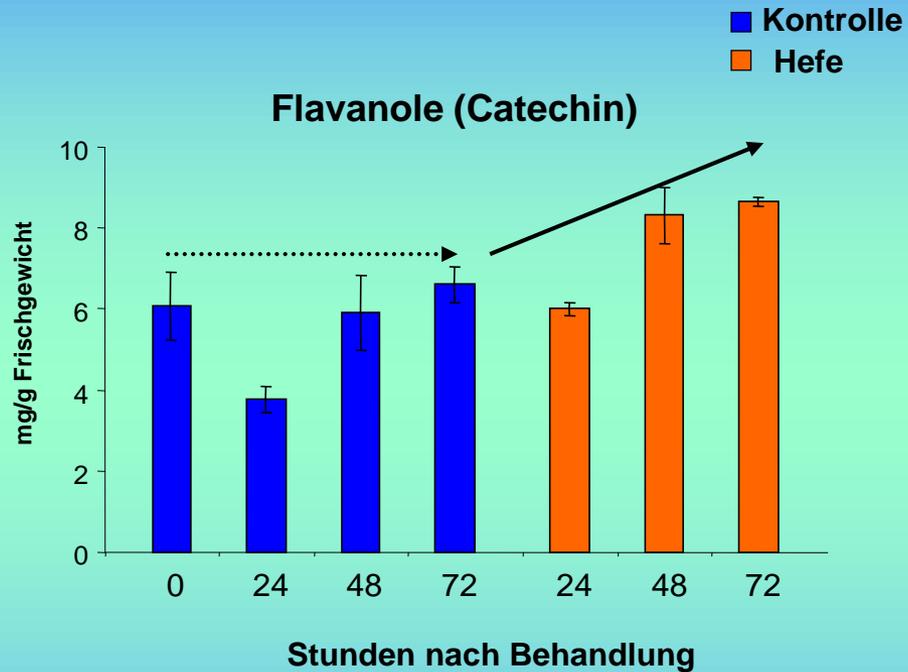
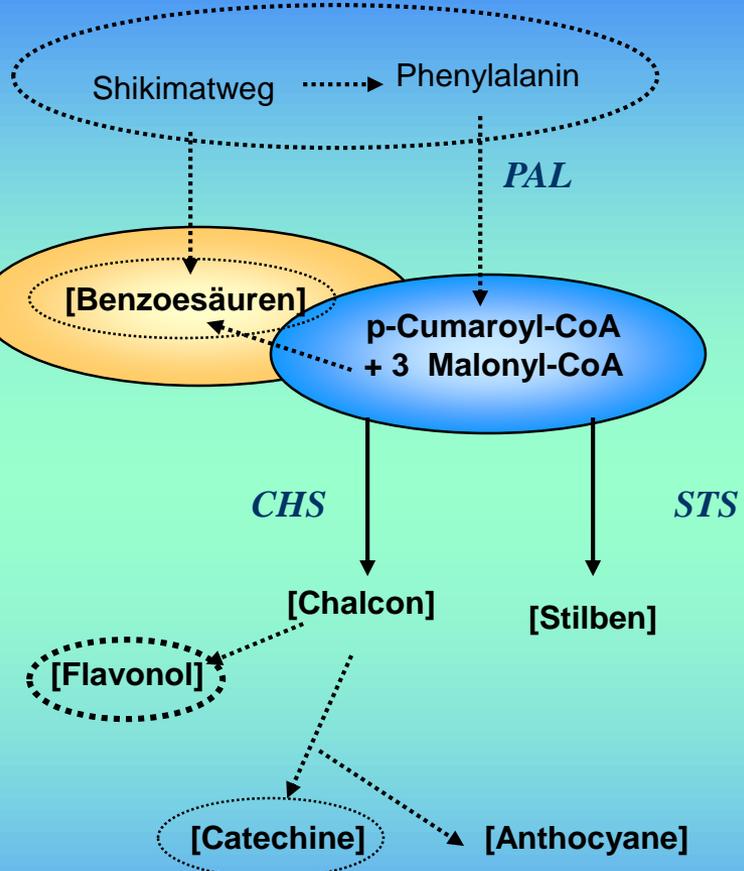


Flavonole (Isoqueritrin)



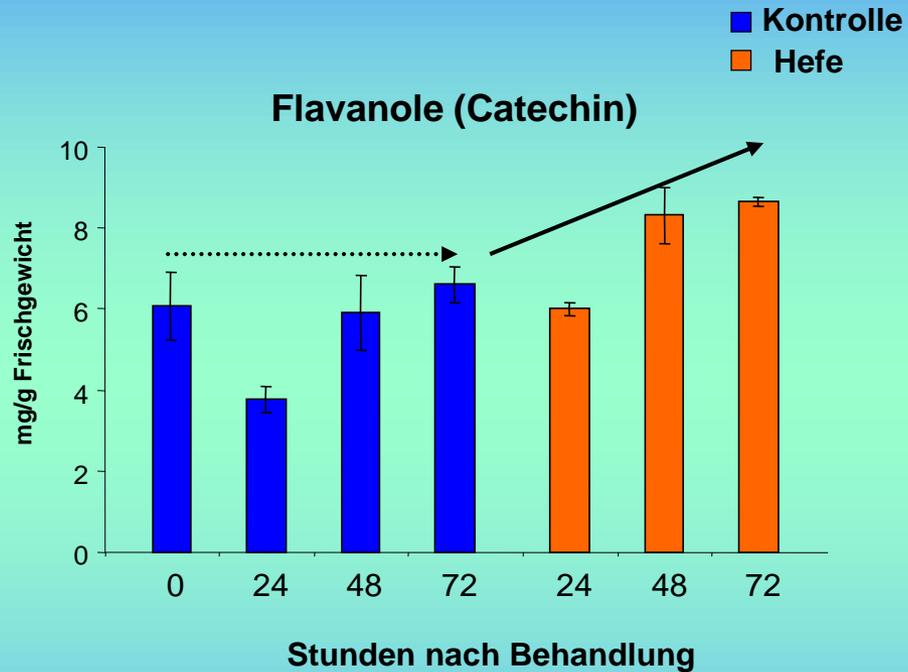
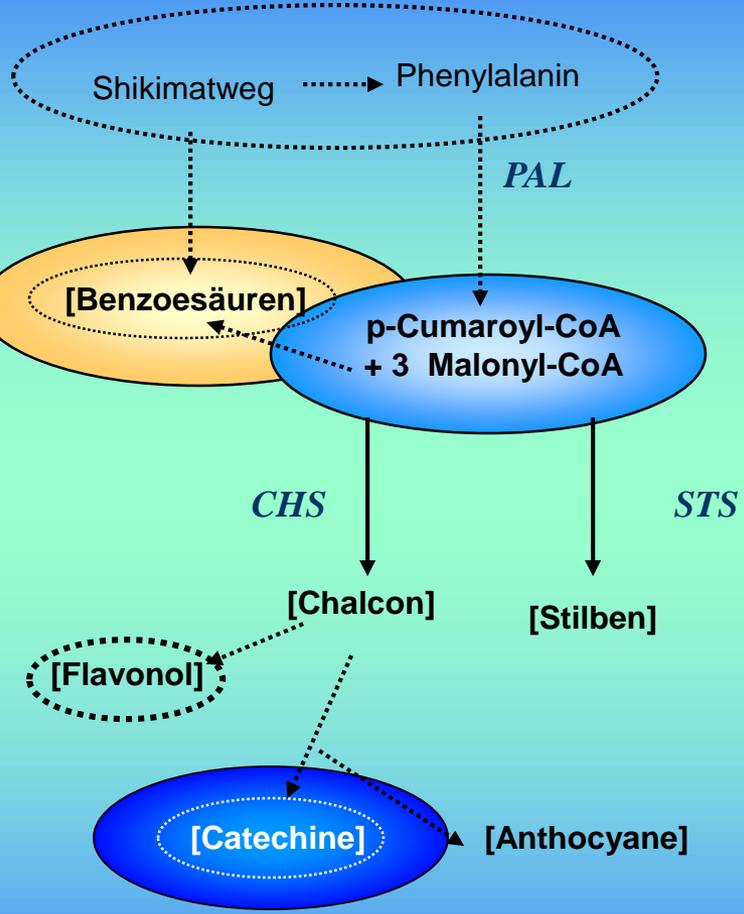
PAL: Phenylalaninammonium-lyase
 CHS: Chalconsynthase
 STS: Stilbensynthase

„Blauer Spätburgunder“



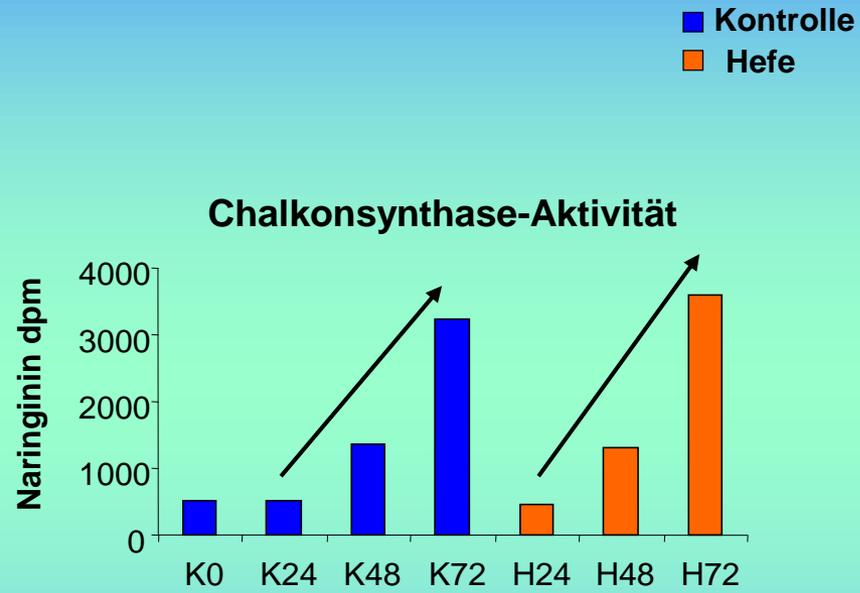
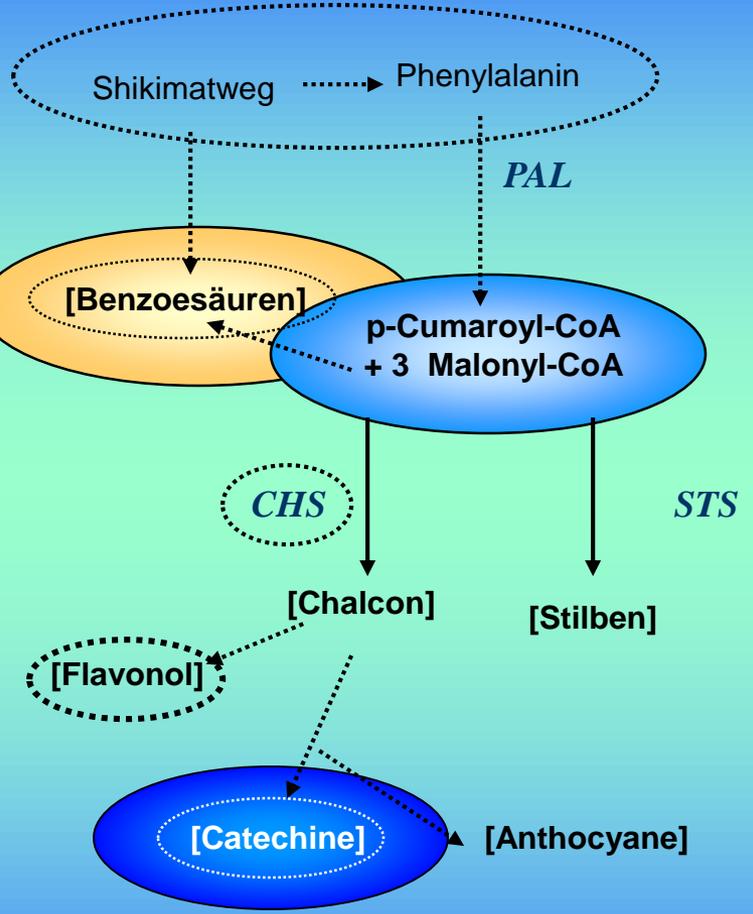
PAL: Phenylalaninammonium-lyase
CHS: Chalconsynthase
STS: Stilbensynthase

„Blauer Spätburgunder“



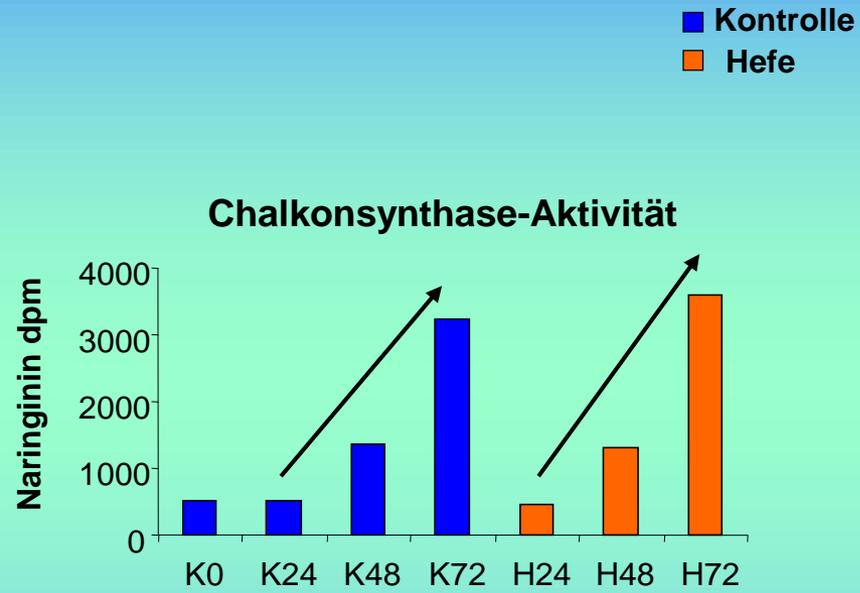
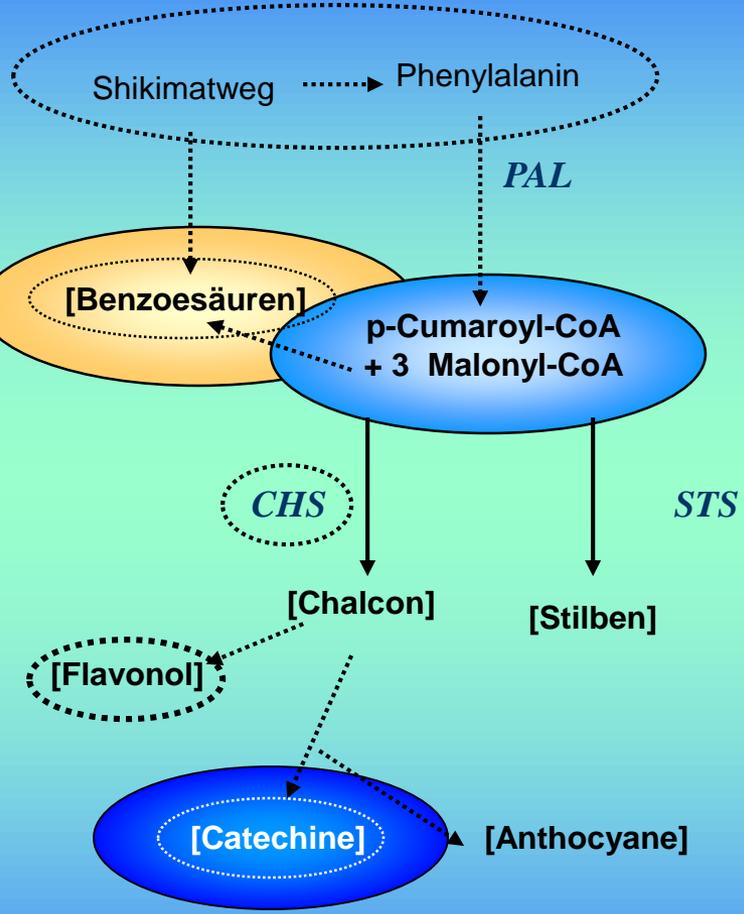
PAL: Phenylalaninammonium-lyase
CHS: Chalconsynthase
STS: Stilbensynthase

„Blauer Spätburgunder“



PAL: Phenylalaninammonium-lyase
CHS: Chalkonsynthase
STS: Stilbensynthase

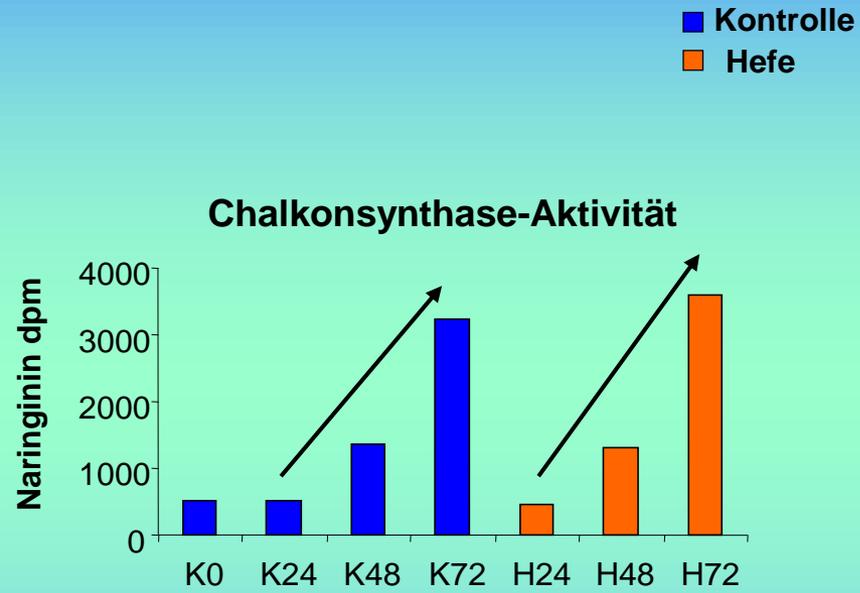
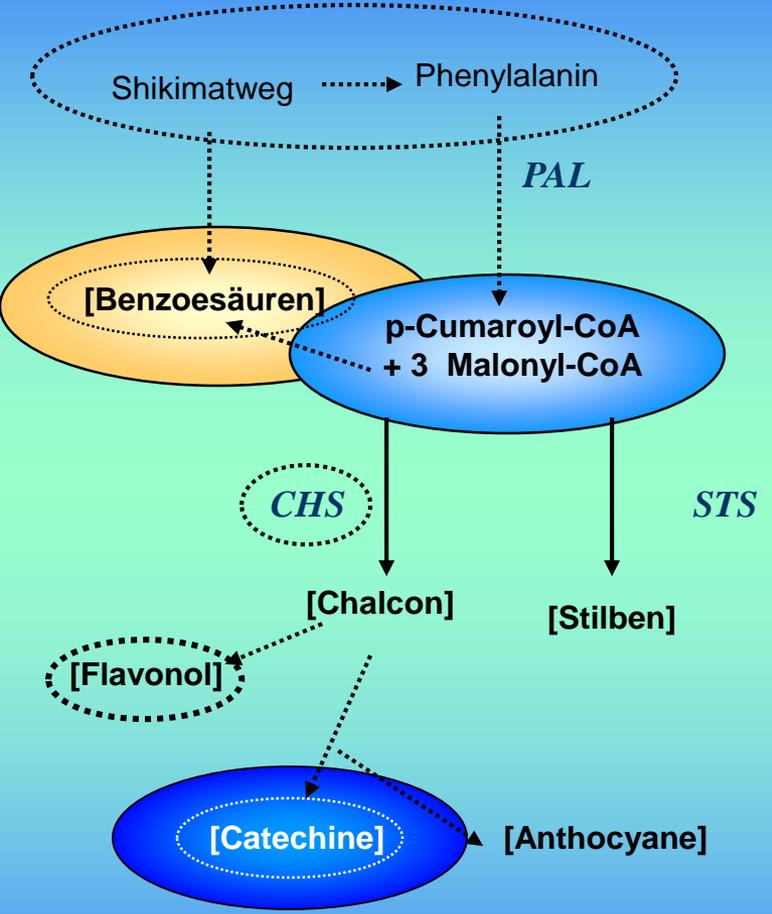
„Blauer Spätburgunder“



•Das Kulturmedium hat eine induzierende Wirkung

PAL: Phenylalaninammonium-lyase
 CHS: Chalkonsynthase
 STS: Stilbensynthase

„Blauer Spätburgunder“

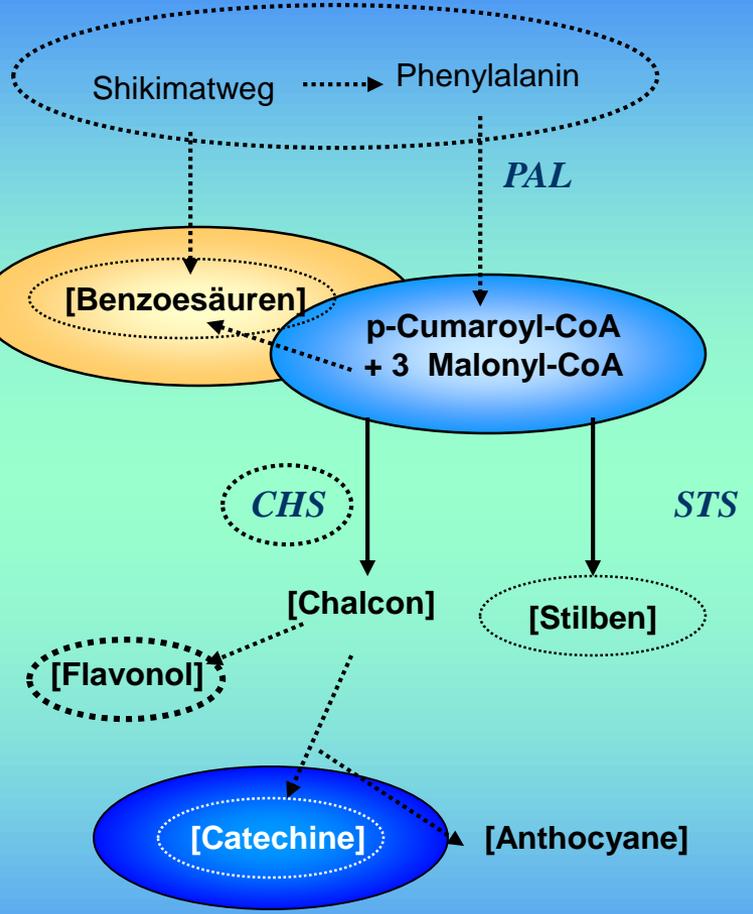


•Das Kulturmedium hat eine induzierende Wirkung

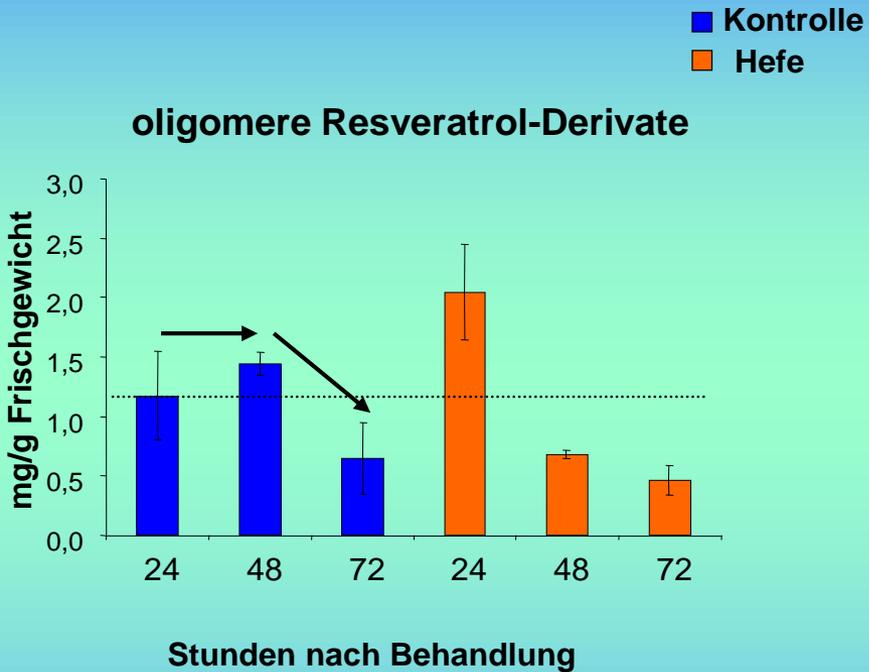
•Die Chalkonsynthese-Aktivität nimmt mit zunehmender Blütenentwicklung zu

PAL: Phenylalaninammonium-lyase
CHS: Chalkonsynthase
STS: Stilbensynthase

„Blauer Spätburgunder“

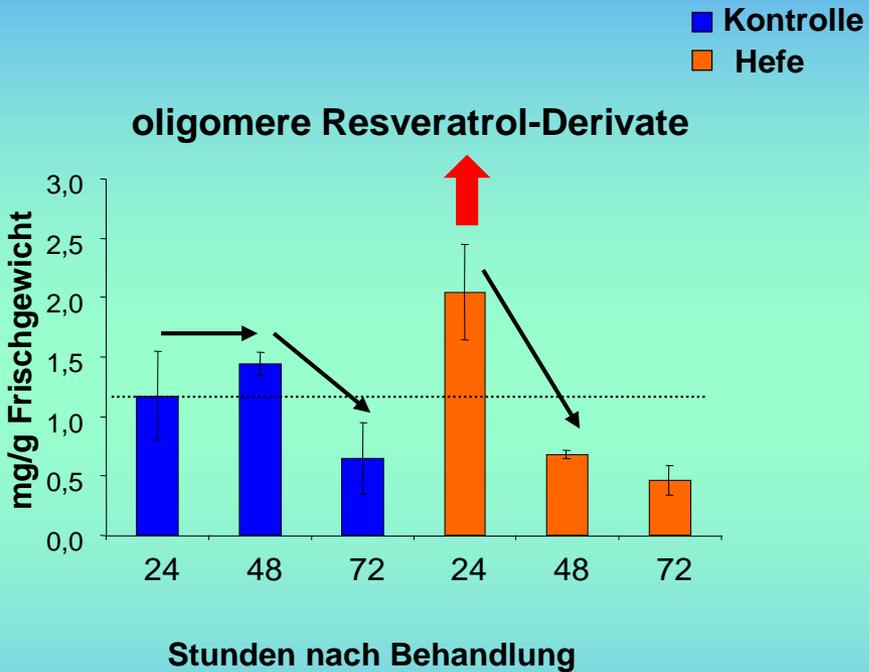
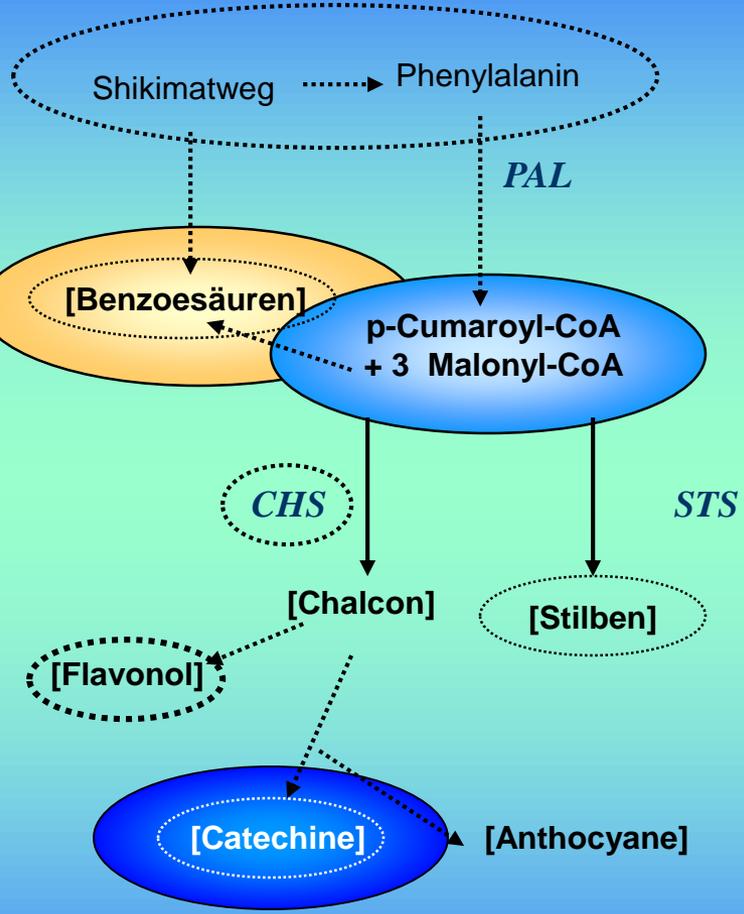


oligomere Resveratrol-Derivate



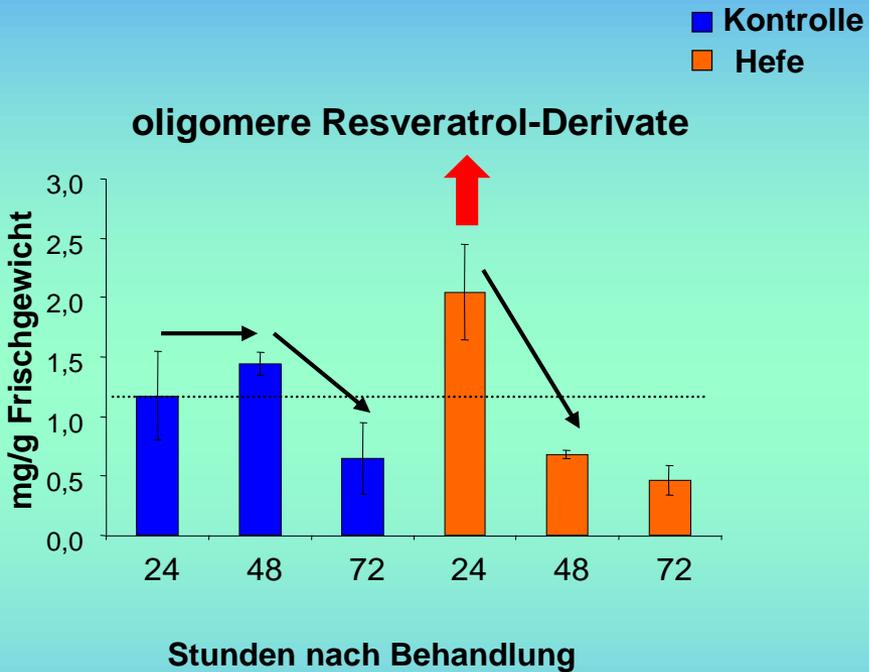
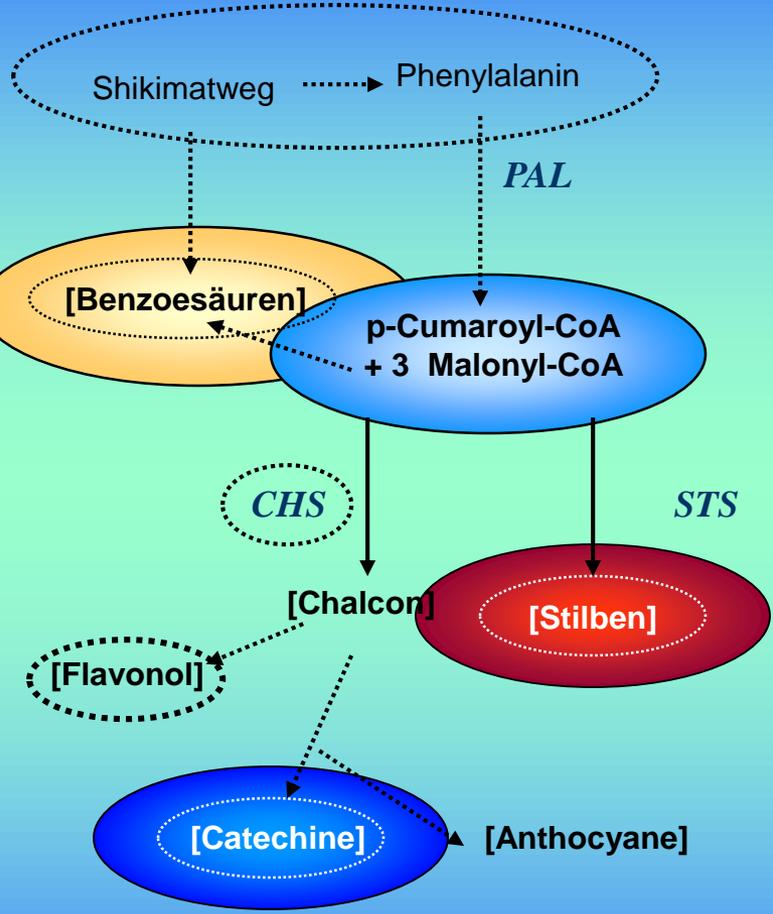
PAL: Phenylalaninammonium-lyase
CHS: Chalconsynthase
STS: Stilbensynthase

„Blauer Spätburgunder“



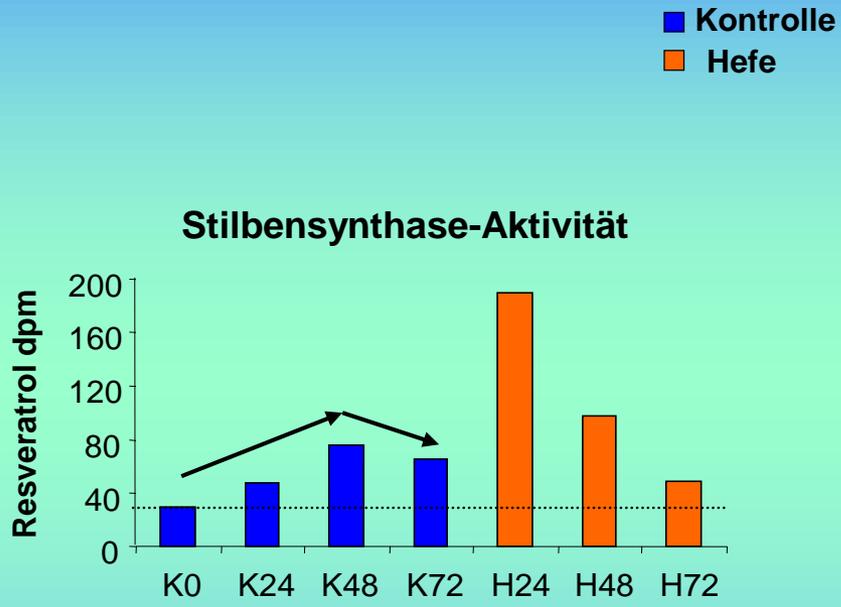
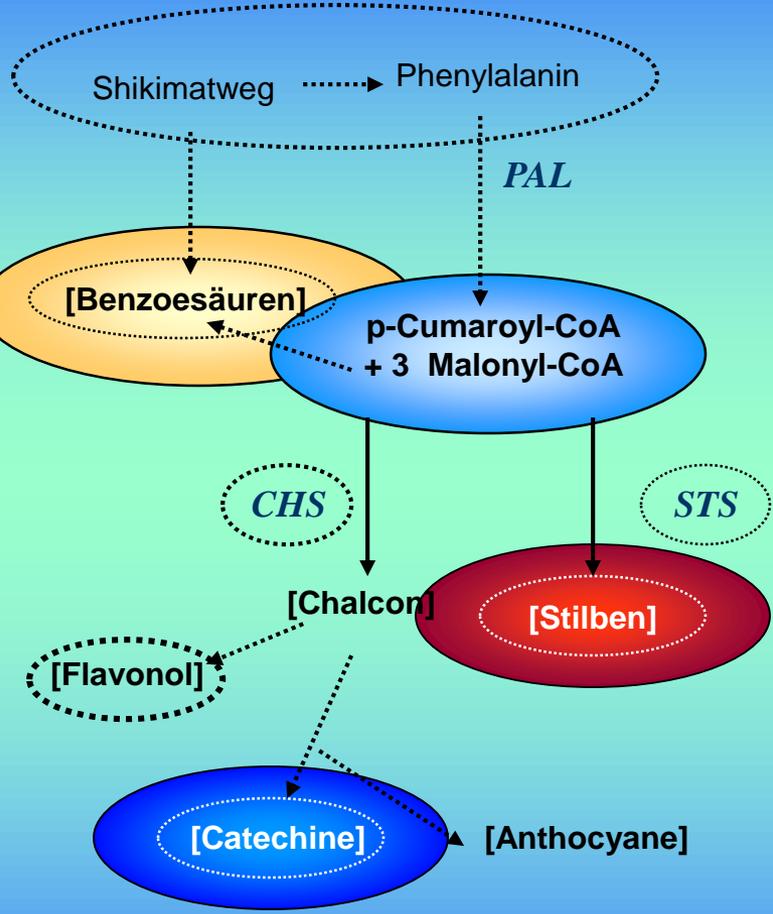
PAL: Phenylalaninammonium-lyase
CHS: Chalconsynthase
STS: Stilbensynthase

„Blauer Spätburgunder“



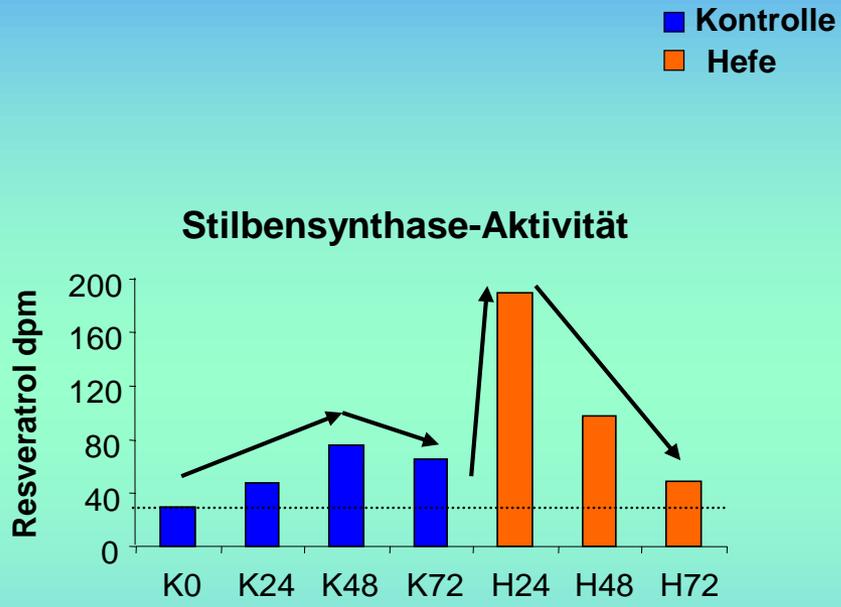
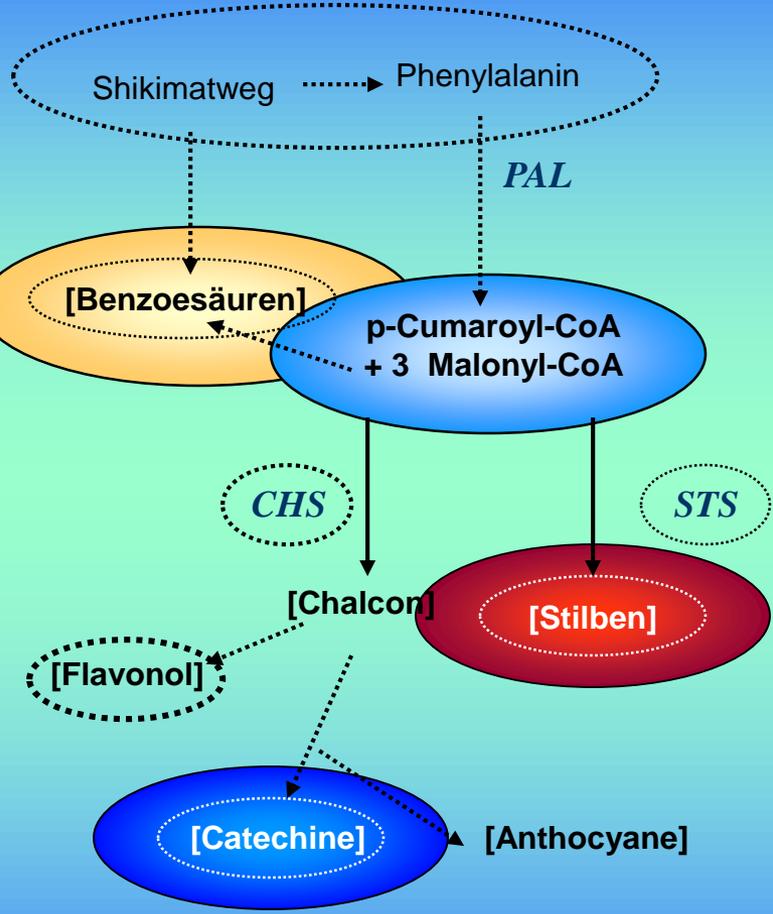
PAL: Phenylalaninammonium-lyase
CHS: Chalconsynthase
STS: Stilbensynthase

„Blauer Spätburgunder“



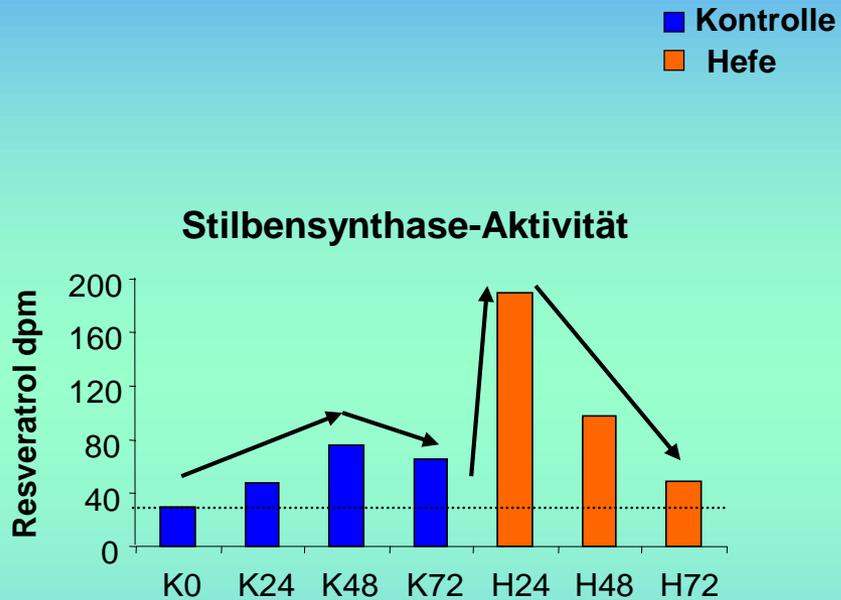
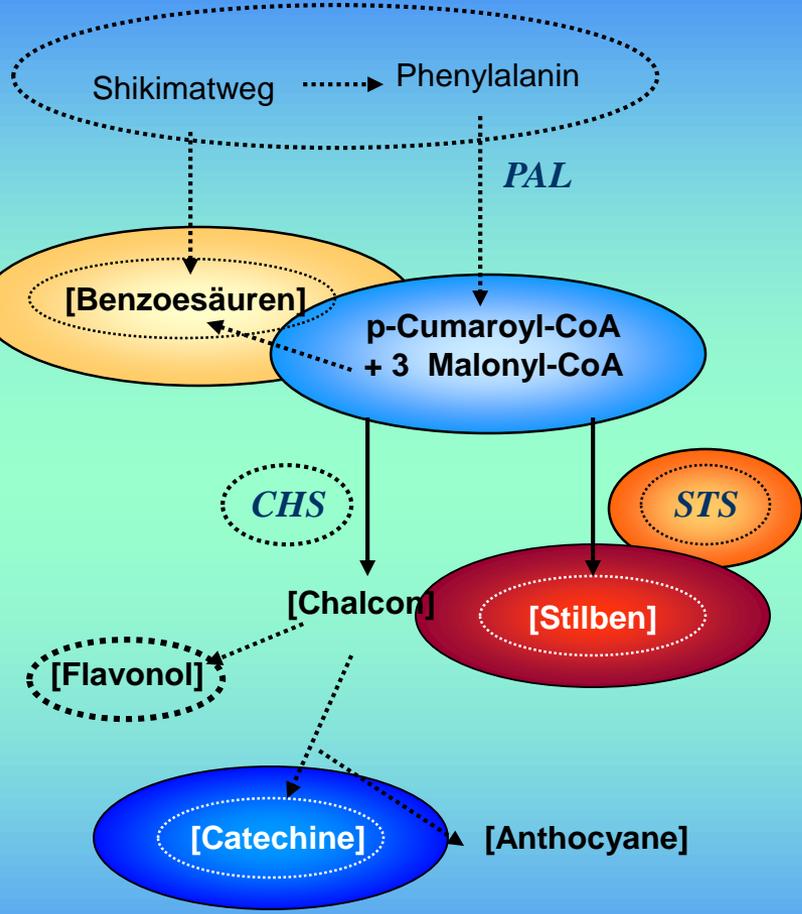
PAL: Phenylalaninammonium-lyase
 CHS: Chalconsynthase
 STS: Stilbensynthase

„Blauer Spätburgunder“



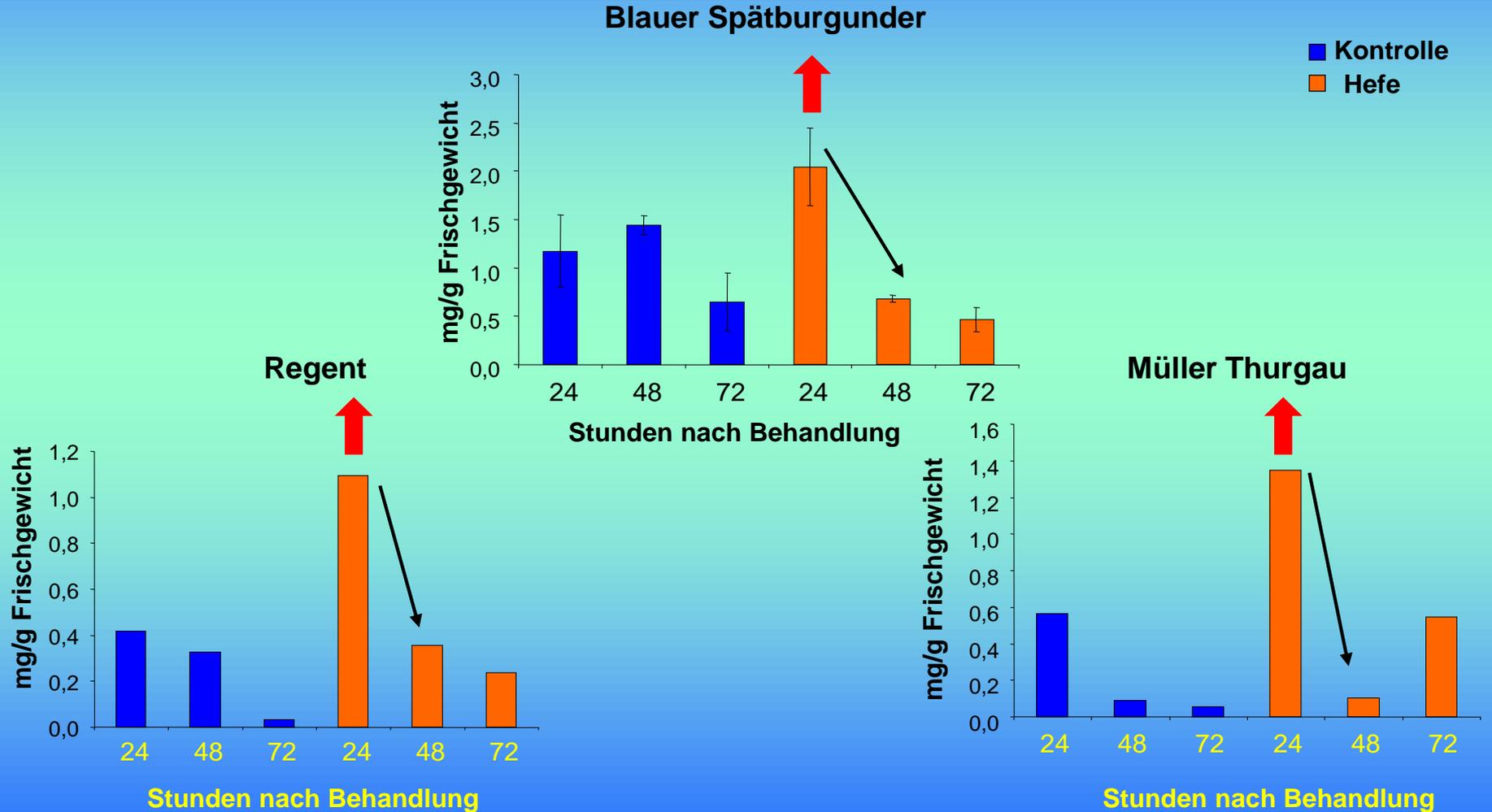
PAL: Phenylalaninammonium-lyase
CHS: Chalconsynthase
STS: Stilbensynthase

„Blauer Spätburgunder“



PAL: Phenylalaninammonium-lyase
CHS: Chalconsynthase
STS: Stilbensynthase

Elicitation von oligomeren Resveratrol-Derivaten

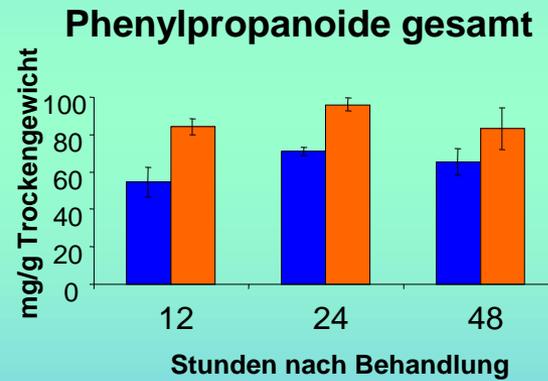


Elicitation von Weinblättern mit *Aureobasidium pullulans*-Extrakt

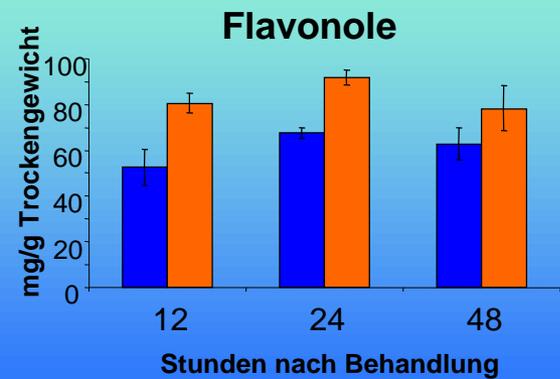
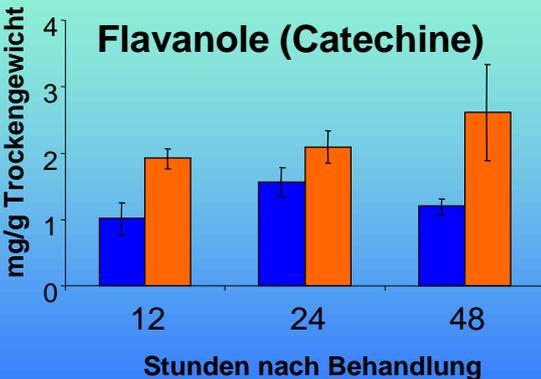
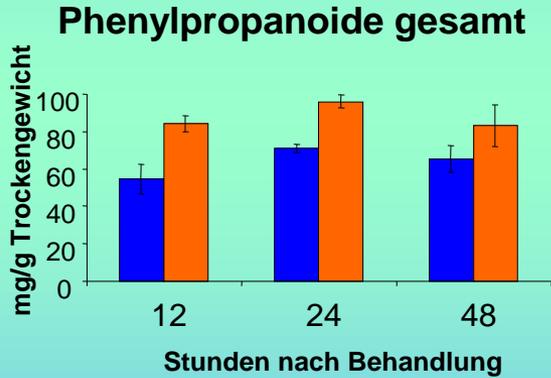
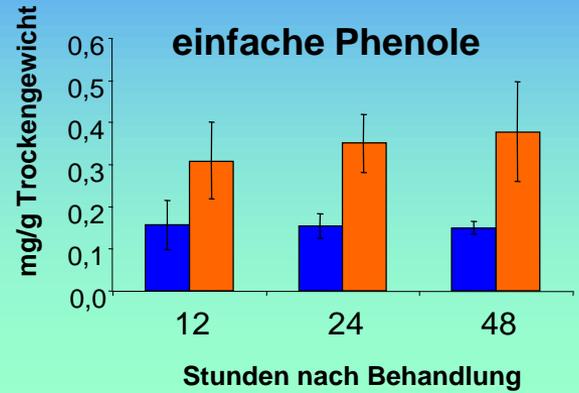
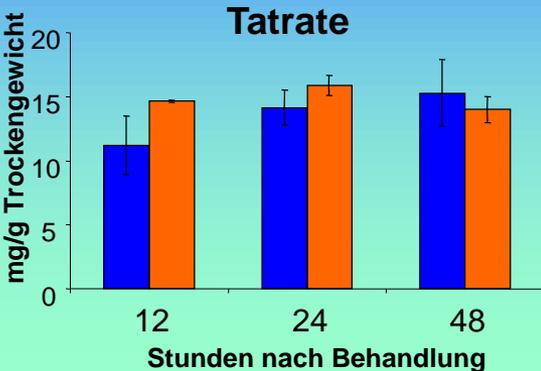
- Sorten: Müller Thurgau (sehr anfällig)
Blauer Spätburgunder
Regent (resistent gegen div. Pilze)
- Blätter werden in Hefeextrakt bzw. Plate Count Medium (Kontrolle) getaucht
- Probenahme nach 12, 24 und 48 h
➔ HPLC-Analyse

„Regent“ (Blatt 5)

■ Kontrolle
■ Hefe



„Regent“ (Blatt 5)

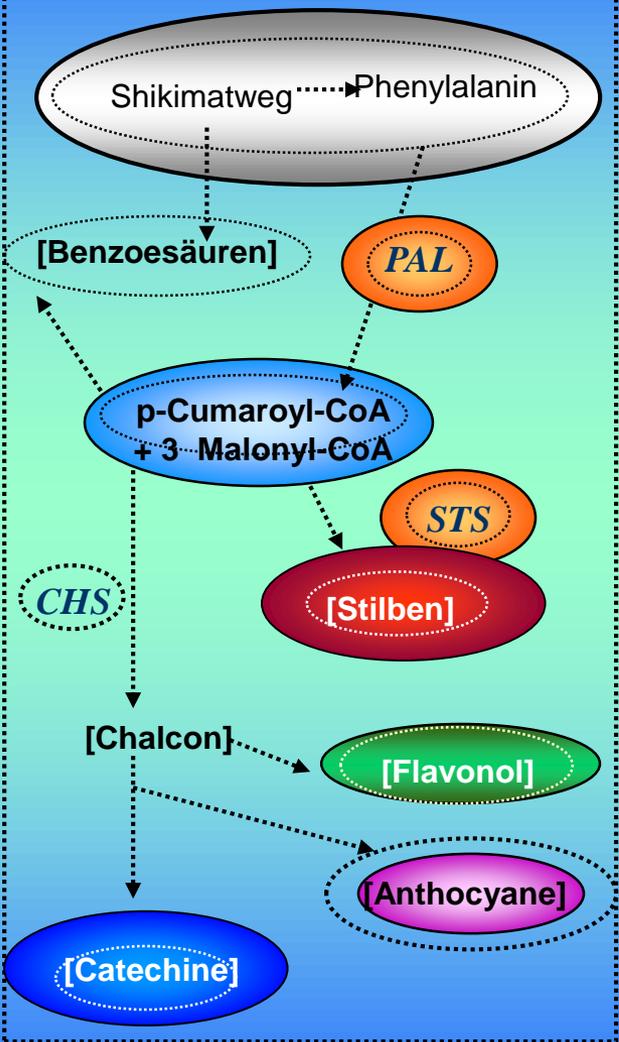


Durch Hefeextrakt elicitierte Stilbene
konnten in Weinblättern (Blatt 5) noch nicht
identifiziert werden!

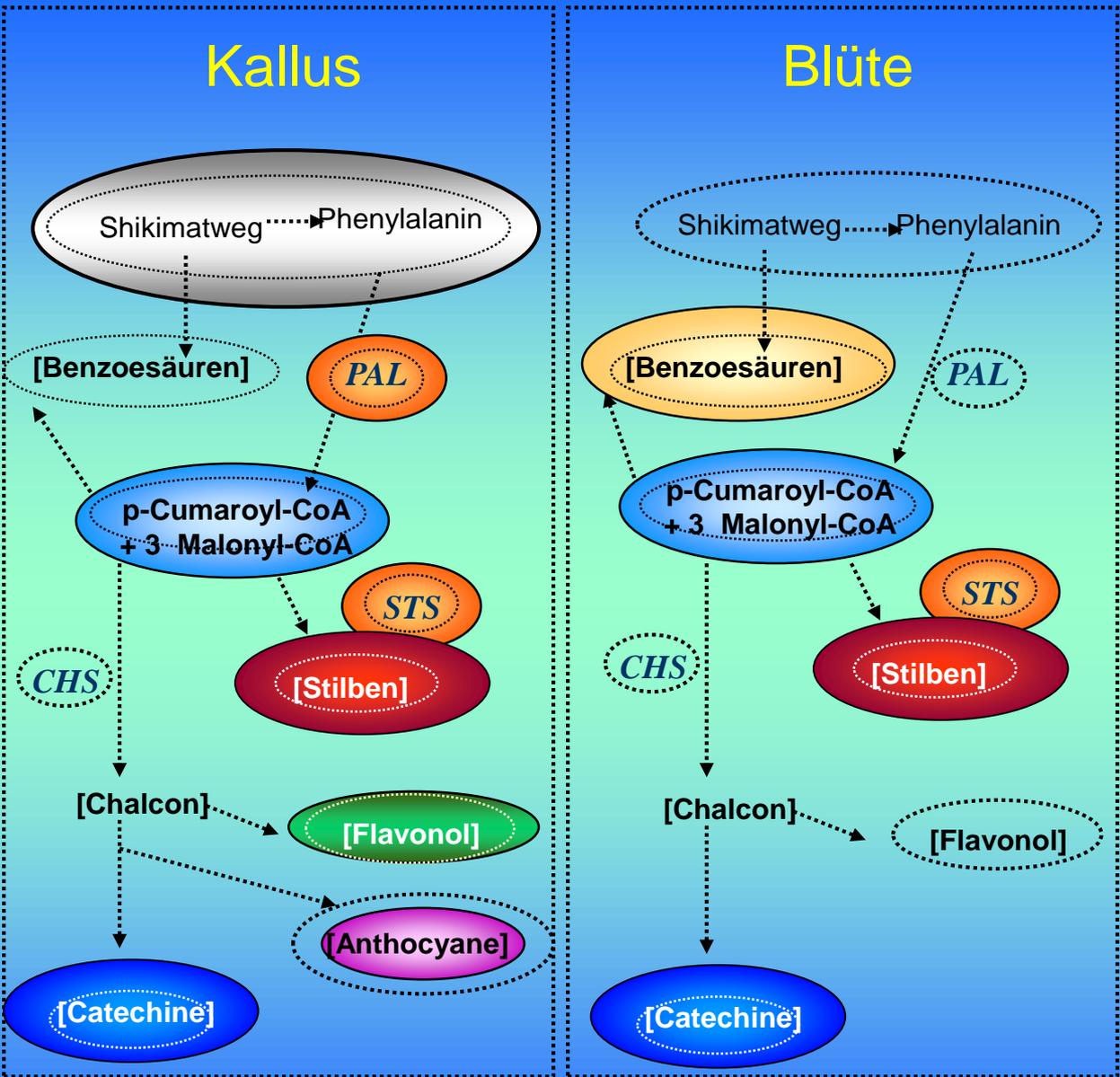
Vergleich:

Induzierbarkeit von Polyphenolen
in *Vitis vinifera* Kallus, Blüte und
Blatt (Blatt 5) durch ein Hefeextrakt
von *Aureobasidium pullulans*

Kallus

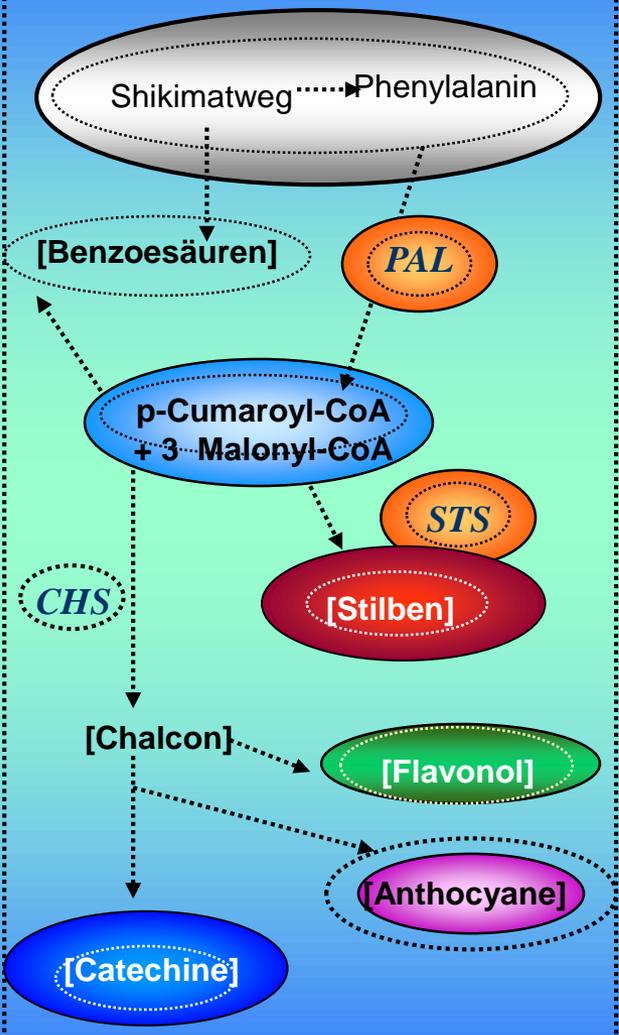


PAL: Phenylalaninammonium-lyase
CHS: Chalconsynthase
STS: Stilbensynthase

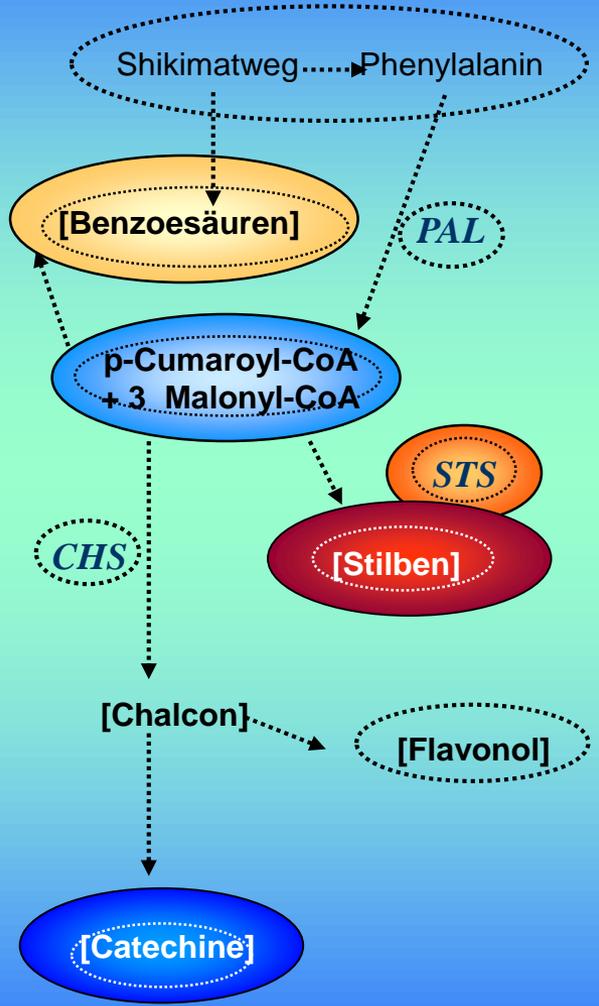


PAL: Phenylalaninammonium-lyase
CHS: Chalconsynthase
STS: Stilbensynthase

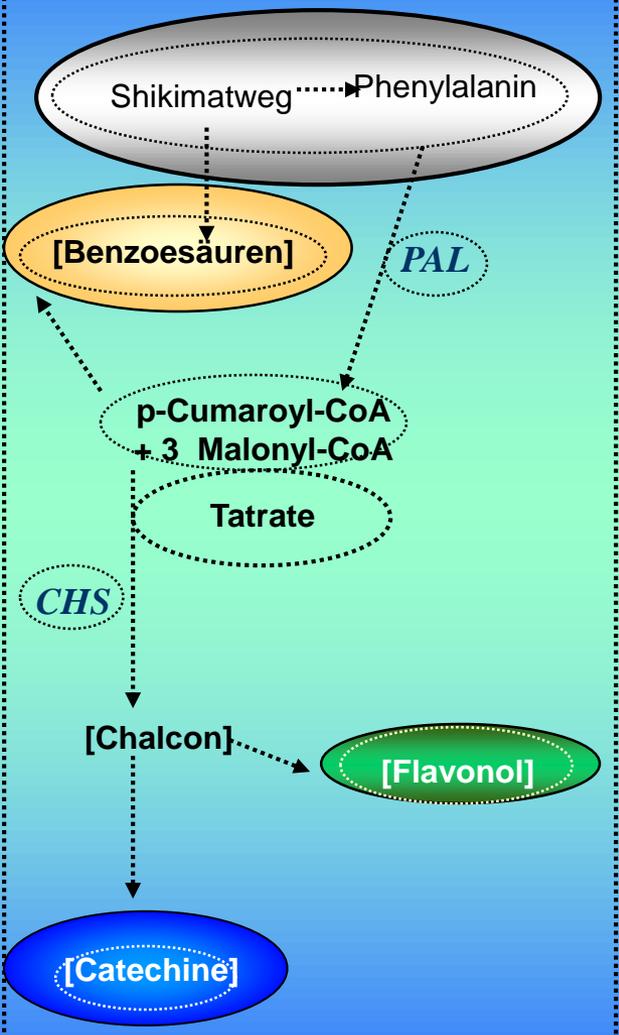
Kallus



Blüte



Blatt 5



PAL: Phenylalaninammonium-lyase
CHS: Chalconsynthase
STS: Stilbensynthase

- Abmilderung der Variabilität innerhalb der Gescheine
 - Probenahme von Einzelblüten sortiert nach Entwicklungsstadien

- Abmilderung der Variabilität innerhalb der Gescheine
 - Probenahme von Einzelblüten sortiert nach Entwicklungsstadien
- Erfassung von Stoffwechselfvorgängen vor 12 Stunden nach Behandlung

- Abmilderung der Variabilität innerhalb der Gescheine
 - Probenahme von Einzelblüten sortiert nach Entwicklungsstadien
- Erfassung von Stoffwechselfvorgängen vor 12 Stunden nach Behandlung
- Testen verschiedener Formulierungs-Hilfsstoffe für einen besseren Transfer des Elicitors durch die Kutikula bei Blättern

- Abmilderung der Variabilität innerhalb der Gescheine
 - Probenahme von Einzelblüten sortiert nach Entwicklungsstadien
- Erfassung von Stoffwechselfvorgängen vor 12 Stunden nach Behandlung
- Testen verschiedener Formulierungs-Hilfsstoffe für einen besseren Transfer des Elicitors durch die Kutikula bei Blättern
- Auswirkungen der Induktion in Blüten und Blättern auf pilzliche Pathogene wie Botrytis und Mehltau

Vielen Dank