

## ENZYM-POLYMORPHISMUS IN REBENBLÄTTERN

HEINZ SCHAEFER

Landes-Lehr- und Forschungsanstalt für Wein- und Gartenbau, D 673 Neustadt/Weinstraße, Germany

(Eingegangen 29 Dezember 1970)

**Zusammenfassung**—In Blatthomogenaten von 20 Rebenarten und -hybriden wurde das Vorkommen von Isoenzymen der Polyphenoloxydase, der sauren Phosphatase und der Esterase mit Hilfe der Polyacrylamid-Elektrophorese untersucht. Die Verteilung der Isoenzyme variiert von Sorte zu Sorte, jedoch besitzen alle Kreuzungen mit Erbgut von *V. cinerea* ein sehr charakteristisches Isoenzymmuster der Polyphenoloxydase. Die untersuchten Sorten der Kreuzungsgruppe *V. berlandieri*  $\times$  *V. riparia* haben ebenfalls etliche Polyphenoloxydase-Isoenzyme gemeinsam, es lassen sich hier aber aufgrund der speziellen Verteilungen zwei verschiedene Untergruppen unterscheiden. Die Varietäten von *V. vinifera* differieren sehr stark in dieser Hinsicht, die Vererbung der Isoenzyme der untersuchten Fermente in den interspezifischen Kreuzungen mit *V. vinifera* kann mit Hilfe der angewandten Methode nicht verfolgt werden. Der Nachweis der Isoenzyme der sauren Phosphatase und der Esterase ist taxonomisch und züchterisch ohne Bedeutung. Eine Beziehung zwischen Reblausresistenz und Isoenzymmuster ist nicht zu erkennen.

**Abstract**—The occurrence of polyphenoloxidase, acid phosphatase and esterase in mature leaves of 20 species and hybrids of the genus *Vitis* has been investigated by polyacrylamide electrophoresis. The pattern of the multiple forms of these enzymes differs considerably among the specimens studied. The interspecific hybrids of *V. cinerea* have a very characteristic pattern of polyphenoloxidase isoenzymes. In the leaves of the hybrids of *V. berlandieri*  $\times$  *V. riparia* there are also several common isoenzymes of polyphenoloxidase, but one can distinguish two different basic spectra in these hybrids. The polyphenoloxidase pattern varies markedly within the species *V. vinifera* and it is therefore not possible to study the inheritance of isoenzymes in hybrids derived from this species. The analysis of the isoenzymes of acid phosphatase and of esterase in grape leaves is of less interest; it was not possible to establish interrelations between the degree of resistance to *Phylloxera* and the pattern of these isoenzymes.

### EINLEITUNG

IN FRÜHEREN Untersuchungen<sup>1</sup> wurde nachgewiesen, daß die Blätter etlicher Rebensorten spezifische Isoenzym-spektren ('Grundmuster') der Peroxydase aufweisen und daß diese Muster bei einer großen Zahl von Kreuzungsnachkommen ebenfalls vorhanden sind. Bei vielen Neuzüchtungen, wenn auch nicht bei allen, ist klar zu erkennen, von welchem Kreuzungspartner die Peroxydasen und somit die mit ihnen zusammenhängenden physiologischen Eigenschaften vererbt werden.

In der vorliegenden Arbeit soll nunmehr untersucht werden, ob die elektrophoretische Analyse der Isoenzyme der Polyphenoloxydase, der sauren Phosphatase und der Esterase ebenfalls zur Lösung von taxonomischen und insbesondere von züchterischen Problemen bei der Rebe beitragen können. Es soll ferner festgestellt werden, ob auf diese Weise Unterschiede zwischen blattreblaus-resistenten und -anfälligen Rebensorten nachweisbar sind. Die Untersuchungen sollen gleichzeitig eine Grundlage für weitere Arbeiten über die Beeinflussung des Rebenstoffwechsels durch Krankheiten und Parasiten bringen.

Aus technischen Gründen war es nicht möglich, eine so umfangreiche Arten- und Sortenzahl zu bearbeiten, wie es der Fall bei der Untersuchung der Proteine<sup>2</sup> und der Peroxydasen<sup>1</sup> war. Wir beschränkten uns daher auf die Elektrophorese von typischen

<sup>1</sup> H. SCHAEFER, *Wein-Wissenschaft* 26, 112 (1971).

<sup>2</sup> H. SCHAEFER, *Wein-Wissenschaft* 26, 57 (1971).

Vertretern gewisser Rebenarten und Neuzüchtungen, die für den praktischen Weinbau von besonderem Interesse sind.

### ERGEBNISSE

Als Isoenzyme werden in Übereinstimmung mit anderen Autoren alle Banden bezeichnet, die mit der betreffenden Nachweismethode eine positive Reaktion ergeben. Die Resultate sind in der Abb. 1 schematisch dargestellt. Aufgrund der standardisierten Auftragsmengen der Proben auf das Sammelgel ist ein direkter Vergleich der untersuchten Sorten möglich.

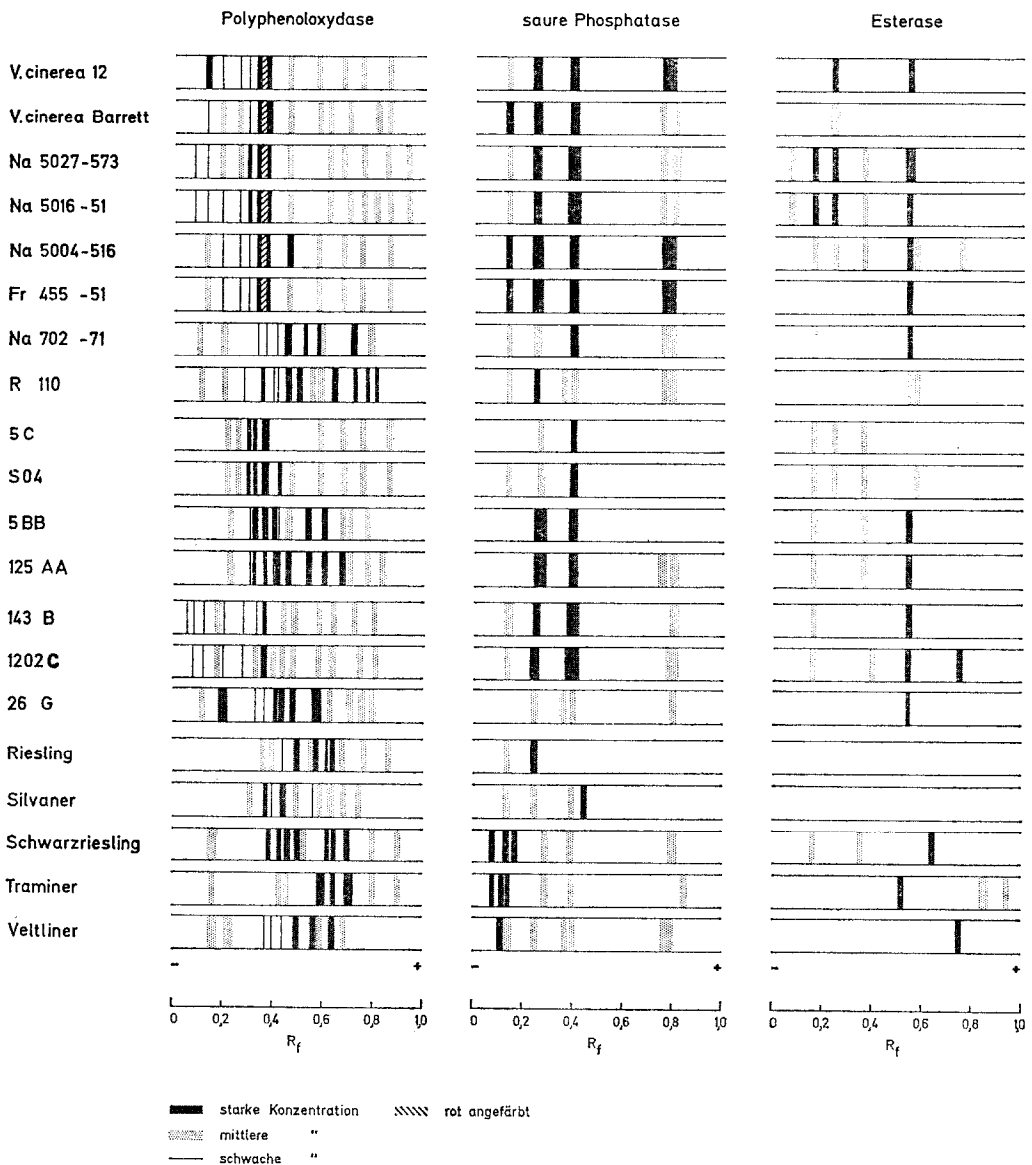


ABB. 1.

Der Nachweis der alkalischen Phosphatase nach Brewbaker<sup>3</sup> oder nach Rudolph und Stahmann<sup>4</sup> gelang uns in den Rebenblättern nicht. Dieses Enzym soll in höheren Pflanzen seltener vorkommen.<sup>5</sup> Rudolph und Stahmann<sup>4</sup> konnten es in Bohnenblättern nur schwach, Sing und Brewer<sup>6</sup> jedoch deutlich in Weizenblättern nachweisen, während Brewbaker *et al.*<sup>3</sup> und Mäkinen<sup>7</sup> in den von ihnen geprüften Pflanzen keine Isoenzyme dieses Ferments fanden. Wir konnten bisher ebenfalls keine Isoenzyme der Katalase (Nachweis nach<sup>3,8,9</sup>) in Rebenblatthomogenaten entdecken.

### *Polyphenoloxydase*

In den Enzymogrammen aller untersuchter Sorten ist kein gemeinsames Isoenzym vorhanden. Die meisten Reben besitzen ein jeweils spezifisches Isoenzymmuster, jedoch herrscht innerhalb einiger Kreuzungsgruppen eine gewisse Übereinstimmung vor. So kommen z.B. die Isoenzyme mit einem  $R_f$ -Wert zwischen 0,13 und 0,46 sowie von 0,86 bei allen Arten und Sorten vor, die Erbgut von *V. cinerea* enthalten. Die Auffälligkeit dieses 'Grundmusters'<sup>1</sup> wird noch durch das Auftreten einer rotangefärbten Bande erhöht, die bei den anderen Reben nicht beobachtet wurde. Die *Cinerea*-Erbgut enthaltenden Sorten unterscheiden sich voneinander lediglich durch den Besitz von einigen schnelllaufenden Banden mit verschiedenen  $R_f$ -Werten und durch die differierende Konzentration einiger Zonen. Das Isoenzymspektrum von Na 5004–516 und Fr 455–51 ist sogar identisch mit dem von *V. cinerea* 12 Arnold.

Die Enzymogramme der A  $\times$  A -Kreuzungen 5C und SO 4 sind ebenfalls, abgesehen von zwei Banden, identisch, ähnliches gilt für 5 BB und 125 AA. Das Muster von R 110 weicht aber deutlich davon ab.

In der Gruppe der E  $\times$  A -Kreuzungen zeigen 143 B und 1202 C fast dieselbe Verteilung der Isoenzyme, während 26 G in etlichen Zonen differiert. Das Isoenzymspektrum der einzelnen Europäervarietäten ist indessen sehr unterschiedlich. Ein allen gemeinsames, zusammenhängendes 'Grundmuster' von mehreren Banden ist nicht vorhanden.

### *Saure Phosphatase*

Die Gesamtmuster der untersuchten Reben haben dadurch eine gewisse Ähnlichkeit, daß einige Isoenzyme bei fast allen Sorten auftreten. Sämtliche *Cinerea*-Erbgut enthaltende Reben haben dasselbe Isoenzympektrum, wobei angenommen wird, daß zuweilen die breite, anodenwärts gelegene Bande in zwei Zonen aufgespalten wird. Jedoch ist dieses Muster nicht taxonspezifisch für *Cinerea*, da es auch bei anderen Sorten vorkommt. Die A  $\times$  A -Kreuzungen (mit Ausnahme von R 110) haben zwei Banden gemeinsam, 143 B und 1202 C reagieren identisch, während 26 G wieder etwas mehr abweicht. Sehr uneinheitlich ist die Verteilung der Isoenzyme bei den Europäerreben (*V. vinifera*), sie besitzen nur eine einzige, allen gemeinsame Bande.

<sup>3</sup> J. L. BREWBAKER, M. D. UPADHYA, Y. MÄKINEN und T. MACDONALD, *Physiol. Plantarum*, **21**, 930 (1968).

<sup>4</sup> K. RUDOLPH und M. A. STAHMANN, *Plant Physiol.* **41**, 389 (1966).

<sup>5</sup> P. S. KRISHAN, in *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse* (Begründet von K. PAECH und M. V. TRACEY), Bd. VII, S. 21, Springer-Verlag, Berlin (1964).

<sup>6</sup> C. F. SING und G. J. BREWER, *Genetics* **61**, 391 (1969).

<sup>7</sup> Y. MÄKINEN, *Physiol. Plantarum*, **21**, 858 (1968).

<sup>8</sup> T. C. HALL, B. H. MCCOWN, S. DESBOROUGH, R. C. MCLEESTER und G. E. BECK, *Phytochem.* **8**, 385 (1969).

<sup>9</sup> J. G. SCANDALIOS, *J. Heredity* **55**, 281 (1964).

### Esterase

Einige Isoenzyme kommen in den meisten Sorten vor. Ein charakteristisches Muster fehlt bei den *Cinerea*-Sorten, jedoch haben wiederum 5 C und SO 4 (abgesehen von einer Bande) einerseits und 5 BB und 125 AA andererseits dieselben Isoenzyme. Jede Europäersorte hat hingegen ein anderes Muster der Isoenzyme, bei zwei Varietäten waren sie sogar nicht nachweisbar. Auch bei Aufbringen der doppelten Probenmenge auf das Sammelgel konnte keine Veränderung des Isoenzymmusters durch Auftreten weiterer, in eventuell schwacher Konzentration vorkommender Banden beobachtet werden.

### DISKUSSION

Die vorliegenden Ergebnisse stimmen in einigen Punkten mit früheren Untersuchungen<sup>1,2</sup> überein. Sowohl bei den Eiweißen als auch bei den Isoenzymen der Peroxydase und der Polyphenoloxydase zeigen die Sorten mit *Cinerea*-Erbgut ein in sehr vielen Banden konformes, durch das Vorkommen von sog. 'roten' Isoenzymen der Peroxydase<sup>1,10</sup> und der Polyphenoloxydase sogar äußerst charakteristisches Spektrum, so daß man geradezu von einem spezifischen *Cinerea*-Grundmuster sprechen kann. Der neuerliche Befund unterstützt wiederum die bereits in den vorhergehenden Arbeiten<sup>1,2</sup> angedeutete Hypothese, daß die Art *V. cinerea*, die wegen ihrer überragenden Reblausresistenz als Kreuzungspartner in der Rebenzüchtung an Bedeutung immer mehr gewinnt, viele Eigenschaften an die Kreuzungsnachkommenschaft in stärkerem Maße als die übrigen *Vitis*-Arten vererbt. Bei den Isoenzymen der Polyphenoloxydase ist ein Einfluß der eingekreuzten Europäerreben bei den Sorten Na 5016–51 und Fr 455–51 nicht erkennbar. Die Ergebnisse stehen in Einklang mit dem Befund von Henke,<sup>11</sup> wonach die im Vergleich zu anderen Rebensorten sehr starke Aktivität der Polyphenoloxydase der *V. cinerea* auch auf die Kreuzungsnachkommen übertragen wird.

Eine weitere Parallele besteht bei der A  $\times$  A-Kreuzungsgruppe (A = amerikanische Rebenarten). Es wurde bereits früher gezeigt,<sup>1,2</sup> daß in dieser Gruppe im allgemeinen sehr wenig Übereinstimmung im Muster der Proteine und der Peroxydase-Isoenzyme besteht und daß in Bezug auf die Peroxydase zwei Gruppen von A  $\times$  A-Sorten unterschieden werden können. So differierte das Grundmuster der Peroxydase bei 5 BB und SO 4 wesentlich von dem von 5 C und 125 AA, obwohl alle vier Sorten dieselben Kreuzungspartner haben. Bei den Isoenzymen der Polyphenoloxydase und der Esterase gibt es in der A  $\times$  A-Gruppe ebenfalls wieder zwei verschiedene Muster: hier aber stimmen 5 C mit SO 4 sowie 5 BB mit 125 AA überein. In weinbaulicher Hinsicht gibt es zwischen diesen beiden Gruppen ebenfalls einen Unterschied: Die Holzreife bei 5 C und SO 4 ist allgemein günstiger zu beurteilen als die von 5 BB und 125 AA. Ein Zusammenhang zwischen Holzreife und der Aktivität der Polyphenoloxydase scheint nach den Untersuchungen von Freudenberg *et al.*<sup>12</sup> und Tomaszewski<sup>13</sup> tatsächlich zu bestehen. Vielleicht spielen hierbei bestimmte Isoenzyme eine Rolle.

Während die Blätter der *Vinifera*-Varietäten ein wohl definiertes Grundmuster der Isoenzyme der Peroxydase<sup>1</sup> enthalten, ist dies nicht der Fall bei den multiplen Formen der hier analysierten Enzyme, vor allem nicht bei der sauren Phosphatase und der Esterase. Bei den Isoenzymen der Polyphenoloxydase könnte man noch zwei verschiedene Gruppen

<sup>10</sup> H. SCHAEFER, *Wein-Wissenschaft* **25**, 277 (1970).

<sup>11</sup> O. HENKE, *Z. Pfl. Züchtg.* **41**, 253 (1959).

<sup>12</sup> K. FREUDENBERG, H. REZNIK, H. BOESENBERG und D. RASENACK, *Chem. Ber.* **85**, 641 (1952).

<sup>13</sup> M. TOMASZEWSKI, *Flora* **145**, 146 (1957).

unterscheiden (Riesling, Silvaner und Veltliner; Schwarzriesling und Traminer), da die  $R_f$ -Werte etlicher Banden innerhalb dieser Gruppen miteinander übereinstimmen, jedoch ist durch diese Analysen kaum eine Verwandtschaft zwischen den beiden Gruppen nachweisbar. Eine Beziehung zu irgendwelchen bekannten Eigenschaften dieser Reben ist zur Zeit nicht erkennbar.

Durch die Analyse der Isoenzyme der Peroxydase und der Polyphenoloxydase können also Verwandtschaftsverhältnisse zwischen gewissen Rebensorten erkannt werden, aber anscheinend nicht durch die Untersuchung der sauren Phosphatase und der Esterase. Das dürfte bedeuten, daß das Studium der Isoenzyme der beiden letztgenannten Fermente für taxonomische und züchterische Zwecke von höchst fraglichem Wert ist. Ähnliche negative Befunde bei anderen Pflanzen wurden auch von Hart und Bhatia,<sup>14</sup> bei Esterasen und von Sing und Brewer<sup>6</sup> bei der sauren Phosphatase und der Esterase mitgeteilt, während Bhatia *et al.*<sup>15</sup> sowie Desborough und Peloquin<sup>16</sup> mit Hilfe des Esterasemusters und McCown *et al.*<sup>17</sup> durch die Analyse der Isoenzyme der Esterase und der sauren Phosphatase deutliche genetische Beziehungen zwischen den einzelnen Arten und Hybriden der von ihnen untersuchten Pflanzen finden konnten. Ob der Nachweis der Isoenzyme dieser Fermente im Rebenholz für die Prüfung der Frostresistenz (vergl.<sup>17, 13</sup>) bedeutsam ist, müßte noch untersucht werden.

Es wird angenommen, daß die einzelnen multiplen Formen der Enzyme eine unterschiedliche Substratspezifität besitzen und spezifische Stoffwechselprozesse steuern. Da bei *V. cinerea* und ihren Kreuzungsnachkommen bestimmte phenolische Verbindungen auftreten, die bei den meisten anderen *Vitis*-Arten fehlen oder nur in sehr geringer Konzentration vorhanden sind,<sup>11, 18</sup> ist die Besonderheit ihres Polyphenoloxydase-Musters vielleicht erklärlich. Es wäre daraus zu folgern, daß die einzelnen Sorten der übrigen Kreuzungsgruppen mit unterschiedlichem Enzymmuster sich auch in der Zusammensetzung der mit den Isoenzymen reagierenden Substrate unterscheiden. Leider stehen aber noch Analysen dieser Substrate bei fast allen der von uns untersuchten Reben aus, so daß die vorliegenden Ergebnisse noch nicht schlüssig diskutiert werden können. Das gilt ganz besonders für die Isoenzyme der sauren Phosphatase und der Esterase. Es ist bisher auch nicht bekannt, welche erkennbare Eigenschaften der Pflanzen mit diesen Fermenten in Zusammenhang stehen, Eigenschaften der Rebe, die z.B. eine gewisse weinbauliche Bedeutung haben. Das wäre natürlich für die Züchtung von besonderem Interesse.

Über die Funktion der Isoenzyme der hier behandelten Fermente bei anderen Pflanzen wissen wir bisher ebenfalls nur sehr wenig. So soll die Zahl der Isoenzyme der Esterase und die Zahl und Konzentration einiger Isoenzyme der sauren Phosphatase, der Peroxydase und einiger weiterer Fermente beim Keimen der Samen einer Kaktsee ansteigen.<sup>19</sup> Nach Mäkinen<sup>7</sup> könnte eine Beziehung zwischen der Zahl und Konzentration der Esterase-Isoenzyme und der Mitosenhäufigkeit in Zwiebelwurzeln bestehen, wobei vermutlich aber nur einige der nachgewiesenen Isoenzyme mit dem primären Wachstum in Verbindung zu bringen sind. Konzentrationsunterschiede der sauren Phosphatasen in verschiedenen Keimlingsteilen weisen nach Mäkinen<sup>7</sup> jedenfalls auf differierende Funktionen dieser Isoenzyme hin. Die multiplen Formen der sauren Phosphatase dürften eine gewisse Rolle

<sup>14</sup> G. E. HART und C. R. BHATIA, *Can. J. Genet. Cytol.* **9**, 367 (1967).

<sup>15</sup> C. R. BHATIA, M. BUIATTI und H. H. SMITH, *Am. J. Bot.* **54**, 1237 (1967).

<sup>16</sup> S. DESBOROUGH und S. J. PELOQUIN, *Phytochem.* **6**, 989 (1967).

<sup>17</sup> B. H. MCCOWN, T. C. HALL und G. E. BECK, *Plant Physiol.* **44**, 210 (1969).

<sup>18</sup> FLORA YAP und A. REICHARDT, *Züchter* **34**, 143 (1964).

<sup>19</sup> C. L. KESWANI und M. D. UPADHYA, *Physiol. Plantarum*, **22**, 386 (1969).

bei der Infektion von Pflanzen spielen,<sup>4</sup> dasselbe gilt für die Peroxydase und Polyphenoloxydase. Jedoch konnte weder mit den vorliegenden Analysen noch durch die Untersuchungen über die Peroxydase<sup>1</sup> der Beweis erbracht werden, daß die hier diskutierten Enzymformen unmittelbar mit der Resistenz mancher Rebensorten gegen die Reblaus in Zusammenhang stehen: es wurde bisher kein Isoenzym nachgewiesen, daß nur in den Blättern von reblausresistenten bzw. reblausanfälligen Reben auftritt. Indessen haben weitere Analysen ergeben, daß den Isoenzymen einiger Fermente bei der Vergallung der Rebenblätter durch Reblausbefall eine gewisse Bedeutung zukommt. Darüber wird in einer späteren Arbeit berichtet.

### MATERIAL UND METHODIK

Das Untersuchungsmaterial stammte zum größten Teil aus demselben Rebenprüfgarten, die Varietäten von *V. vinifera* wurden aus anderen, klimatisch ähnlichen Anlagen entnommen. Die genetische Herkunft der analysierten Kreuzungen geht aus der Tabelle 1 hervor.

TABELLE 1

Rebensorte	Abstammung
Na 5027- 573	( <i>Berl.</i> × <i>Rip.</i> 5 BB) × <i>Cinerea</i> Arnold
Na 5016- 51	Riesling × <i>Cinerea</i>
Na 5004- 516	( <i>Berl.</i> × <i>Rip.</i> 125 AA) × <i>Cinerea</i> Arnold
Fr 455- 51	Gutedel × <i>Cinerea</i>
Na 702- 71	(Mourv. × <i>Rup.</i> Ganzin 1202 C) × <i>Rip. pub.</i> <i>Kl.</i>
R 110	<i>Berl. Ress.</i> 2 × <i>Rup. Martin</i>
5 C	<i>Berlandieri</i> × <i>Riparia</i>
SO 4	<i>Berlandieri</i> × <i>Riparia</i>
5 BB	<i>Berlandieri</i> × <i>Riparia</i>
125 AA	<i>Berlandieri</i> × <i>Riparia</i>
143 B	Aramon × <i>Riparia</i>
1202 C	Mouvèdre × <i>Rup. Ganzin</i>
26 G	Trollinger × <i>Riparia</i>

Die Proben wurden zwischen dem 10. und 29. 9. gesammelt. Die zur Analyse verwendeten Blätter von der 5.-6. Insertionshöhe, von der Triebspitze her gerechnet, waren alle dem Jugendstadium entwachsen und zeigten noch ein frisches Grün ohne Krankheitserscheinungen. Die Homogenate wurden über Nacht bei -15° eingefroren und nach dem Auftauen weiter verarbeitet. Extraktion und Polyacrylamidgel-Elektrophorese erfolgten wie früher beschrieben.<sup>2,20</sup> Von allen Sorten wurden 8 g frische Blätter in 40 ml Extraktionsgemisch homogenisiert und gereinigt. Von dem klaren Homogenat wurden 0,25 ml elektrophoriert.

Der Nachweis der Isoenzyme der Polyphenoloxydase wurde nach Schaefer<sup>21</sup> vorgenommen. In der anodenwärts gelegenen Gelhälfte war meist eine leichte Untergrundfärbung vorhanden, so daß die Banden dort nicht so scharf zu erkennen waren wie im kathodennahen Gelteil.

Zur Detektion der sauren Phosphatase hat sich die von Brewbaker *et al.*<sup>3</sup> vorgeschlagene Methode gut bewährt. Wir führten die Reaktion jedoch mit  $\alpha$ -Naphthylphosphat aus und verwendeten als Kupplungsreagens Fast Red TR, wodurch wesentlich bessere Färbungen als mit Fast Blue RR erzielt werden konnten. Die Isoenzyme erschienen als leuchtend rotgoldene Banden auf schwach gefärbtem Untergrund. Die Inkubationszeit betrug mindestens 6 Stunden. Bei Anfärbung der ohne Blattprobe elektrophorierten Gele wurde eine schwach positive Reaktion am Beginn des Trenngels und an der Stelle von Bromphenolblau beobachtet. Aus diesem Grund ist es zweifelhaft, ob die bei manchen Rebenproben auftretenden stärker positiven Reaktionen an diesen Stellen echte Isoenzyme oder Artefakte darstellen, sie werden daher bei der Darlegung der Ergebnisse nicht berücksichtigt. Die Gele können längere Zeit in einer Lösung von 10%igem Glycerin in 8%iger Essigsäure bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.<sup>3</sup>

<sup>20</sup> H. SCHAEFER, *Wein-Wissenschaft* 24, 205 (1969).

<sup>21</sup> H. SCHAEFER, *Vitis* 10, 31 (1971).

Die Esterasen wurden nach der von Rudolph und Stahmann<sup>4</sup> angegebenen Methode nachgewiesen. Nach mehrstündiger Anfärbung wurden die Gele in Methanol-Eisessig-Wasser (6:1:4)<sup>3</sup> fixiert. Es trat keine Reaktion bei der Elektrophorese ohne Blattprobe auf.

Die Auswertung wurde visuell und zum Teil mit dem Chromoscan (Joyce, Loeb & Co) durchgeführt. Die Position der einzelnen Isoenzyme wird in der Abbildung 1 durch  $R_f$ -Werte angegeben, wobei  $R_f = 1,0$  mit der Position der Bromphenolblau-Bande übereinstimmt.

*Anerkennungen*—Dem Forschungsring des Deutschen Weinbaues bei der D. L. G. sei herzlich gedankt für die großzügige Unterstützung dieser Arbeit. Für die sehr zuverlässige und sorgfältige Mitarbeit danke ich Frau Johann und Herrn Michelmichel.