

Maike Elfert¹, Detlef Ulrich¹, Michael Fischer², Christoph Hoffmann², Thomas Strumpf³

Auf der Suche nach Biomarkern im Weinblattmetabolom

Searching for biomarkers in
the grape leaf metabolome

19

Zusammenfassung

Falscher und Echter Mehltau sind weitverbreitete Krankheiten bei Weinpflanzen, die zu erheblichen Ernteverlusten führen können. Im Ökologischen Weinbau sind als Fungizide nur kupferhaltige Mittel zugelassen. Als mögliche Folgen der langjährigen Anwendung kupferhaltiger Pflanzenschutzmittel (PSM) werden der Verbleib im Boden und die Auswirkungen auf Bodenorganismen seit einigen Jahren national aber auch zunehmend international diskutiert. Darum ist es wichtig, alternative Pflanzenschutzstrategien zu entwickeln. Aus diesem Grund werden die Metabolitprofile der Blätter von resistenten Reben, wie amerikanischen Wildarten und alten Hybridsorten, mit den gegenüber Mehltau anfälligeren europäischen Sorten in mehreren Erntejahren verglichen. Das Metabolomic Profiling wird mit nicht-zielgerichteten Analysen durchgeführt, um so Hinweise auf noch unbekannte Resistenzbiomarker oder Elicitoren zu erhalten. Die Profile der flüchtigen Inhaltsstoffe (VOC), wurden mit Hilfe der Headspace-SPME-GC-MS analysiert. Bis jetzt konnten in den Weinblättern in einem einjährigen Versuch 81 der festgestellten 120 flüchtigen Komponenten identifiziert werden. Viele der detektierten Substanzen finden sich in mehreren der verschiedenen Rebarten bzw. -sorten. Es zeigen sich jedoch Unterschiede sowohl qualitativer als auch quantitativer Art. Mit Hilfe multivariater statistischer Datenverarbeitung (PCA) konnte gezeigt werden, dass der GC-Fingerprint mit den Entwicklungsstadien der Blätter sowie

der Rebart bzw. -sorte eng korreliert, wohingegen der Unterschied zwischen Pflanzen derselben Sorte geringer ist.

Stichwörter: Ökologischer Weinbau, nicht-zielgerichtete Analytik, SPME-GC-MS, Weinblätter, Resistenzbiomarker, Falscher und Echter Mehltau

Abstract

Powdery and downy mildew of grapevine are widespread diseases, which may cause severe harvest losses. In organic farming only copper containing fungicides are permitted. In relation to the longtime application of copper containing plant protection products the impact of copper deposit in soil and its effect to soil organisms are discussed nationally and internationally. Therefore, developing alternative plant protection strategies is an important field of research. Thus, the metabolite profiles of resistant grapevine species (American wild type species and old hybrid grapevine varieties) are compared during a triennial survey with representatives of the more susceptible European grapevine cultivars by non-targeted analysis assays. This might give some hints to so far unknown resistance biomarkers or elicitors. The different volatile organic compounds (VOCs) of the leaf metabolome were analyzed by headspace-SPME-GC-MS. In an annual survey 81 out of 120 volatiles detected in grapevine leaves were identi-

Institut

Julius Kühn-Institut – Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für ökologische Chemie, Pflanzenanalytik und Vorratsschutz, Quedlinburg¹

Julius Kühn-Institut – Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Pflanzenschutz in Obst- und Weinbau, Siebeldingen²

Julius Kühn-Institut – Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für ökologische Chemie, Pflanzenanalytik und Vorratsschutz, Berlin-Dahlem³

Kontaktanschrift

Maike Elfert, Julius Kühn-Institut – Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für ökologische Chemie, Pflanzenanalytik und Vorratsschutz, Erwin-Baur Str. 27, 06484 Quedlinburg, E-Mail: maike.elfert@jki.bund.de

Zur Veröffentlichung angenommen

13. Juli 2012

fied. Though many of the components are included in several individual species and varieties, there are detectable differences with respect to their quality and quantity. Multivariate statistical data processing (PCA) showed that both the leaf development stadium and the grapevine species (resp. variety) have a great impact on the volatile profile. In contrast, the distinctions in the metabolomes of different plants which belong to the same variety are less obvious.

Key words: Organic viticulture, non-targeted analysis, SPME-GC-MS, grapevine leaves, resistance biomarker, powdery and downy mildew

Einleitung und Zielsetzung

Weinpflanzen, die mit Falschem oder Echem Mehltau befallen sind, bringen geringeren oder gar keinen Erntertrag. Pflanzenschutzmittel (PSM), die gegen Falschen Mehltau (*Plasmopara viticola*) wirksam sind und im Ökologischen Weinbau verwendet werden dürfen, enthalten als Wirkstoffe unterschiedliche Kupferverbindungen, die zu einer erhöhten Kupferexposition im Boden führen können. Da seit einigen Jahren auf nationaler wie auf internationaler Ebene der Verbleib von Kupfer im Boden und die Auswirkungen auf Bodenorganismen im Blickfeld stehen, ist es wichtig, neue Pflanzenschutzstrategien zu entwickeln, die ebenso wirksam sind, dabei jedoch nicht zu möglichen unvermeidbaren Auswirkungen auf die Bodenökologie im Agrarökosystem „Weinbau“ führen. Sowohl der Falsche Mehltau (*Plasmopara viticola*) als auch der Echte Mehltau (*Oidium tuckeri*) wurden Mitte des 19. Jahrhunderts von Amerika nach Europa eingeschleppt. Amerikanische Rebarten sind auf Grund der Ko-Evolution mit den Pilzen widerstandsfähig bis resistent gegen den Pilzbefall. Im Rahmen dieses Vorhabens soll untersucht werden, ob in den Blättern der resistenten amerikanischen Wildreben Metabolite nachgewiesen werden können, die Resistenzmarker oder Elicitoren sind. Wenn der Resistenzmechanismus der verschiedenen Rebarten (*Vitis vinifera*, *V. labrusca*, *V. riparia*) und der alten Hybridsorten (*Vitis* spp.) gleich oder zumindest ähnlich ist, dann sollten diese Stoffe in den europäischen Sorten nicht bzw. nur in geringerer Konzentration vorliegen.

Mit nicht-zielgerichteter Analytik wird ein Metabolomic Profiling an den Weinblättern verschiedener pilzwiderstandsfähiger Rebarten bzw. -sorten vorgenommen. Zunächst werden die flüchtigen Inhaltsstoffe untersucht. Später soll die Analyse der nicht-flüchtigen Komponenten folgen. Die flüchtigen Inhaltsstoffe werden mittels SPME-GC-MS isoliert, aufgetrennt und identifiziert. Die flüchtigen Metabolite werden dann mittels Datenbanksuche identifiziert und semi-quantifiziert. Die chromatografischen Fingerprints der Weinblätter werden miteinander über multivariate statistische Verfahren (PCA, HCL) verglichen. Diese Methode zeigt an, ob es Unterschiede zwischen den Chromatogrammen gibt und wie groß diese sind. Untersucht werden die Einflüsse der Rebsorte auf die

chromatografischen Fingerprints sowie auf das jeweilige Blattentwicklungsstadium. Schließlich wird festgestellt, welchen Einfluss Einzelpflanzen derselben Art auf das Fingerprintmuster ausüben.

Material und Methoden

Pflanzenmaterial, Probenvorbereitung und SPME-GC-MS
Es wurden 10 verschiedene Rebarten bzw. -sorten (europäische, PIWI, alte Hybridsorten und amerikanische Reben) verwendet, die unterschiedliche Resistenzeigenschaften aufweisen (Tab. 1). Die Beprobung der Weinblätter wurde den verschiedenen Fragestellungen angepasst. Die Blätter der Reben wurden geerntet und nach dem Ernten bei -80°C eingefroren. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte in Anlehnung an die etablierte Metabolitanalytik bei Früchten (OLBRICHT et al., 2008). Der Einfluss der einzelnen Pflanzen wurde an den Hybridsorten und den amerikanischen Reben vom Standort Siebeldingen getestet. Von diesen Sorten wurden jeweils drei Stöcke derselben Art/Sorte beprobt. Von den europäischen und PIWI Rebarten (Müller-Thurgau, Riesling, Regent) wurden Proben über mehrere Stöcke erstellt. Dabei wurden für jede Rebsorte und Art aus je 20 Blättern Mischproben über alle Entwicklungsstadien mit dreifacher Wiederholung gewonnen.

Der Einfluss des Blattentwicklungsstadiums wurde an den Pflanzen mit Standort Berlin untersucht. Hierzu wurden aus der Gesamtheit aller Pflanzen der gleichen Sorte je 10 Blätter (jeweils apikaler, medialer und basaler Pflanzenbereich) beprobt. Von den jeweiligen Proben wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Die gefrorenen Blätter wurden mit einem Waring Blender mit der dreifachen Menge (w/v) an 3,4 M NaCl-Lösung homogenisiert. Von den Pflanzen aus Siebeldingen wurden jeweils die 20 Blattproben und von den Berliner Pflanzen die 10 Blattproben eingewogen. Die jeweiligen Homogenisate wurden für 30 Minuten bei 4°C mit $100 \times g$ zentrifugiert, der Überstand abfiltriert und bei -20°C gelagert. 10 ml des Überstands wurden in ein 20 ml Headspace-Gefäß gegeben, in welchem 4 g NaCl vorgelegt waren. Die Homogenisate jeder Mischprobe wurden in dreifacher Wiederholung analysiert. Die Details der gaschromatografischen Trennmethode auf einer polaren Säule sind ebenfalls in der Arbeit von OLBRICHT et al. (2008) beschrieben. Für alle Analysen wurde der massenspektrometrische Detektor eingesetzt.

Datenverarbeitung

Die chromatografischen Fingerprints der einzelnen Proben wurden mittels CHROMSTAT™ 2.6 Software so übereinandergelegt, dass die Peakflächen gleicher Retentionszeiten erfasst werden konnten und dadurch ein direkter Vergleich der relativen Konzentrationen der Inhaltsstoffe möglich wurde. Das Programm MULTIERXPERIMENT VIEWER 4.7.4 stellt aus dem generierten Datensatz den Konzentrationsunterschied und das Inhaltstoffverteilungsmuster als sogenannte Heatmap grafisch dar. Zusätzlich

Tab. 1. Analytierte Reben. Aufgeföhrt sind die Rebart (wenn bekannt), die Resistenzeigenschaften gegen Falschen Mehltau und der Standort

| Rebenname (Sorte) | Rebart | Resistenzeeigenschaften | Standort |
|---|--|-------------------------|--------------------------|
| Europäerreben | | | |
| Müller-Thurgau | <i>Vitis vinifera</i> | stark anfällig | Siebelddingen |
| Riesling | <i>V. vinifera</i> | anfällig | Siebelddingen |
| pilzwiderstandsfähige Sorten (PIWI) mit Europäerstatus | | | |
| Phoenix | <i>V. vinifera</i> | leicht widerstandsfähig | Berlin |
| Regent | <i>V. vinifera</i> | widerstandsfähig | Berlin und Siebelddingen |
| Alte Hybridsorten | | | |
| Delaware | wahrscheinlich Kreuzung aus <i>V. labrusca</i> , <i>V. aestivalis</i> und <i>V. vinifera</i> | widerstandsfähig | Berlin |
| Ripatella | wahrscheinlich Kreuzung aus <i>V. riparia</i> , <i>V. rupestris</i> und <i>V. aestivalis</i> | resistent | Berlin |
| Sämlinge von amerikanischen Wildreben | | | |
| Concord | Sämling aus <i>V. labrusca</i> (AMBROSI et al., 1994) | resistent | Berlin und Siebelddingen |
| Rote Isabella | Sämling aus <i>V. labrusca</i> (AMBROSI et al., 1994) | resistent | Berlin und Siebelddingen |
| Amerikanische Wildreben | | | |
| Uferrebe | <i>V. riparia</i> | resistent | Siebelddingen |
| Fuchsrebe | <i>V. labrusca</i> | resistent | Siebelddingen |

wurden die chromatografischen Fingerprints über eine Hauptkomponentenanalyse (PCA) semi-quantitativ miteinander verglichen, um Ähnlichkeiten und Unterschiede zwischen den Proben abschätzen zu können.

Ergebnisse und Diskussion

Einfluss der einzelnen Pflanze

Um den Einfluss einer einzelnen Pflanze auf den chromatografischen Fingerprint zu untersuchen, wurden alle vom Standort Siebelddingen gewonnenen Weinblattproben gemeinsam betrachtet. Die PCA der Fingerprints (Abb. 1 und 2) zeigen, dass alle Messungen einer Sorte/Art im PCA-Plot nahe beieinander liegen, d.h. dass sich die Metabolitprofile qualitativ und quantitativ ähnlich sind. Ausnahmen bilden die drei verschiedenen Pflanzen von *V. riparia* und die drei Mischproben über mehrere Stöcke von Regent. Bei *V. riparia* unterscheidet sich die Pflanze zwei (ripa2 in Abb. 1) deutlich von den anderen beiden Pflanzen und bei Regent liegt die dritte Mischprobe (re3 in Abb. 1) in der PCA weiter von den anderen beiden Mischproben entfernt. Generell gilt, dass jede gemessene Probe, ob sie nun eine einzelne Pflanze oder eine Mischprobe über mehrere Pflanzen widerspiegelt, einen gewissen Einfluss auf das Fingerprintmuster hat. Jedoch ist der Unterschied im Fingerprintmuster zwischen den

verschiedenen Arten bzw. Sorten höher als innerhalb derselben Sorte bzw. Art.

Einfluss des Blattstadiums

Die Chromatogramme der Proben verschiedener Blattstadien wurden ebenfalls einer PCA unterzogen (Abb. 3). Die Messpunkte der drei Blattstadien einer Sorte/Art liegen teilweise weit voneinander entfernt. Dadurch wird deutlich, dass das Blattstadium einen starken Einfluss auf das Inhaltsstoffmuster (Fingerprint) hat.

Die Inhaltsstoffe der Fingerprints wurden über einen Datenbankabgleich der Massenspektren mit der Datenbank NIST 02 bestimmt. So konnten 81 der detektierten 120 flüchtigen Substanzen „vorläufig“ identifiziert werden. Der Datenbankabgleich ist jedoch noch kein ausreichender Nachweis zur sicheren Substanzidentifizierung, sondern gibt nur einen ersten Anhaltspunkt. Die Substanzen müssen noch über den Vergleich mit Messungen von Referenzsubstanzen verifiziert werden. Die Notwendigkeit dieser Überprüfung zeigt sich darin, dass einige Substanzen bei mehreren verschiedenen Retentionszeiten „identifiziert“ wurden (z.B. drei verschiedene Retentionszeiten für Hexanal. Diese sind in Abb. 4 gekennzeichnet mit A, B und C). Sowohl für den Versuch zum Einfluss der einzelnen Pflanzen als auch des Blattstadiums zeigte sich, dass die meisten Inhaltsstoffe in mehreren Proben detektiert wurden. Sie unterschieden sich hauptsächlich in der

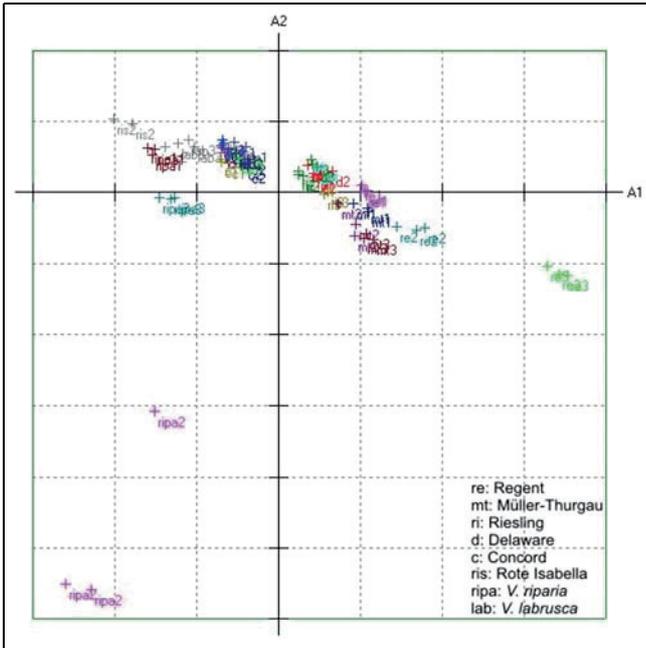


Abb. 1. PCA von chromatografischen Fingerprints zur Untersuchung des Einflusses von einzelnen Pflanzen und Blattproben über mehrere Pflanzen innerhalb einer Sorte bzw. Art. Die Proben umfassten 20 Blätter, die aus allen Blattentwicklungsstadien der Pflanzen entnommen wurden. Die Bedeutung der Buchstabenkürzel findet sich in der Abbildung. Jede Probe wurde in dreifacher Wiederholung analysiert. Dies ist durch die Nummerierung (1–3) hinter den Buchstabenkürzeln gekennzeichnet.

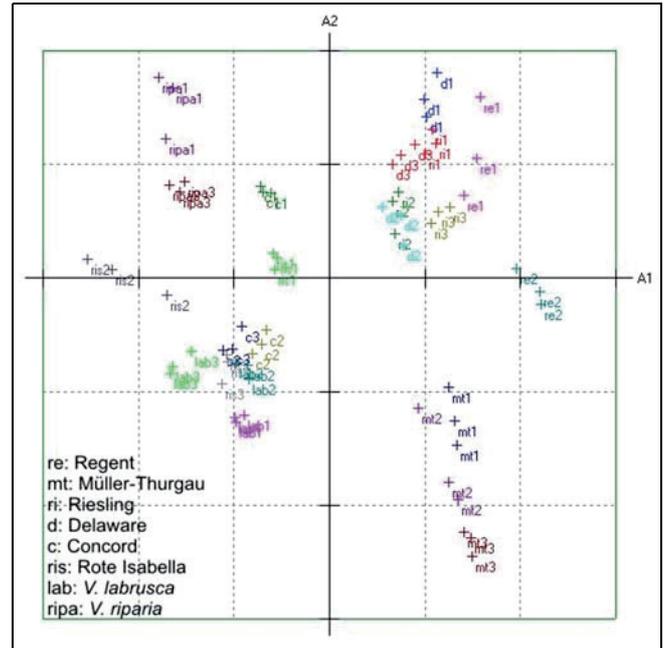


Abb. 2. PCA von chromatografischen Fingerprints zur Untersuchung des Einflusses von einzelnen Pflanzen und Blattproben über mehrere Pflanzen innerhalb einer Sorte bzw. Art. Die Proben umfassten 20 Blätter, die aus allen Blattentwicklungsstadien der Pflanzen entnommen wurden. Die beiden Ausreißerproben re3 und ripa2 wurden vor der PCA entfernt. Dadurch werden die restlichen Proben übersichtlicher dargestellt als in Abb. 1. Die Bedeutung der Buchstabenkürzel findet sich in der Abbildung. Jede Probe wurde in dreifacher Wiederholung analysiert. Dies ist durch die Nummerierung (1–3) hinter den Buchstabenkürzeln gekennzeichnet.

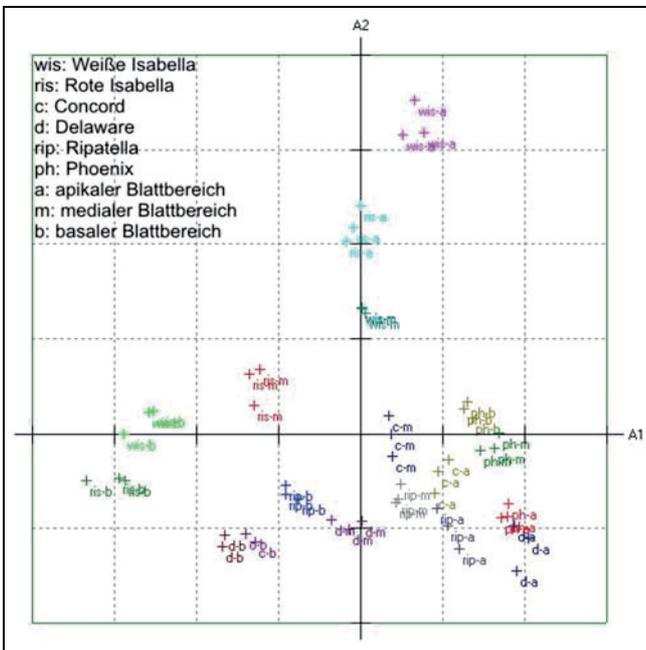


Abb. 3. PCA der chromatografischen Fingerprints von Proben zur Untersuchung des Einflusses, den das Blattentwicklungsstadium auf das Fingerprintmuster hat. Die Blattproben gaben jeweils ein Blattentwicklungsstadium (apikal, medial, basal) wider. Sie umfassten je 10 Blätter verschiedener Rebstöcke. Die Bedeutung der Buchstabenkürzel findet sich in der Abbildung. Jedes Kreuz steht für eine Analyse.

detektierten Peakfläche, d.h. in ihrer relativen Konzentration. Als Beispiel sei die Auflistung der flüchtigen Inhaltsstoffe in Weinblättern zur Bestimmung des Einflusses einzelner Pflanzen gegeben (Abb. 4). Demnach werden 21 der 120 Substanzen in allen Proben detektiert, 27 Substanzen treten nur in den resistenten Hybridsorten und amerikanischen Reben auf. 7 Substanzen werden nur in *V. vinifera* gemessen. 19 Substanzen treten ausschließlich in einer einzelnen Art bzw. Sorte auf, wobei 15 von diesen Stoffen allein in einer einzelnen Probe gemessen wurden. Bei der Betrachtung der verschiedenen Blattstadien zeigt sich, dass 6 Substanzen nur in basalen Blättern und 9 Substanzen nur in apikalen Blättern detektiert werden.

Fazit

Die Fingerprintmuster von Weinblättern werden durch verschiedene Einflüsse wie z.B. das Blattentwicklungsstadium stark beeinflusst. Die meisten der gemessenen flüchtigen Inhaltsstoffe treten in fast allen untersuchten Arten und Sorten auf. Sie unterscheiden sich jedoch in ihrer Konzentration. Des Weiteren gibt es einige wenige Stoffe, die nur in einer bestimmten Art oder Sorte auftreten (z.B. p-Chavicol in der alten Hybridsorte Delaware). Manche Substanzen können nur in widerstandsfähigen oder anfälligen Reblättern detektiert werden (z.B. Phenylethylalkohol nur in resistenten Sorten oder Allooci-

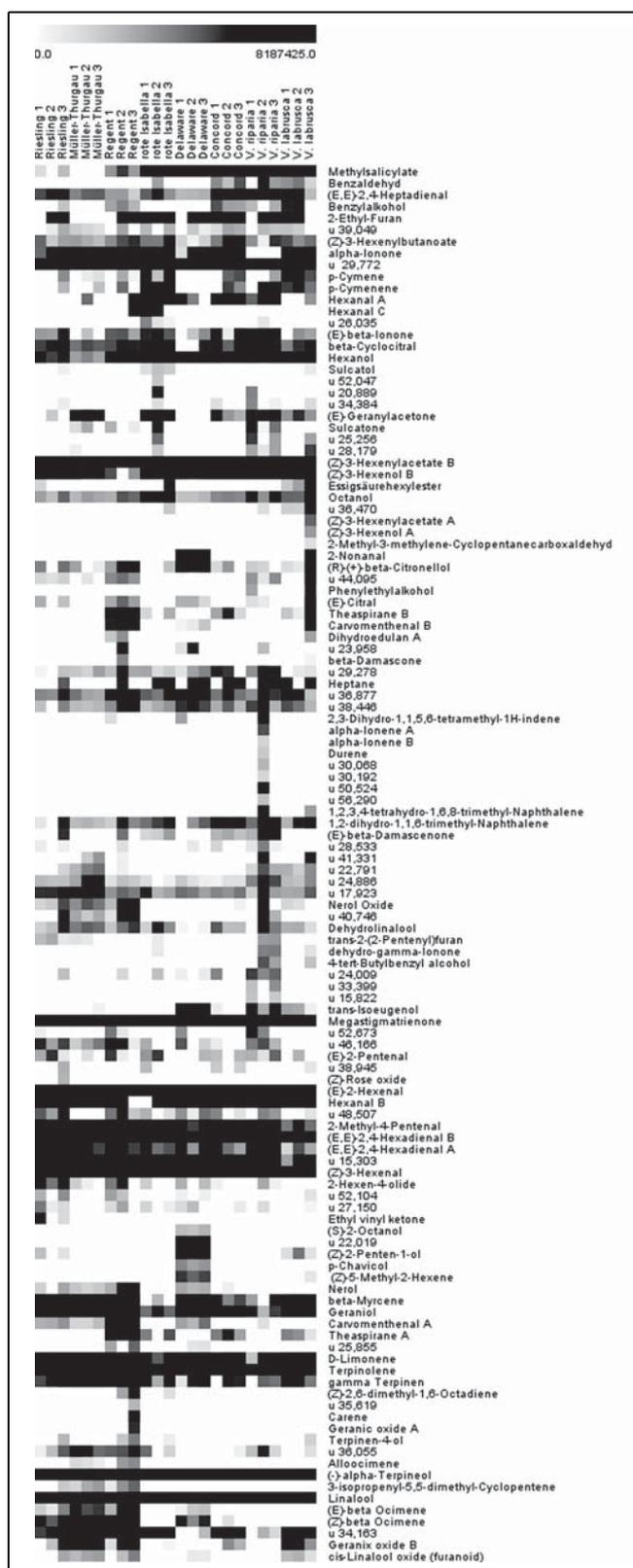


Abb. 4. Auflistung von flüchtigen Inhaltsstoffen aus Weinblättern zur Untersuchung des Einflusses auf das Fingerprintmuster durch Einzelpflanzen. Die Skala zeigt die unterschiedlichen Peakflächen der Chromatogramme an. weiß = kein Peak, schwarz = große Peakfläche. Am rechten Rand sind die durch Datenbankabgleich der Massenspektren „vorläufig“ identifizierte Substanzen notiert. Nicht identifizierte Stoffe sind mit u für „unbekannt“ und der jeweiligen Retentionszeit benannt. Mehrfachidentifizierungen von Substanzen sind durch (A), (B), (C) usw. gekennzeichnet.

men nur in Europäerreben und PIWIS). Alle durchgeführten Untersuchungen sind Ergebnisse einer einzelnen Weinblatternte. Für eine Bestimmung eines Resistenzbiomarkers müssen die Ergebnisse im weiteren Verlauf des Vorhabens durch Analysen der Weinblatternten der folgenden Jahre noch bestätigt werden.

Danksagung

Die Untersuchungen werden durch die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) zum Thema „Erforschung und Entwicklung von Verfahren zur Reduzierung oder zum Ersatz kupferhaltiger Pflanzenschutzmittel im ökologischen Landbau“ im Bereich des Bundesprogramms Ökologischer Landbau mit dem Vorhaben „Nutzung von Resistenzmechanismen verschiedener Rebarten als Alternative zum Einsatz von Kupfer im Ökoweinbau“ gefördert (BÖL 2809OE53).

Für die Durchführung und Unterstützung bei der Weinblatternte, die vielen hilfreichen Hinweise zur Probenverarbeitung, Probenanalyse und Datenauswertung gilt ein besonderer Dank Dagmar D'AGUIAR, René GRÜNWARD, Ines KASTEN, Hanne-Lore MÖBIUS und Kirsten WEISS.

Literatur

- AMBROSI, H., E. DETTWEILER, E.H. RÜHL, F. SCHMID, 1994: Farbatlas der Rebsorten: 300 Sorten und ihre Weine. Stuttgart (Hohenheim), Eugen Ulmer Verlag.
OLBRIGHT, K., C. GRAFE, K. WEISS, D. ULRICH, 2008: Inheritance of aroma compounds in a model population of *Fragaria* × *ananassa* Duch. Plant Breeding 127 (1), 87-93.