

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Fachgebiet Biotechnologie der Naturstoffe

Untersuchungen zur
Regulation der Polyphenolbiosynthese in der
Erdbeerfrucht (*Fragaria* × *ananassa*) mittels
Metabolite Profiling

Ludwig F. M. Ring

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzende: Univ.-Prof. Dr. B. Poppenberger
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. W. Schwab
2. Univ.-Prof. Dr. T. Hofmann
3. Univ.-Prof. Dr. D. R. Treutter

Die Dissertation wurde am 17.06.2013 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 22.10.2013 angenommen.

„... and all the pieces matter“

Lester Freamon, 2002

meiner Familie

Danksagung

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Wilfried Schwab gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit an seinem Fachgebiet zu promovieren. Außerdem danke ich ihm für seine immerwährende Unterstützung und seinen ausstrahlenden Optimismus.

Bei Prof. Dr. Brigitte Poppenberger, Prof. Dr. Thomas Hofmann und Prof. Dr. Dieter Treutter bedanke ich mich für die Mitarbeit in der Prüfungskommission.

Allen Kooperationspartnern des *FraGenomics*-Projekts, insbesondere Prof. Dr. Juan Muñoz-Blanco, Dr. Beatrice Denoyes-Rothan und Dr. Amparo Monfort, möchte ich für die gute Zusammenarbeit und die fruchtbaren Diskussionen bei den Projekttreffen danken.

Prof. Dr. Victoriano Valpuesta danke ich sehr für die Möglichkeit meine Arbeiten zur Proteinanalytik am Department für Molekularbiologie und Biochemie der Universität Málaga durchführen zu können. Seinem gesamten Arbeitskreis danke ich für die herzliche Aufnahme! *Gracias a todos los miembros del grupo! Además, les agradezco a Dra. Irene Aragüez-Rey y Paqui Martínez sus ayudas con los geles 2D, y gracias a Ana Casañal y Dra. Cristina Muñoz por el apoyo local estupendo!*

Bei Dr. Thomas Hoffmann und Dr. Anja Preuß möchte ich mich sehr für die gewissenhafte Durchsicht meines Manuskripts und die wertvollen Denkanstöße bedanken.

Dr. Stephanie Hücherig und Dr. Su-Ying Yeh danke ich für die weiterführenden Arbeiten an *FaPRX27*.

Dipl.-LMChem. Ingolf Krause (†) verdanke ich einen Großteil meines LC-MS-Wissens, weshalb ich ihm für die zahlreichen „Lehrstunden“ zur LC-MS danken will.

Allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern des BiNa-Fachgebiets gilt mein herzlicher Dank für die stetige Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima. Im Speziellen danke ich Quirin Sinz und Christopher Fuchs für die hervorragende Atmosphäre im gemeinsamen Büro. Bei Corina Sutter und Christine John bedanke ich mich für ihre äußerst engagierte Mitarbeit im Rahmen von Masterarbeit und Forschungspraktikum.

Der größte Dank gebührt meinen Eltern, da sie mir diesen Schritt und vieles mehr überhaupt erst möglich machten. Auf ihre bedingungslose Unterstützung kann ich immer vertrauen. Genauso danke ich Hanna für den starken Rückhalt, die Motivationskraft und ihre unendliche Geduld.

Publikationen

Die Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden im Zeitraum Mai 2009 bis Mai 2012 in der Arbeitsgruppe Biotechnologie der Naturstoffe (früher Biomolekulare Lebensmitteltechnologie) am Wissenschaftszentrum Weihenstephan der Technischen Universität München in Freising durchgeführt. Die Dissertation entstand im Rahmen des transnationalen PLANT-KBBE-Verbundprojekts „*FraGenomics: Genetical genomics for improving strawberry fruit nutritional quality*“, gefördert durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF). Auszüge aus dieser Dissertation wurden bereits zur Veröffentlichung eingereicht bzw. veröffentlicht.

Originalartikel:

Ring L, Yeh S-Y, Hücherig S, Hoffmann T, Blanco-Portales R, Fouche M, Villatoro C, Denoyes B, Monfort A, Muñoz-Blanco J, Gershenson J, Schwab W (2013) Metabolic interaction between anthocyanin and lignin biosynthesis is associated with a peroxidase in strawberry fruit. *Plant Physiology* **163(1)**: 43-60.

Fischer T C, Mirbeth B, Rentsch J, Sutter C, Ring L, Flachowsky H, Habegger R, Hoffmann T, Hanke M-V, Schwab W (2013) Premature and ectopic anthocyanin formation by silencing of anthocyanidin reductase in strawberry (*Fragaria × ananassa*). *New Phytologist* doi: 10.1111/nph.12528.

Cumplido-Laso G, Medina-Puche L, Amil-Ruiz F, Moreno-Suarez B, Ring L, Rodriguez-Franco A, Caballero JL, Schwab W, Muñoz-Blanco J, Blanco-Portales R (2013) *FaMYB10* plays a major role in the regulation of the flavonoid/phenylpropanoid metabolism during the ripening of *Fragaria × ananassa* fruits. *Journal of Experimental Botany* doi: 10.1093/jxb/ert377.

Cumplido-Laso G, Medina-Puche L, Moyano E, Hoffmann T, Sinz Q, Ring L, Studart-Witkowski C, Caballero JL, Schwab W, Muñoz-Blanco J, Blanco-Portales R (2012) The fruit ripening-related gene *FaAAT2* encodes an acyl transferase involved in strawberry aroma biogenesis. *Journal of Experimental Botany* **63(11)**: 4275-4290.

Habegger R, Ring L, Schwab W (2012) Erdbeeren mit gesteigertem Gesundheitswert: Potenzial für Züchtung. *Spargel & Erdbeerprofi* **14(5)**:74.

Schwab W, Preuß A, Ring L (2010) Gesunde Früchtchen. *GenomXpress* **2**:25-57.

Vorträge:

Schwab W, Ring L, Preuß A (2010) FraGenomics: Genetical Genomics for Improving Strawberry Fruit Nutritional Quality (Stand 2010). GABI Statusseminar 2010, Potsdam.

Schwab W, Ring L, Preuß A (2011) FraGenomics: Genetical Genomics for Improving Strawberry Fruit Nutritional Quality (Stand 2011). GABI Statusseminar 2011, Potsdam.

Fischer T, Ring L, Hoffmann T, Sutter C, Mirbeth B, Hanke V, Flachowsky H, Schwab W (2011) Silencing of anthocyanidin reductase in strawberry (*Fragaria × ananassa*). Botaniker Tagung, Berlin.

Ring L, Schwab W (2012) Metabolite Profiling combined with transcriptome analyses reveal novel candidate genes involved in polyphenol biosynthesis. PLANT-KBBE final seminar, Barcelona.

Posterpräsentationen:

Ring L, Preuß A, Schwab W (2010) FraGenomics: Genetical Genomics for Improving Strawberry Fruit Nutritional Quality (Stand 2010). GABI Statusseminar 2010, Potsdam.

Schwab W, Ring L, Preuß A (2011) FraGenomics: Genetical Genomics for Improving Strawberry Fruit Nutritional Quality (Stand Anfang 2011). GABI Statusseminar 2011, Potsdam.

Ring L, Schwab W (2011) FraGenomics: Genetical Genomics for Improving Strawberry Fruit Nutritional Quality (Stand Ende 2011). Max-Rubner Conference on Food Metabolomics, Karlsruhe.

Fouche M, Vignes M, Mangin B, Petit A, Chartier P, Schwab W, Ring L, Monfort A, Villatoro C, Rothan C, Denoyes B (2012) Role of a MYB factor in strawberry fruit color. 6th Rosaceous Genomics Conference, Trient.

Schwab W, Ring L, Hücherig S, Yeh SY, Preuß A (2012) Metabolite profiling and transcriptome analyses reveal novel candidate genes. PLANT2030 GABI Statusseminar 2012, Potsdam.

Ring L, Muñoz-Blanco J, Schwab W (2012) PLANT-KBBE FraGenomics: Metabolite profiling of strawberry fruit. PLANT2030 GABI Statusseminar 2012, Potsdam.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	IX
Strukturformeln.....	XIV
Zusammenfassung	XVII
Summary	XX
1. Einleitung	1
1.1. Erdbeere	1
1.1.1. Geschichte.....	1
1.1.2. Morphologie.....	2
1.1.3. Reifung.....	3
1.1.4. Produktion und Konsum.....	4
1.1.5. Inhaltsstoffe	5
1.2. Polyphenole	7
1.2.1. Biosynthese und Funktionen <i>in planta</i>	7
1.2.2. Ernährungsphysiologische Aspekte.....	10
1.2.3. Ligninbiosynthese	11
1.3. Konzepte der Metabolit-Analytik	12
1.4. Aufgabenstellung	14
2. Material und Methoden	16
2.1. Material.....	16
2.1.1. Pflanzliches Material.....	16
2.1.1.1. Erdbeerfrüchte verschiedener Sorten und Kreuzungspopulationen.....	16
2.1.1.2. Transgene Pflanzen.....	18
2.1.2. Chemikalien.....	20
2.1.3. Medien.....	23
2.1.4. Puffer.....	24

2.1.5.	Sonstige Lösungen	26
2.1.6.	Bakterienstämme	28
2.1.7.	Vektoren	28
2.1.8.	Enzyme	28
2.1.9.	Primer.....	28
2.1.10.	Kommerzielle Kits	29
2.1.11.	Sonstige Materialien.....	29
2.2.	Geräte.....	30
2.2.1.	Flüssigkeitschromatographie-Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie (LC-ESI-MS ⁿ)	30
2.2.1.1.	LC-ESI-MS ⁿ : Analytisches System	30
2.2.1.2.	LC-ESI-MS ⁿ : Präparatives, biokompatibles System	31
2.2.2.	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC/UV)	33
2.2.3.	Festphasen-Mikroextraktion-Gaschromatographie-Massenspektrometrie (SPME-GC/MS).....	33
2.2.4.	Nuklearmagnetische Resonanz-Spektroskopie (NMR)	35
2.2.5.	Sonstige Geräte.....	35
2.2.6.	Software und Internetressourcen	36
2.3.	Methoden.....	37
2.3.1.	Analytische Methoden.....	37
2.3.1.1.	Extraktion der Polyphenole aus Früchten	37
2.3.1.2.	Extraktion der Polyphenole aus Blütenorganen	39
2.3.1.3.	Extraktion der Polyphenole aus Blättern, Nebenblättern und Wurzeln.....	40
2.3.1.4.	Isolierung von Metaboliten: Probenvorbereitung und Festphasenextraktion	40
2.3.1.5.	Isolierung von Metaboliten: Aufreinigung und NMR	41
2.3.1.6.	Ligninextraktion.....	42
2.3.1.7.	Quantifizierung von Lignin	43
2.3.1.8.	Extraktion von 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3[2H]-furanon (DMHF).....	43
2.3.1.9.	Analyse flüchtiger Verbindungen mittels SPME-GC/MS	45
2.3.1.10.	Thiolytische Spaltung der Proanthocyanidine	45
2.3.1.11.	Berechnung des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman	46
2.3.1.12.	Bioinformatische Auswertung (<i>untargeted analysis</i>)	47
2.3.2.	Molekularbiologische Methoden	50

2.3.2.1. Extraktion von totalRNA	50
2.3.2.2. Reinigung der RNA (DNA-Verdau).....	50
2.3.2.3. cDNA-Synthese (Reverse Transkription)	51
2.3.2.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	51
2.3.2.5. Agarosegelelektrophorese	52
2.3.2.6. Quantitative PCR (qPCR)	53
2.3.2.7. Konstruktion von p9U10-g23392i	53
2.3.2.8. Restriktion.....	54
2.3.2.9. Ligation	55
2.3.2.10. Herstellung kompetenter <i>Escherichia coli</i> NEB10-beta Zellen	55
2.3.2.11. Transformation von <i>Escherichia coli</i>	55
2.3.2.12. Herstellung kompetenter <i>Agrobacterium tumefaciens</i> AgL0 Zellen.....	56
2.3.2.13. Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> AgL0	56
2.3.2.14. Anlegen von Glycerinkulturen.....	56
2.3.2.15. Transfektion der Erdbeerfrüchte mit <i>A. tumefaciens</i>	56
2.3.2.16. Klonierung und Expression von <i>F. × ananassa</i> Peroxidase 27 (<i>FaPRX27</i>)	57
2.3.2.17. Enzymassay mit <i>FaPRX27</i>	57
2.3.2.18. Proteinextraktion zur 2D-Gelelektrophorese.....	58
2.3.2.19. Gießen der SDS-Gele	59
2.3.2.20. Isoelektrische Fokussierung (1. Dimension)	59
2.3.2.21. SDS-PAGE (2. Dimension)	59
2.3.2.22. Kolloidale Coomassie-Färbung.....	60
2.3.2.23. Entwicklung und Bearbeitung der Transkript-Datenbank (EST-Datenbank)	60
2.3.2.24. Microarray-Analyse	61
2.3.2.25. Genotypisierung und QTL-Analyse.....	62
3. Ergebnisse.....	63
3.1. Metabolite Profiling.....	63
3.1.1. Analyse der spanischen Sortenkollektion von 2009.....	63
3.1.2. Analyse der Segregationspopulation Capitola × CF1116	66
3.1.3. Analyse der französischen Sortenkollektionen von 2010 und 2011	69
3.1.4. Rangkorrelationskoeffizienten	69
3.1.5. Nachweisgrenzen	74

3.2.	Bestimmung von DMHF	75
3.3.	SPME-GC/MS von flüchtigen Komponenten.....	76
3.4.	Polyphenolanalysen transgener si-<i>ANR</i>- und si-<i>FLS</i>-Linien	78
3.4.1.	Analyse der si- <i>ANR</i> -Pflanzen.....	78
3.4.1.1.	Phänotyp.....	78
3.4.1.2.	LC-MS ⁿ von si- <i>ANR</i> -Blüten	79
3.4.1.3.	LC-MS ⁿ von si- <i>ANR</i> -Früchten.....	80
3.4.1.4.	Thiolytische Spaltung der Proanthocyanidine in si- <i>ANR</i> Früchten.....	85
3.4.1.5.	LC-MS ⁿ von si- <i>ANR</i> -Blättern.....	86
3.4.1.6.	LC-MS ⁿ von si- <i>ANR</i> -Wurzeln.....	86
3.4.1.7.	LC-MS ⁿ von si- <i>ANR</i> -Nebenblättern der Wurzeln und Ausläufer	87
3.4.2.	Analyse der si- <i>FLS</i> -Pflanzen.....	88
3.4.2.1.	Phänotyp.....	88
3.4.2.2.	LC-MS ⁿ von si- <i>FLS</i> -Blüten	88
3.4.2.3.	LC-MS ⁿ von si- <i>FLS</i> -Früchten verschiedener Reifestadien	89
3.4.2.4.	LC-MS ⁿ von si- <i>FLS</i> -Blättern.....	91
3.4.2.5.	LC-MS ⁿ von si- <i>FLS</i> -Wurzeln.....	91
3.4.2.6.	LC-MS ⁿ von si- <i>FLS</i> -Nebenblättern der Wurzeln und Ausläufer	91
3.5.	LC-MSⁿ-Analyse der <i>FaMYB10</i>-RNAi-Früchte.....	92
3.6.	Transkriptom-Analyse	92
3.7.	Die Rolle von gene19544 (<i>FaPRX27</i>) in der Ligninbiosynthese	95
3.7.1.	Genexpression von <i>FaPRX27</i>	95
3.7.2.	Klonierung von <i>FaPRX27</i> und Expression des rekombinanten Proteins	96
3.7.3.	Enzymassay mittels UV/Vis und LC-MS ⁿ	98
3.7.4.	Bestimmung des Ligningehalts	101
3.8.	QTL-Analyse.....	102
3.8.1.	QTL für Fruchtfarbe in der Region von <i>FaPRX27</i>	102
3.8.2.	QTL für DMHF-glucosid.....	103
3.9.	Bioinformatische Auswertung (<i>untargeted analysis</i>)	104
3.9.1.	Hauptkomponentenanalyse (PCA) und <i>loadings</i>	105

3.9.2.	PCA mit t-Test und HCA.....	107
3.9.2.1.	Differenzierung der Proben in einer PCA aufgrund verschiedener Messzeitpunkte ..	108
3.9.2.2.	Für die Charakterisierung der Proben verantwortliche Metabolite	112
3.10.	Identifizierung eines unbekanntes Metaboliten mittels ¹H-NMR.....	117
3.11.	2D-Gelelektrophorese	119
4.	Diskussion.....	122
4.1.	<i>Metabolite Profiling</i>.....	122
4.1.1.	Konkurrenz um Substrate bei der Bildung von Sekundärmetaboliten	122
4.1.2.	Polyphenolbiosynthese wird entscheidend durch Genotyp beeinflusst	123
4.1.3.	Bioinformatische Auswertung (<i>untargeted analysis</i>).....	124
4.1.3.1.	Kandidatenmetabolite für biologische Variation	124
4.1.3.2.	Auswertung der spanischen Sortenkollektion von 2009	128
4.1.4.	Methodik.....	131
4.2.	Analyse der si-<i>ANR</i>- und si-<i>FLS</i>-Pflanzen.....	133
4.2.1.	si- <i>ANR</i> -Pflanzen akkumulieren Cyanidin- und Quercetin-Derivate	133
4.2.2.	Herabregulation der <i>FLS</i> reduziert Flavonolgehalte	137
4.3.	Analyse der <i>FaMYB10</i>-RNAi-Früchte.....	138
4.4.	Proteinanalyse.....	139
4.5.	Microarray-Analyse	142
4.6.	Kandidatengene	143
4.7.	PRX27	149
4.8.	Schlussfolgerung.....	155
5.	Literatur.....	157
6.	Anhang	178

Abkürzungen

A	Fläche
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
bidest. Wasser	bidestilliertes Wasser
BLAST	<i>basic local alignment search tool</i> Suchwerkzeug zum Abgleich biologischer Sequenzen
bp	Basenpaar(e)
BSA	<i>bovine serum albumin</i> Rinderserumalbumin
c	Konzentration
c (rel)	Relative Konzentration
CAR	Carboxen
cDNA	<i>complimentary DNA</i> komplementäre DNA
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonsäure
CI	Chloroform:Isoamylalkohol
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
cv.	<i>cultivated variety</i> Kultivar, Sorte
d	<i>days</i> Tage
DAD	<i>diode array detector</i> Diodenarray Detektor
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
DMHF	2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3[2H]-furanon (Furaneol®)
DMMF	2,5-Dimethyl-4-methoxy-3[2H]-furanon (Mesifuran, Methoxyfuraneol)
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

EMBL	<i>european molecular biology laboratory</i> Europäisches Laboratorium für Molekularbiologie
ELM	<i>eukaryotic linear motif</i>
ERG	Eppendorf® Reaktionsgefäß (Eppendorf AG, Hamburg)
equ.	Äquivalente des internen Standards
EST	<i>expressed sequence tag</i> exprimierte DNA-Teilsequenzen
FD	Filmdicke
G1	Frühes, grünes Reifestadium der Erdbeerfrucht
G2	Spätes, grünes Reifestadium der Erdbeerfrucht
GC-MS	(Kapillar-) Gaschromatographie-Massenspektrometrie
h	<i>hours</i> Stunden
HCA	<i>hierarchical cluster analysis</i>
HHDP	Hexahydroxydiphensäure
HMF	4-Hydroxy-5-methyl-3[2H]-furanon (Norfuranol)
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
ID	Innendurchmesser
IPG	<i>immobilized pH gradient</i> Immobilisierter pH-Gradient
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosid
IS	Interner Standard
kb	Kilobasenpaar(e)
KB	<i>King's B</i>
LC-ESI-MS ⁿ	Flüssigkeitschromatographie-Elektrosprayionisations- Massenspektrometrie (kurz: LC-MS)
LB	<i>Luria-Bertani</i>
M	mol/L (molar)
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MG	Molekulargewicht
min	Minute(n)
MMA	<i>MS-Salze, MES, acetosyringon</i>
mod.	modifiziert

MS-Salzmischung	<i>Murashige and Skoog</i> – Salzmischung
MSD	<i>mass selective detector</i>
m/z	Masse durch Ladung (Einheit der Massenspektrometrie)
NAD(P)	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid(-Phosphat)
NCBI	<i>national center for biotechnology information</i>
n.d.	nicht detektierbar $\hat{=}$ unterhalb der Nachweisgrenze
OD _{xx}	Optische Dichte bei XX nm
ORF	<i>open reading frame</i> offener Leserahmen
PCA	<i>principle component analysis</i> Hauptkomponentenanalyse
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> Polymerasekettenreaktion
PDMS	Polydimethylsiloxan
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidon
QTL	<i>quantitative trait locus</i>
R	Rotes Reifestadium der Erdbeerfrucht (reif)
RE	Rohproteinextrakt
rpm	<i>rounds per minute</i> Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>
s.	siehe
S	Svedberg-Einheit
SA	Standardabweichung
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sec	Sekunde(n)
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SOC	<i>super optimal broth with catabolite repression</i>

SPME	<i>solid phase microextraction</i> Festphasenmikroextraktion
SPS	<i>smart parameter setting</i> (bei LC-ESI-MS ⁿ)
SSR	<i>simple sequence repeats</i> Basensequenzwiederholungen (auch: Mikrosatellit)
T	teilweise Rot (Übergangsstadium zwischen weiß und rot bei der Erdbeerfruchtreifung)
Tab.	Tabelle
TAE	<i>Tris, acetic acid, EDTA</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TM	Trockenmasse
TMS	Tetramethylsilan
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	ultraviolette Strahlung
Var.	Varietät
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
W	Weißes Reifestadium der Erdbeerfrucht
YPD	<i>yeast extract, peptone, dextrose</i> Hefeextrakt, Pepton, Dextrose
‰ equ. TM	mg equ./g Trockenmasse (bezogen auf Äquivalente des internen Standards Biochanin A)

Tab. 1: Ein- und Dreibuchstabencode der Aminosäuren.

Aminosäuren			Aminosäuren		
A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

Tab. 2: Abkürzungen der Enzyme.

Enzyme	
ANR	Anthocyanidin-Reduktase
ANS	Anthocyanidin-Synthase
CHI	Chalkon-Isomerase
CHS	Chalkon-Synthase
DFR	Dihydroflavonol-4-Reduktase
F3'H	Flavonoid-3'-Hydroxylase
FGT	Flavonoid 3-O-Glucosyltransferase
FHT	Flavanon-3- β -Hydroxylase (Flavanon-Hydroxyltransferase)
FLS	Flavonol-Synthase
LAR	Leucoanthocyanidin-Reduktase
2-ODD	2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenase
PAL	Phenylalanin-Ammoniak Lyase
PRX	Peroxidase

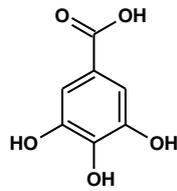
Anmerkung:

Abkürzungen von Gensequenzen sind kursiv (z.B. *FaPRX27*) gedruckt, die korrespondierenden Proteine in normaler Schreibweise (FaPRX27).

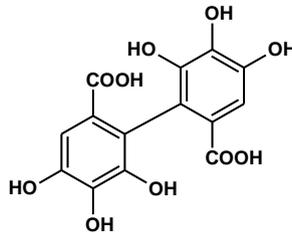
Strukturformeln

Wenn nicht anders vermerkt, gilt: $R^1 = H$; $R^2 = H$; $R^3 = H$

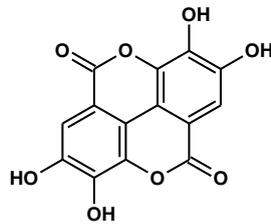
Gallussäure



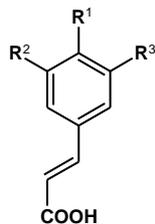
Hexahydroxy-diphensäure



Ellagsäure



Phenylpropansäuren



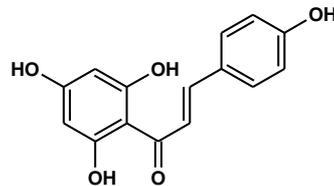
$R^1 = OH$: Cumarsäure

$R^{1,2} = OH$: Kaffeesäure

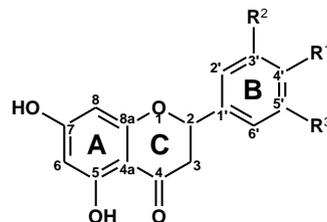
$R^1 = OH$, $R^2 = OCH_3$: Ferulasäure

$R^1 = OH$, $R^{2,3} = OCH_3$: Sinapinsäure

Naringenin-Chalkon



Flavanone

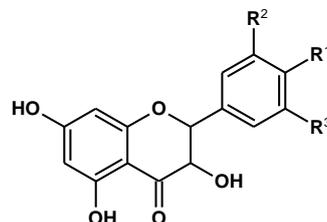


$R^1 = OH$: Naringenin

$R^{1,2} = OH$: Eriodictyol

$R^{1,2,3} = OH$: Pentahydroxyflavanon

Dihydroflavonole



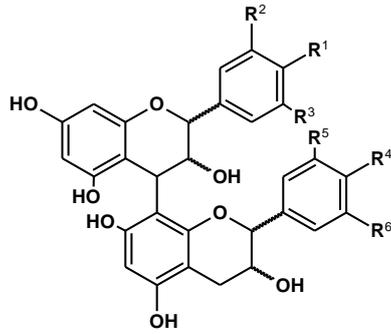
$R^1 = OH$: Dihydrokaempferol

$R^{1,2} = OH$: Dihydroquercetin

$R^{1,2,3} = OH$: Dihydromyricetin

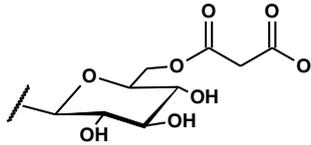
Flavonole		$R^1 = \text{OH}$: Kaempferol $R^{1,2} = \text{OH}$: Quercetin $R^{1,2,3} = \text{OH}$: Myricetin
Leucoanthocyanidine		$R^1 = \text{OH}$: Leucopelargonidin $R^{1,2} = \text{OH}$: Leucocyanidin $R^{1,2,3} = \text{OH}$: Leucodelphinidin
<i>trans</i> -Flavan-3-ole		$R^1 = \text{OH}$: Afzelechin $R^{1,2} = \text{OH}$: Catechin $R^{1,2,3} = \text{OH}$: Gallocatechin
<i>cis</i> -Flavan-3-ole		$R^1 = \text{OH}$: Epiafzelechin $R^{1,2} = \text{OH}$: Epicatechin $R^{1,2,3} = \text{OH}$: Epigallocatechin
Anthocyanidine		$R^1 = \text{OH}$: Pelargonidin $R^{1,2} = \text{OH}$: Cyanidin $R^{1,2,3} = \text{OH}$: Delphinidin
Anthocyane		$R^1 = \text{OH}$: Pelargonidin-3- <i>O</i> -glycosid $R^{1,2} = \text{OH}$: Cyanidin-3- <i>O</i> -glycosid $R^{1,2,3} = \text{OH}$: Delphinidin-3- <i>O</i> -glycosid
Flavan-3-ol-(4 α →8)-anthocyanidin-3- <i>O</i> -glycoside		$R^1 = \text{OH}$: Epiafzelechin-(4 α →8)-pelargonidin-3- <i>O</i> -glycosid

Proanthocyanidine
(PA) des B-Typs

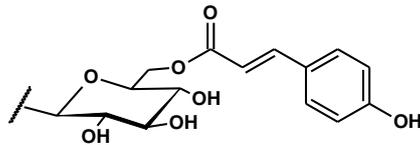


Verschiedene Isomere je nach
Stereoisomerie und R (H oder OH)

Mögliche Derivatisierungen der Glycosyl-Reste (am Beispiel der Glucose):



6''-O-Malonyl-glucosid



6''-O-Cumaryl-glucosid

Wenn nicht anders im Text vermerkt, handelt es sich bei Flavonoid-glycosiden um 3-O- β -D-Glucopyranoside.

Zusammenfassung

Phenolische Substanzen sind im Pflanzenreich weit verbreitet und daher ein wesentlicher Bestandteil der menschlichen Ernährung. Aufgrund ihrer gesundheitsfördernden Wirkung stehen sie im Fokus der wissenschaftlichen Forschung und sind von steigendem Interesse in der Nahrungsmittelindustrie. Das Wissen um die genetische Kontrolle sowohl qualitätsgebender als auch agronomischer Merkmale ist für eine nachhaltige Entwicklung von Kulturpflanzen essentiell, um Anbauflächen und Ressourcen effektiv nutzen zu können. Eine reichhaltige Quelle an Phytochemikalien ist die Erdbeere (*Fragaria × ananassa*). Sie zählt zu den beliebtesten Früchten weltweit und dient als Modellorganismus der Aromastoff- und Polyphenolbiosynthese in Rosaceae. In der Züchtung moderner Sorten standen zuletzt agronomische Charakteristika, wie die Erhöhung von Fruchtgröße und Ertrag, im Vordergrund, weshalb die Verbesserung von Geschmack, Aroma und ernährungsphysiologischer Qualität eine zentrale Aufgabe für zukünftige Züchtungsprogramme darstellt. Die Produktion von Sekundärmetaboliten verläuft über komplexe Regulationssysteme, sodass nicht nur das Verständnis für die Ausbildung einzelner Merkmale, sondern vielmehr die Erschließung der Zusammenhänge verschiedener Stoffwechselwege die größte Herausforderung für Züchter bedeutet, um Früchte mit hohem ernährungsphysiologischen Wert bei optimaler sensorischer Qualität und bestmöglichen agronomischen Eigenschaften produzieren zu können.

Die grundlegenden Züge der Polyphenolbiosynthese sind bereits gut untersucht, jedoch fehlen umfassende Kenntnisse über die Regulationsmechanismen von Akkumulation und Substratfluss durch den Metabolismus. Ziel dieser Arbeit war, das Wissen um die genetische Kontrolle bei der Bildung gesundheitsfördernder Inhaltsstoffe in der Erdbeerfrucht zu verbessern, um Züchtungsprogramme mit Hilfe von molekularen Markern zu optimieren. Dazu wurden die Hauptphenolkomponenten in verschiedenen Sorten und Kreuzungspopulationen mittels LC-MSⁿ analysiert und anschließend mit Genexpressionsmustern in Korrelation gesetzt.

Während der Gesamtgehalt an Polyphenolen zwischen den verschiedenen Genotypen nur geringe Unterschiede zeigte (Faktor 2,5), ließen sich bei Einzelkomponenten weitaus größere Differenzen (Faktor 4 – 35) beobachten. So konnte beispielsweise Pelargonidin-malonylglucosid in einigen Individuen in relativen Konzentration über 10 mg equ./g TM nachgewiesen werden, während der Gehalt in mehr als der Hälfte aller Proben unterhalb der Nachweisgrenze (0,05 mg equ./g TM) lag. Demnach scheint die Manipulation der Konzentrationen einzelner Substanzen in Züchtungsprogrammen einfacher umzusetzen zu sein, als Änderungen am Gesamtgehalt der Polyphenole vornehmen zu können. Ebenso ließ die gegensätzliche

Akkumulation von Aromastoffen und Polyphenolen eine Konkurrenz um Substrate bei der Bildung sekundärer Metaboliten erkennen. Genotypen mit hohen Gesamtpolyphenolgehalten produzierten meist geringere relative Konzentrationen an flüchtigen Substanzen, wie 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3[2H]-furanon (DMHF, Furaneol®). Die Pflanze besitzt womöglich mehr Flexibilität in der Verteilung der Substrate zwischen verschiedenen Biosynthesewegen als in der Erhöhung der gesamten Biomasse.

Die Metabolit-Analysen von drei aufeinander folgenden Jahrgängen einer Segregationspopulation, sowie von zwei Jahrgängen einer Sortenkollektion, demonstrierten die entscheidende Bedeutung der genetischen Grundlage für die Polyphenolproduktion. Die Gesamtpolyphenolgehalte unterschieden sich zwischen den verschiedenen Sorten des gleichen Jahrgangs um einen Faktor von 2,5. Eine ebenso große Variation herrschte zwischen den Nachkommen der Segregationspopulation. Im Gegensatz dazu ergab der Vergleich der einzelnen Proben in den verschiedenen Jahrgängen lediglich eine durchschnittliche Schwankung von Faktor 1,2. Die Berechnung der Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman legte eine mäßige, aber signifikante Korrelation (60 %, $p < 0,001$) zwischen den Jahrgängen dar. Demnach akkumulierte die Mehrheit aller Individuen über drei Jahre hinweg ähnliche Mengen an Phenolkomponenten. Ein Einfluss äußerer Faktoren auf die Polyphenolbiosynthese ließ sich erkennen, der Beitrag des Genotyps fiel jedoch deutlicher aus, was das grundlegende Potential einer erfolgreichen Züchtung veranschaulichte.

Auf Basis einer nicht-zielgerichteten Studie (*untargeted analysis*) konnte durch statistische Evaluierung eine Liste an Metaboliten, die signifikant zur biologischen Variation der untersuchten Sorten und Nachkommen der Segregationspopulation beitrugen, zusammengetragen werden. Neben den strukturell identifizierten Substanzen erschienen zahlreiche unbekannte Verbindungen unter den Kandidaten. Die Strukturen zweier konstitutionsisomerer Phlorogluciny-glucoside wurden mittels NMR aufgeklärt. Weitere unbekannte Metaboliten konnten anhand von massenspektrometrischen Literaturdaten identifiziert werden.

Die Rolle der Anthocyanidin-Reduktase (ANR) wurde anhand stabil transgener Erdbeerpflanzen mit herabregulierter ANR-Expression untersucht. Verglichen mit dem Wildtyp (WT) wiesen Narben, Kronblätter, junge Früchte, Wurzeln und Nebenblätter der *si-ANR*-Pflanzen erhöhte Gehalte an Cyanidin-glucosid auf, was zu einer charakteristischen Rotfärbung des Gewebes führte. Zudem konnte eine Akkumulation von Quercetin-glucuronid als *upstream*-Produkt und eine eingeschränkte Bildung von Epicatechin beobachtet werden, was die Funktion der ANR, *cis*-Flavan-3-ole zu bilden, bestätigte. Der starke Phänotyp von Blüten und jungen Früchten wies

auf eine besondere Rolle der ANR in frühen Entwicklungsphasen hin. Zudem zeigte die parallele Akkumulation der 3',4'-dihydroxylierten Komponenten Quercetin-glucuronid und Cyanidin-glucosid in frühen Reifestadien die abnehmende Aktivität der Flavonoid-3'-Hydroxylase (F3'H) entlang des Reifeprozesses.

Die Funktion der Flavonol-Synthase (FLS) wurde durch die Analyse von si-*FLS*-Pflanzen eindeutig bestätigt. In allen untersuchten Geweben (Blütenbestandteile, Früchte verschiedener Reifestadien, Blätter, Nebenblätter und Wurzeln) konnten stark reduzierte Gehalte an Kaempferol- und Quercetin-Derivaten im Vergleich zum WT beobachtet werden.

Dem Transkriptionsfaktor *FaMYB10* konnte anhand der LC-MSⁿ-Analyse von *FaMYB10*-RNAi-Erdbeerfrüchten eine entscheidende Rolle in der positiven Regulation der Anthocyanbiosynthese zugeschrieben werden. *FaMYB10*-RNAi-Früchte enthielten im Vergleich zum WT stark verminderte Konzentrationen an Anthocyanen.

Um Genexpressionsmuster mit Veränderungen in der Komposition phenolischer Substanzen korrelieren zu können, wurden Transkriptom-Analysen mittels Microarray durchgeführt. Dazu wurden verschiedene kommerzielle Sorten eingesetzt, die sich hinsichtlich der Akkumulation von Phenylpropanen, Flavonoiden (Flavanole, Flavonole und Proanthocyanidine) und Anthocyanen am deutlichsten voneinander abhoben. Aus den 17 komparativen Microarray-Analysen ergaben sich anhand der größten Expressionsunterschiede (> 200-fach) 15 Kandidatengene. Ein Peroxidase-Gen (*FaPRX27*) wurde in der Polyphenol-ärmsten Sorte mit 900-fach erhöhter Transkriptmenge im Vergleich zu der Sorte mit den höchsten Polyphenolgehalten nachgewiesen. Die Ergebnisse wurden durch heterologe Expression von *FaPRX27* validiert. Die funktionale Charakterisierung des rekombinanten Proteins zeigte die Beteiligung von *FaPRX27* an der Ligninbiosynthese in reifenden Erdbeerfrüchten. Zudem ist *FaPRX27* mit der genomischen Region des QTLs (*quantitative trait locus*), der mit der Abnahme der Intensität der Fruchtfarbe verknüpft ist, co-lokalisiert. Die Ergebnisse demonstrieren die Konkurrenz der verschiedenen phenolischen Stoffwechselwege um ihre gemeinsamen Vorstufen, sodass die Umlenkung des Substratflusses von unlöslichen zu löslichen Phenolkomponenten möglich erscheint, um Früchte mit erhöhtem Gehalt an gesundheitsfördernden Substanzen zu produzieren. Die ermittelten Kandidatengene beeinflussen die Akkumulation von phenolischen Substanzen vermutlich auf ähnliche Weise und könnten einen Beitrag zur Entwicklung von molekularen Markern in der Züchtung Polyphenol-reicher Genotypen leisten.

Summary

Phenolics are broadly distributed within the plant kingdom and therefore an integral part of the human diet. Due to their potential nutritional benefits they have drawn increasing attention in food research and industry. Identifying genetic determinants of both fruit quality and agronomical traits is essential for the sustained breeding of crops to benefit from acreage and resources effectively. A rich source of phytochemicals is strawberry (*Fragaria × ananassa*), which is not only one of the most popular fruits throughout the world, but also serves as a model for aroma and polyphenol biosynthesis in Rosaceae family. However, breeding of modern cultivars has mainly focused on agronomical traits such as fruit size and yield. Thus, improvement of strawberry flavor and nutritional quality has become an important factor in current breeding programs. The production of secondary metabolites is controlled by a complex genetic background. Hence, not only the knowledge of a single trait, but rather the connections of different biosynthetic pathways represent the major challenge for breeders who want to produce berry fruit with high nutritional value while maintaining an outstanding sensorial and agronomic quality of fruit.

Although the main features of the phenolics biosynthetic pathways have been intensively analyzed the regulation of their accumulation and flux through the pathway is not that well established. The aim of this study was to improve the knowledge on genetic control of healthy nutritional traits in strawberry fruits for optimizing breeding programs. Therefore the major phenolics in different varieties and segregating populations were analyzed via LC-MSⁿ and subsequently correlated with gene expression patterns.

While total phenolics content varied by a factor of 2.5 between the different genotypes, levels of specific compounds showed higher alterations (factor 4 – 35). For instance, pelargonidin-glucoside malonate was observed in some individuals in relative concentrations of 10 mg equ./g dry weight and above, but fell under the limit of detection (0.05 mg equ./g dry weight) in about 50 % of all analyzed samples. Hence, manipulation of the concentration of single compounds seems to be easier to achieve for breeders than alterations in the total amount of phenolics. Competition for substrates during the production of secondary metabolites was also observed by means of the contrasting accumulation of flavor compounds and phenolics. Genotypes containing high levels of total phenolics appeared to produce only small amounts of volatile compounds, such as 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3[2H]-furanone (DMHF, Furaneol[®]). There is probably more flexibility for the plant to divert biosynthetic pathways than increasing the total biomass.

Metabolite analyses of fruits from a segregating population of three sequent years and from a cultivar collection of two sequent years, respectively, demonstrated the crucial influence of the genotype on the production of polyphenols. The total phenolic content varied by a factor of 2.5 between the different cultivars of the same harvest year. Variation was observed to the same extent between the progeny of the segregating population. In contrast, comparison of the different harvest years revealed a variation of a factor of 1.2 on the average. Calculation of Spearman's rank correlation coefficients indicated a moderate but significant correlation (60 %, $p < 0.001$) between the harvest years. Thus, most of the individuals showed similar phenolics accumulation throughout the years. However, an influence of external factors on the phenolic biosynthetic pathway was observed, but the impact of genotype appeared to be more determining suggesting the basic potential of breeding.

Based on an untargeted analysis, statistical evaluation revealed a list of metabolites which contributed significantly to the biological variation of the varieties and progeny of the segregating population. Beside the structural identified substances several unknown compounds were among the candidates. The chemical structures of two constitutional isomeric phloroglucinyl-glucosides were determined via NMR. According to literature data further candidates were identified by corresponding mass spectrometric patterns. Structure elucidation of unknown components is essential for studying biosynthetic pathways, since the accumulation of single compounds reflects the connection and linkage of different biosynthetic pathways.

The role of anthocyanidin reductase (ANR) was examined using stable transgenic strawberry plants with downregulated expression of *ANR*. In comparison to the wild type (WT) stigmata, petals, young fruits, roots and stipules of the *si-ANR* plants showed higher levels of cyanidin-glucoside resulting in a characteristic red coloration of the tissue. Furthermore, accumulation of quercetin-glucuronide as an upstream product was observed, whilst the production of epicatechin was restrained confirming the function of ANR forming *cis*-flavan-3-ols. The strong phenotype of flowers and young fruits suggested the crucial role of ANR in early developmental stages. Additionally the corresponding accumulation of 3',4'-dihydroxylated compounds quercetin-glucuronide and cyanidin-glucoside in early ripening stages reflected the decreasing activity of flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H) along the ripening process.

Analysis of stable transgenic strawberry plants with downregulated expression of flavonol synthase (*FLS*) confirmed the function of FLS forming flavonols. In every tissue considered (flower parts, fruits at different ripening stages, leaves, stipules and roots) efficiently reduced levels of kaempferol and quercetin derivatives were detected compared to the WT.

The key role of transcription factor *FaMYB10* for the positive regulation of anthocyanin biosynthesis was determined by LC-MSⁿ analysis of *FaMYB10*-RNAi strawberry fruit. Compared to the WT the amounts of anthocyanins were strongly decreased in *FaMYB10*-RNAi fruit.

According to metabolite profiling data obtained from different commercial varieties, samples that showed highly different accumulation of phenylpropanoids, flavonoids (flavanols, flavonols and proanthocyanidins) and anthocyanins were subjected to an examination of the transcriptome using a strawberry microarray. Genes whose expression correlated with altered phenolics composition were identified. Seventeen comparative microarray analyses revealed 15 genes that were differently (> 200 fold) expressed in phenolics-rich versus poor varieties. The variety containing the lowest amount of total phenolics exhibited 900 fold higher transcript levels of a peroxidase gene (*FaPRX27*) than the variety with the highest total phenolics content. The results were validated by heterologous expression of *FaPRX27*. The encoded protein was functionally characterized and is assumed to be involved in lignin formation during strawberry fruit ripening. QTL analysis indicated co-localization of *FaPRX27* with the genomic region associated with the decrease of fruit color intensity. The results highlight the competition of the different phenolics pathways for their common precursors. Breeding of fruit with enhanced nutritional value by redirection of carbon flux from insoluble towards soluble phenolics appears to be feasible. The list provides new candidate genes that are likely to impact polyphenol accumulation in strawberry fruit and could be used to develop molecular markers to select phenolics-rich germplasm.

1. Einleitung

1.1. Erdbeere

1.1.1. Geschichte

Die Erdbeere gehört zur Gattung *Fragaria* in der Familie der Rosengewächse (Rosaceae). Neben dem Namensgeber *Rosa* (Rose) zählen viele Gattungen mit essbaren Früchten, wie *Rubus* (Himbeere, Brombeere), *Malus* (Apfel), *Prunus* (Pflaume, Aprikose, Pfirsich, Kirsche) und *Pyrus* (Birne) zu den Rosaceae (Franke, 1997).

Unter den wilden *Fragaria* Species besitzt die diploide Walderdbeere *Fragaria vesca* ($2n = 2x = 14$) die größte geographische Ausdehnung, die sich über die gesamten gemäßigten Breiten Amerikas, Asiens und Europas erstreckt (Hancock und Luby, 1993). Sie zeichnet sich durch ihre kleinen, dunkelroten Früchte mit ihrem intensivem Geruch und Geschmack aus.

Heute kommt der kultivierten Gartenerdbeere *Fragaria* × *ananassa* Duch. die größte Bedeutung zu. Sie ist octoploid ($2n = 8x = 56$) und wurde erstmals im Jahre 1759 von Philip Miller beschrieben. Ihr Ursprung als zufälliges Kreuzungsprodukt der südamerikanischen *F. chiloensis* (L.) Mill. und der nordamerikanischen *F. virginiana* Mill. wurde vom französischen Botaniker Antoine Nicholas Duchesne in 1766 erkannt. Aufgrund von Geruch und Form der Früchte benannte er sie nach der Ananas. Seit Beginn des 19. Jahrhunderts werden *F.* × *ananassa* Sorten kommerziell gezüchtet, sodass über 600 verschiedene Sorten bekannt sind, die sich in Größe, Aussehen, Geruch und Geschmack der Früchte unterscheiden (Hancock, 1999; Horvath *et al.*, 2011).

Ihr junger Ursprung und die frühe Züchtungspraxis führten zu einer Verminderung der genetischen Variabilität von *F.* × *ananassa* Kultivaren. Durch die Einbringung wilder *Fragaria* Species bei der Entwicklung neuer Sorten konnte zwar ein Beitrag zur Erhaltung genetischer Vielfalt geleistet werden, dieser kann den Verlust an Diversität jedoch nicht kompensieren (Gil-Ariza *et al.*, 2009; Sjulín und Dale, 1987; Dale und Sjulín, 1990). Betroffen sind vorwiegend alte europäische Kultivare, da aufgrund von gesteigerter Größe und höherer Erträge in den letzten Dekaden hauptsächlich moderne nordamerikanische Sorten verwendet wurden (Rosati, 1993). Neben dem Erhalt wilder *Fragaria* Species könnte der Genpool alter europäischer Sorten eine wertvolle Quelle sensorischer und ernährungsphysiologischer Merkmale in zukünftigen Züchtungsprogrammen darstellen (Horvath *et al.*, 2011).

1.1.2. Morphologie

Die Erdbeere ist eine mehrjährige, krautige Pflanze mit einem zentralen Vegetationskegel, dem Blätter, Wurzeln, Blütenstände und Ausläufer entspringen (**Abb. 1**). Durch die Ausbildung zweier langer Internodien können sich aus den Achselknospen Ausläufer entwickeln, die am zweiten Nodium in einer Tochterrosettenpflanze mit sprossbürtigen Wurzeln enden. Eine *F. × ananassa* Pflanze produziert durchschnittlich 10 – 15 Ausläufer pro Jahr. Da die Tochterpflanze sogleich wieder Ausläufer bilden kann, ist eine schnelle vegetative Vermehrung möglich (Hancock, 1999; Franke, 1997).

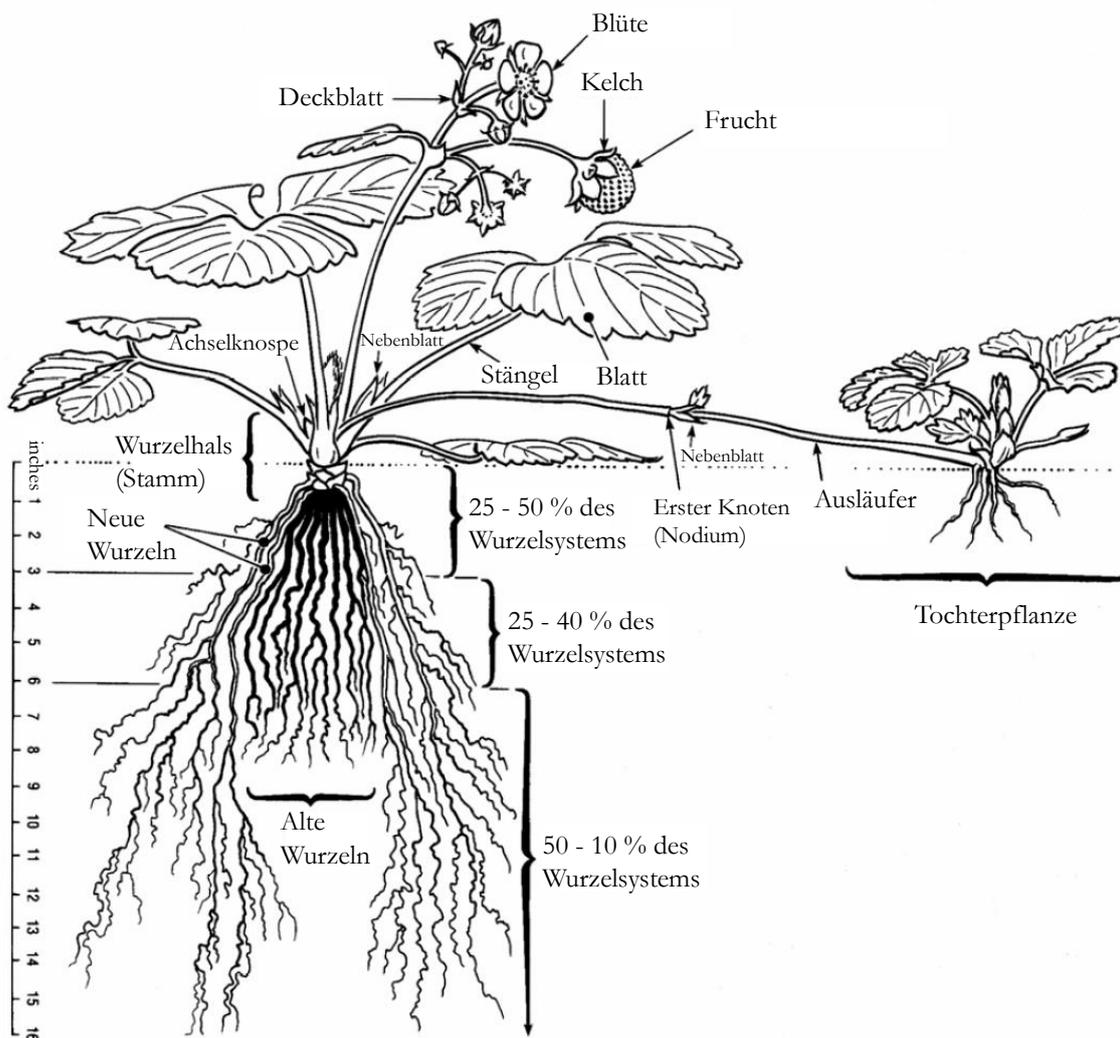


Abb. 1: Erdbeerpflanze (Hancock, 1999).

Eine typische Erdbeerbblüte besitzt zehn Kelchblätter, fünf Kronblätter, 20 – 30 Staubblätter und zahlreiche Fruchtblätter (**Abb. 2**). Die Fruchtblätter sind zu Stempeln, bestehend aus Griffel und Narbe, verwachsen. Erdbeeren werden von Insekten, hauptsächlich von Bienen, bestäubt (Hancock, 1999).

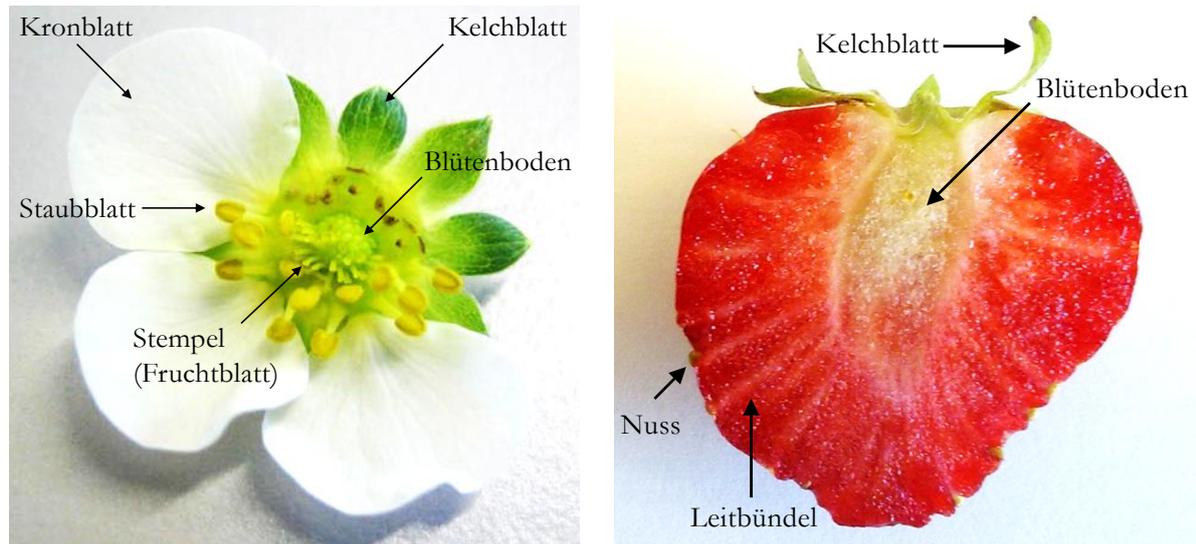


Abb. 2: Blüte (links) und Frucht (rechts) der Erdbeerpflanze (*F. × ananassa*) (Foto der Blüte aus Hanhineva *et al.*, 2008).

Die im herkömmlichen Sprachgebrauch als Erdbeere bezeichnete Frucht ist im botanischen Sinne eine Sammelnussfrucht. Die kleinen Nüsschen stellen die echten Früchte dar und befinden sich eingebettet in die Epidermis des Blütenbodens, von wo aus sie über Leitbündel mit Nährstoffen versorgt werden (Franke, 1997). Der sich im Laufe der Reifung stark vergrößernde Blütenboden ist somit der eigentlich genießbare Teil der Frucht. Er gliedert sich in das weißliche Mark und die von Anthocyanen rot gefärbte Rinde. Im Folgenden wird der Begriff Erdbeerfrucht für den gesamten Fruchtverband verwendet.

1.1.3. Reifung

Der Zeitraum zwischen Blüte und reifen Früchten beträgt etwa 30 Tage und durchschreitet folgende Stadien: Blüte, kleine grüne Frucht (G1), große grüne Frucht (G2), weiße Frucht (W), teilweise rote Frucht (I), reife rote Frucht (R) (Bilder zu den einzelnen Reifestadien s. **Abb. 14**, S. 79). Die Erdbeere *F. × ananassa* ist die am besten untersuchte fruchttragende Pflanze, die eine nicht-klimakterische Fruchtreifung aufweist. Anders als bei klimakterischen Früchten, wie Tomate, Banane und Apfel, erfolgt die Reifung nicht-klimakterischer Früchte unabhängig von einer gesteigerten Ethylen-Biosynthese (Giovannoni, 2004). Die Zuordnung scheint im Falle der Erdbeere auf dem Charakter der Scheinfrucht zu beruhen, da zwar eine erhöhte Ethylenproduktion während der Reifung festgestellt werden konnte, diese sich aber auf die Nüsschen konzentrierte (Janetta *et al.*, 2006).

Das Wachstum der Erdbeerfrüchte wird hauptsächlich durch das Phytohormon Auxin (Indolessigsäure) gesteuert, welches in den Nüsschen synthetisiert wird (Perkins-Veazie, 1995;

Manning, 1998). Eine partielle Entfernung der Nüsschen führt nur in unmittelbarer Umgebung der verbliebenen Nüsschen zu einer Ausdehnung des Blütenbodens (Hancock, 1999). Die Auxinproduktion besitzt ihr Maximum im weißen Stadium, wenn die Nüsschen reifen und sich von grün zu braun verfärben. Durch den anschließenden Abfall der Auxinkonzentration wird vermutlich die Ausbildung von Farbpigmenten und Aromastoffen im Blütenboden eingeleitet (Given *et al.*, 1988). Zusätzlich bewirkt die Freisetzung von Pektin-Methylesterasen und Cellulasen eine Texturerweichung (Huber, 1984; Abeles und Takeda, 1990; Civello *et al.*, 1999). Zudem konnte kürzlich nachgewiesen werden, dass die Anwesenheit von Abscisinsäure entscheidend zur Anthocyanproduktion beiträgt (Jia *et al.*, 2011; Symons *et al.*, 2011; Zifkin *et al.*, 2012).

1.1.4. Produktion und Konsum

Die octoploide Kulturerdbeere *F. × ananassa* ist die bedeutendste weiche Frucht weltweit, mit einer Anbaufläche von etwa 250000 ha und einer Produktion von über vier Millionen Tonnen in 2010 (**Abb. 3**). Im Durchschnitt der letzten zehn Jahre zählten die USA (1 Mio. Tonnen pro Jahr), Spanien (0,3 Mio. t/a), die Türkei, Südkorea und Russland (0,2 Mio. t/a) zu den Hauptproduzenten. Je etwa 35 % der Produktion fielen auf Europa und Amerika, 20 % auf Asien und etwa 7 % auf Afrika. Die höchsten Hektarerträge erzielten Länder wie die USA (49 t/ha), Marokko, Israel und Spanien (35 t/ha) (FAOSTAT, 2012).

Nach Spanien zählen in der EU Polen, Deutschland und Italien zu den Hauptproduzenten. Obwohl über 50 % der Anbauflächen in der EU auf Polen entfallen, liegt es in der Produktion aufgrund seines geringen Hektarertrages von 3 t/ha nur auf Platz zwei. In Deutschland werden ca. 13000 ha auf den Anbau von Erdbeeren verwendet. Mit einem Hektarertrag von ca. 12 t/ha werden jährlich rund 150000 t produziert (FAOSTAT, 2012). Der Anbau geschieht fast ausschließlich im Freiland, wobei der Gebrauch von Flachfolien- und Vliesabdeckungen weiter steigt und mittlerweile etwa 50 % des kompletten Anbaus ausmacht (Württembergischer Markt- und Preisberichtsstelle für Erzeugnisse der Land-, Forst- und Ernährungswirtschaft GmbH (ZMP) Bonn, 2009). Gewächshäuser nehmen ebenfalls zu, spielen jedoch mit 2 % noch keine entscheidende Rolle (DESTATIS, 2012).

Der Konsum an Erdbeeren betrug in Deutschland in 2007 etwa 235000 t, was einer Eigenversorgung von 67 % entsprach (Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL) Bayern, 2012). Im Jahre 1998 lag diese noch bei 35 %. Während die Importe sanken, haben sich die Exporte von 1998 (4710 t) bis 2007 (13500 t) fast verdreifacht. Auch die Sortenvielfalt nahm zu. Während in 1998 fast ausschließlich (95 %) Elsanta (Institute of Horticultural Breeding, Wageningen,

Niederlande, 1981) angebaut wurde, fanden in 2007 neben Elsanta (57 %) auch DarSelect, Clery, Honeoye und Sonata Verwendung (Württemberg (ZMP), 2009). Weltweit wird die Sorte Camarosa (University of California, Davis, USA, 1992) am meisten angebaut. Sie reift früh, ergibt hohe Erträge und bringt große, tiefrote und feste Früchte hervor, die sich aufgrund ihrer Beschaffenheit gut transportieren lassen (Hancock, 1999).

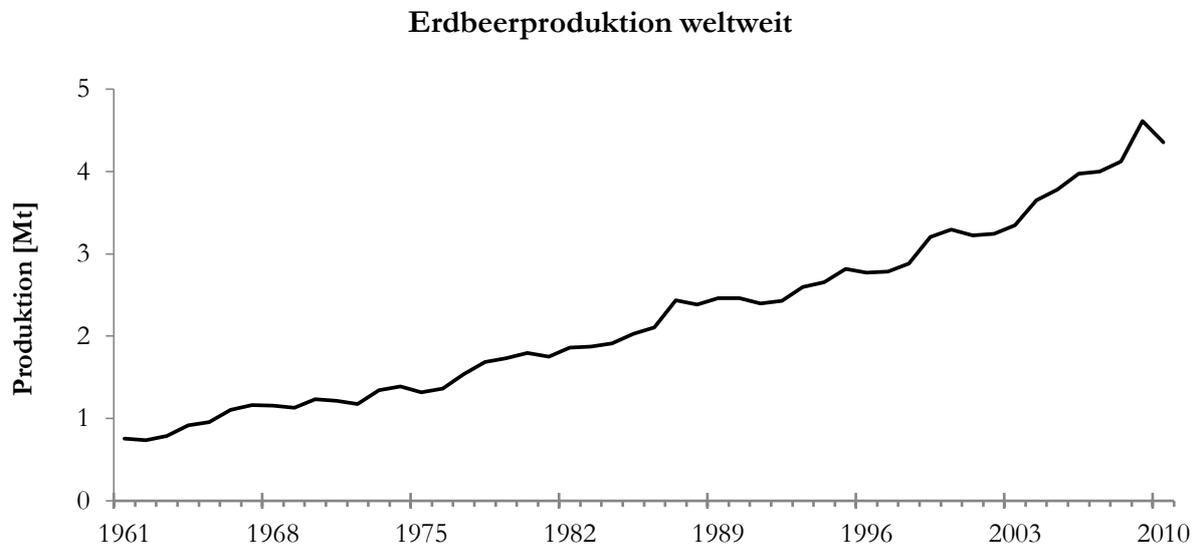


Abb. 3: Weltweite Erdbeerproduktion in Megatonnen von 1961 – 2010 (FAOSTAT, 2012).

Beim Pro-Kopf-Verbrauch von Obst standen 2010 in Deutschland Äpfel (28,9 kg) und Bananen (10,6 kg) an der Spitze, gefolgt von Tafeltrauben und Apfelsinen mit jeweils ca. 6 kg. Erdbeeren lagen mit 3,4 kg auf gleichem Niveau mit Pfirsichen/Nektarinen (3,6 kg), Clementinen (3,5 kg) und Birnen (3,2 kg). Die verbleibenden 18 kg Frischobst verteilten sich auf Kirschen (2,3 kg), Brom-/ Heidel-/ Preiselbeeren (2 kg), Zitronen (1,6 kg) und viele mehr. In den angegebenen Werten sind Verarbeitungsmengen in Frischgewicht miteingeschlossen. Ebenso ist zu beachten, dass Äpfel das ganze Jahr über verfügbar sind, Erdbeeren nur ca. 3 Monate (LfL Bayern, 2012).

Bezüglich der Preise ist die Erdbeere mit 3,85 €/kg Spitzenreiter vor Aprikosen (2,84 €), Tafeltrauben (1,87 €), Pfirsichen (1,75 €), Pflaumen (1,01 €), Birnen (0,89 €) und Äpfeln (0,85 €) (Durchschnittspreise pro kg für in Deutschland produzierte Früchte von 2007-2011) (LfL Bayern, 2012).

1.1.5. Inhaltsstoffe

Reife Erdbeerfrüchte von *F. × ananassa* besitzen einen Brennwert von etwa 30 kcal pro 100 g Frischgewicht und bestehen zu ca. 90 % aus Wasser. Je nach Sorte kann der Wassergehalt zwischen 88 und 94 % variieren. Weitere Inhaltsstoffe sind Zucker (2 % Glucose, 2 % Fructose,

1 % Saccharose), Ballaststoffe (1,5 %, v.a. Pektin), Organische Säuren (1,5 %, v.a. Zitronensäure), Protein (0,8 %) und Fett (0,4 %). Wichtigster Mineralstoff ist Kalium (Souci *et al.*, 2008; Giampieri *et al.*, 2012).

Der Geruch reifer Erdbeerfrüchte besteht aus über 360 Substanzen (Latrasse, 1991; Zabetakis und Holden, 1997), von denen ca. 15 entscheidend zum charakteristischen Aroma beitragen, darunter 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3[2H]-furanon (DMHF), 2,5-Dimethyl-4-methoxy-3[2H]-furanon (DMMF), (Z)-3-Hexenal, Methylbutanoat, Ethylbutanoat, Ethylhexanoat, Diacetyl und Linalool (Larsen und Poll, 1992; Schieberle und Hoffmann, 1997). Der Beitrag der einzelnen Verbindungen zum Gesamtaroma variiert je nach Sorte (Larsen *et al.*, 1992).

Neben dem Aroma zählt die Farbe zu den qualitätsbildenden Merkmalen der Erdbeerfrüchte. Die rote Färbung wird durch Anthocyane hervorgerufen, wovon in *F. × ananassa* Pelargonidin-3-O-glucosid den größten Anteil (ca. 90 %) ausmacht. Cyanidin- und andere Pelargonidin-Derivate werden in geringerem Maß gebildet (Bakker *et al.*, 1994; Aaby *et al.*, 2007).

Erdbeeren werden nicht nur aufgrund ihres ansprechenden Geschmacks, Aromas und Aussehens geschätzt, sondern auch wegen ihres Gesundheitswerts, der zunächst auf die hohen Gehalte an Vitamin C (ca. 100 mg pro 100 g Frischgewicht) zurückzuführen ist (Souci *et al.*, 2008). Zusätzlich zählt die Erdbeere zu den Folsäure-reichsten Früchten (ca. 25 µg pro 100 g Frischgewicht) (Giampieri *et al.*, 2012). Seit einiger Zeit stehen aber auch phenolische Substanzen (Polyphenole) und ihre gesundheitsfördernden Wirkungen im Blickpunkt der Forschung (s. 1.2). Je nach Sorte und Quantifizierungsmethode ergibt sich ein Gesamtphenolgehalt von etwa 50 – 200 mg pro 100 g Frischgewicht (berechnet als Gallussäure-Äquivalente). Im grünen Reifestadium liegt der Wert um ein zwei- bis dreifaches höher, unabhängig davon, ob der Wert aus Frischgewicht oder Trockenmasse bestimmt wurde (Perkins-Veazie, 1995; Wang und Lin, 2000; Hanhineva *et al.*, 2011). Hier kommt u.a. der hohe Zuckeranteil reifer Früchte, der etwa 40 % der Trockenmasse ausmacht, zum Tragen (Hancock, 1999).

Zwischen verschiedenen Erdbeerkultivaren lässt sich trotz ihrer geringen genetischen Variabilität (s. 1.1.1) eine große Variation von Gehalt und Komposition phenolischer Sekundärmetaboliten feststellen (Pincemail *et al.*, 2012; Rekika *et al.*, 2005; Tulipani *et al.*, 2008; Hernanz *et al.*, 2007). Die Kulturerdbeere eignet sich daher gut als Modellorganismus zur Untersuchung der Polyphenolbiosynthese (Giovannoni, 2001), zumal die Genomsequenz der Walderdbeere *Fragaria vesca* ($2n = 2x = 14$) vollständig vorliegt und als Referenz dient (Shulaev *et al.*, 2011).

1.2. Polyphenole

1.2.1. Biosynthese und Funktionen *in planta*

Phenolische Substanzen sind im gesamten Pflanzenreich weit verbreitet und stellen die vielfältigste Gruppe pflanzlicher Sekundärmetabolite dar (Pereira *et al.*, 2009). Über 8000 phenolische Strukturen sind momentan bekannt (Dai und Mumper, 2009). Ihr Spektrum reicht von einfachen Molekülen wie Phenylpropansäuren bis hin zu hochpolymeren Netzwerken wie Tanninen oder Ligninen (Ververidis *et al.*, 2007). Da ihre chemische Struktur meist mehrere Phenolgruppen aufweist, werden sie auch Polyphenole genannt. Neben ihrer Beteiligung an der Kommunikation zwischen der Pflanze und anderen Organismen sind sie in die verschiedensten Prozesse bei der Reaktion auf biotischen und abiotischen Stress involviert (Lattanzio *et al.*, 2006). Phenolische Substanzen schützen die Pflanze vor schädigender UV-B-Strahlung (Agati und Tattini, 2010), wirken als Antimikrobiotika, Fraßschutz oder Metall-Komplexbildner, übernehmen Funktionen als Struktursubstanzen und sind als Farbstoffe und andere Lockmittel an der Fortpflanzung beteiligt (Winkel-Shirley, 2002; Li *et al.*, 2010).

Gewöhnlich werden Polyphenole in den Vakuolen von Schließ- und Epidermiszellen von Blättern, Sprossen und Früchten angereichert (Ferrerres *et al.*, 2011), meist dort, wo sie eine direkte oder signalgebende Rolle zum Schutz der Pflanze einnehmen. Oft sind sie kovalent an die Zellwand gebunden oder kommen in Wachsen und externen Oberflächen der Pflanzenorgane vor (Modafar und Boustani, 2001). Einige Ergebnisse deuten darauf hin, dass Flavonoide auch in Zellkernen bestimmter Baumarten gelagert werden (Feucht *et al.*, 2004). Ein Flavonoid-DNA-Komplex könnte vor oxidativen Schädigungen schützen (Treutter, 2006).

Pflanzenphenole entstammen der Biosynthese der Shikimisäure (**Abb. 4**). Die bedeutendsten anschließenden Stoffwechselwege sind die der Gallo- und Ellagtannine, der Phenylpropanoide, der Flavonoide und der Anthocyane (Vogt, 2010; Salminen und Karonen, 2011). Viele der involvierten Gene und Enzyme wurden in Modellorganismen wie *Arabidopsis thaliana*, Mais (*Zea mays*) und *Petunia hybrida* entdeckt und charakterisiert, kürzlich auch in *Fragaria* (Lunkenbein *et al.*, 2006; Almeida *et al.*, 2007; Griebler *et al.*, 2008a, b; Schwab *et al.*, 2011).

Aus einem Intermediat des Shikimat-Weges (3-Dehydroshikimisäure) gehen Gallussäure und Ellagsäure (Di-Lacton aus Hexahydroxydiphensäure (HHDP)) hervor. Gallo- und Ellagtannine sind mehrfach mit HHDP und Gallussäure veresterte Glucosemoleküle. Den Anfang des Phenylpropanstoffwechsels und damit die Schnittstelle zwischen Primär- und

Sekundärstoffwechsel markiert die aromatische α -Aminosäure Phenylalanin. Aus verschiedenen Phenylpropansäuren und -alkoholen wird die Gerüstsubstanzklasse der Lignine aufgebaut.

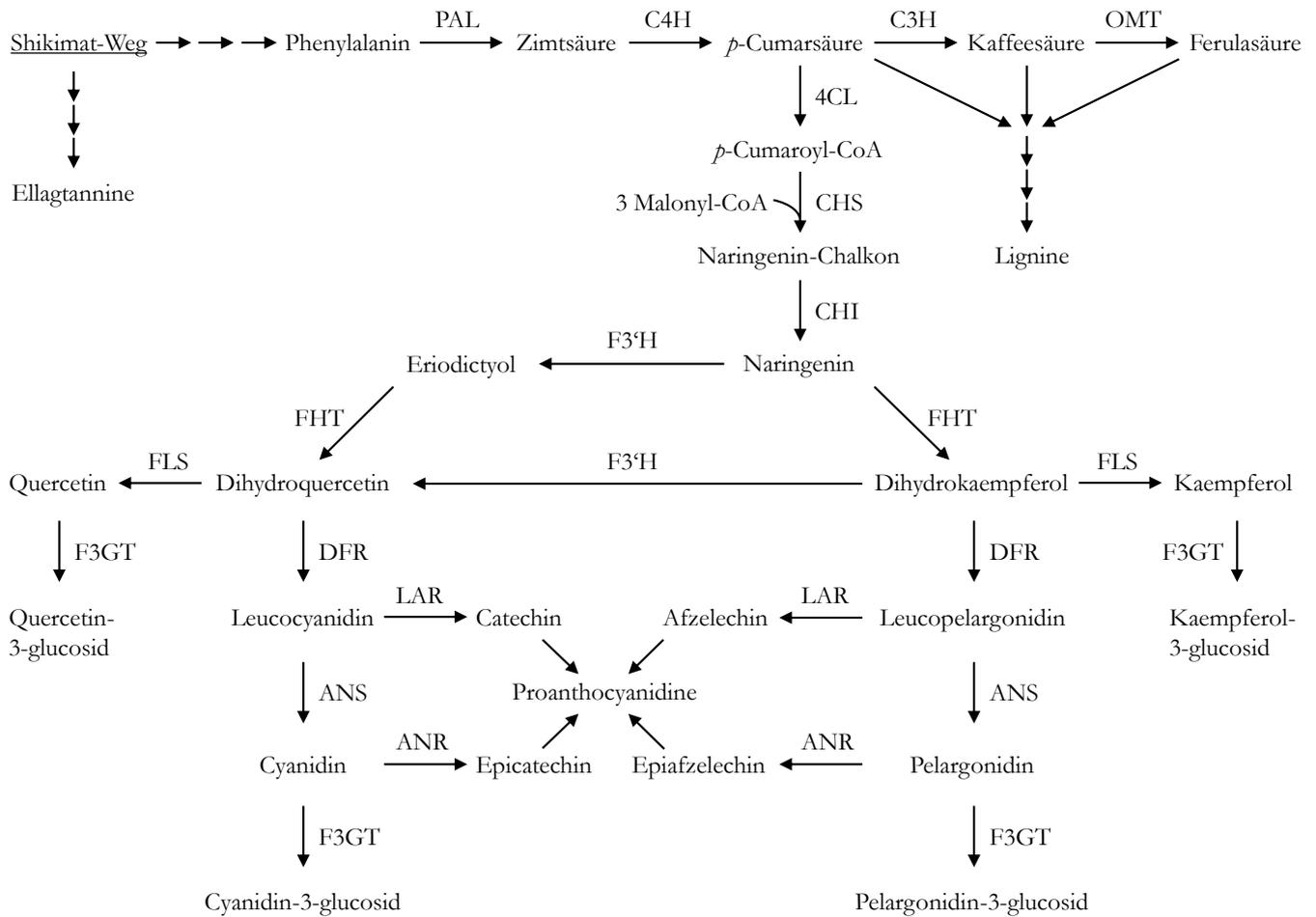


Abb. 4: Schema der Flavonoidbiosynthese in Erdbeeren, abgeleitet von Halbwirth *et al.*, 2006b, und Vogt, 2010. **PAL** Phenylalanin-Ammoniak-Lyase, **C4H** Zimtsäure-4-Hydroxylase, **C3H** *p*-Cumarsäure-3-Hydroxylase, **OMT** *O*-Methyltransferase, **4CL** *p*-Cumaroyl-CoA-Ligase, **CHS** Chalkon-Synthase, **CHI** Chalkon-Isomerase, **F3'H** Flavonoid-3'-Hydroxylase, **FHT** Flavanon-3-Hydroxyltransferase, **FLS** Flavonol-Synthase, **DFR** Dihydroflavonol-4-Reduktase, **LAR** Leucoanthocyanidin-Reduktase, **ANS** Anthocyanidin-Synthase, **ANR** Anthocyanidin-Reduktase, **F3GT** Flavonoid-3-*O*-Glucosyltransferase. Strukturformelverzeichnis s. S. XIV.

Ausgehend von *p*-Cumaroyl-CoA zweigt sich von dem Phenylpropanstoffwechsel unter Einbindung von Malonyl-CoA (aus dem Acetat/Malonat-Weg) die Flavonoidbiosynthese ab, deren Grundzüge bis zur Anthocyanbildung nahezu vollständig aufgeklärt sind (Salminen und Karonen, 2011; Ververidis *et al.*, 2007).

Die Chalkon-Synthase (CHS) nimmt in der Flavonoidbiosynthese eine Schlüsselrolle ein, da sie zusammen mit der Chalkon-Isomerase (CHI) für den Aufbau des Grundgerüsts flavonoider Verbindungen verantwortlich ist. Ihre transiente Herabregulation führte zu einer Verringerung

der Anthocyangehalte und einer vermehrten Akkumulation von Phenylpropanen in Erdbeerfrüchten (Hoffmann *et al.*, 2006).

Ausgehend von dem Flavanon Naringenin ergeben sich zwei parallele Biosynthesestränge, je nachdem ob der B-Ring einfach hydroxyliert bleibt oder durch die Flavonoid-3'-Hydroxylase (F3'H) zweifach hydroxyliert wird. Flavonoide mit dreifach hydroxylierten B-Ringen sind in Erdbeerfrüchten nicht enthalten (Hanhineva *et al.*, 2011).

Die Synthese der Flavonole Kaempferol und Quercetin erfolgt durch die Flavonol-Synthase (FLS), eine 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenase (2-ODD), deren Aktivität im Verlauf der Reifung abnimmt (Carbone *et al.*, 2009), wobei ihre maximale Expression auch im W (Weiß)- und T (teilweise Rot)-Stadium auftreten kann (Halbwirth *et al.*, 2006b; Almeida *et al.*, 2007). Die Reaktion der FLS stellt eine Abzweigung vom Anthocyan-Biosyntheseweg dar, da sie die gleichen Vorstufen wie die Dihydroflavonol-4-Reduktase (DFR) benutzt (Martens *et al.*, 2010).

Die Leucoanthocyanidin-Reduktase (LAR) synthetisiert *trans*-Flavan-3-ole. Aufgrund der strikten Substratspezifität der *F. × ananassa* LAR für Leucocyanidin wird in Erdbeeren kein Afzelechin, sondern ausschließlich Catechin gefunden (Almeida *et al.*, 2007). Die *cis*-Flavan-3-ole Epicatechin und Epiafzelechin werden von der Anthocyanidin-Reduktase (ANR) gebildet. Während die Aktivität der LAR schon länger bekannt ist (Stafford und Lester, 1984), wurde die ANR erst kürzlich beschrieben (Xie *et al.*, 2003; Devic *et al.*, 1999). Beide Enzyme besitzen ihre maximalen Transkriptlevel im grünen Reifestadium (Almeida *et al.*, 2007). Da die ANR eine zweifache Reduktion vom positiv geladenen Anthocyanidin (z.B. Cyanidin) zum *cis*-Flavan-3-ol (z.B. Epicatechin) katalysiert, wird die Zwischenstufe eines 2-Flaven-3-ols postuliert (Xie *et al.*, 2004). Die Biosynthese der oligo- und polymeren Kondensationsprodukte (Proanthocyanidine) ist weiterhin ungeklärt (Dixon *et al.*, 2005; Carbone *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2010).

Die Flavonoid-3-O-Glucosyltransferasen (F3GT) werden reifekorreliert exprimiert und sind für die Anthocyanbildung verantwortlich (Grießer *et al.*, 2008a, b).

In letzter Zeit wurden vor allem die Regulationsmechanismen der Flavonoid/Anthocyan-Stoffwechselwege erforscht, sowie die Charakterisierung von Transkriptionsfaktoren, die durch Anlagerung an bestimmte DNA-Abschnitte die Expression von Strukturgenen kontrollieren (Allan *et al.*, 2008; Boudet, 2007; Gonzalez *et al.*, 2008; Aharoni *et al.*, 2001).

Zusätzlich zu den bisher erwähnten Flavonoiden produzieren manche Pflanzen Isoflavone (z.B. Soja *Glycine max*) oder Stilbene (Wein *Vitis vinifera*). So enthalten z.B. Weintrauben von *Vitis vinifera* das intensiv untersuchte Stilben Resveratrol. Metabolomische Untersuchungen erfassten

Resveratrol in Erdbeerfrüchten bisher nicht (Hanhineva *et al.*, 2011), über das Vorhandensein wurde lediglich in zwei gezielten Studien berichtet (Ehala *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2007).

Zu den vorherrschenden Phenolkomponenten in reifen Erdbeerfrüchten zählen Anthocyane, Flavonoide, Phenylpropanoide und Ellagttannine (Faith *et al.*, 2008; Tulipani *et al.*, 2008; Aaby *et al.*, 2007). Anthocyane bilden die rote Farbe reifer Früchte aus, die als Lockmittel für Frugivoren und somit zur Verbreitung der Samen dient (Willson und Whelan, 1990). Flavonoide schützen die Fruchthaut vor UV-B-Strahlung (Solovchenko und Schmitz-Eiberger, 2003), wobei Flavonole als Co-Pigmente zusätzlich zur Farbgebung und Stabilität der Anthocyane beitragen (Stich *et al.*, 1992). Flavan-3-ole und Proanthocyanidine sind vermutlich aufgrund ihrer antimikrobiellen Wirkung am Schutz und der Stress-Resistenz beteiligt (Panjehkeh *et al.*, 2010; Dixon *et al.*, 2005). Ihre Gehalte nehmen im Laufe der Reifung stetig ab (Halbwirth *et al.*, 2006b) und verhalten sich somit invers zur Ausbreitung von Grauschimmel *Botrytis cinerea*, der trotz früher Infektion der Blüte oder grüner Früchte erst im reifen Fruchtstadium ausbricht, weshalb den Substanzen eine Rolle in der Pathogen-Resistenz zugeschrieben wird (Goetz *et al.*, 1999). Die 1-O-Acyl-Glucoseester von Zimt-, Kaffee- und *p*-Cumarsäure (Phenylpropanoide) können als energiereiche Substrate im Sekundärstoffwechsel der Pflanze z.B. zum Aufbau von Gerüst- und Struktursubstanzen (Lignin) dienen (Vogt, 2010; Lunkenbein *et al.*, 2006). Ellagsäure könnte eine Rolle im Fraßschutz und in der Regulation verschiedener Zellschutzmechanismen zukommen (Maas *et al.*, 1991; Vatterm und Shetty, 2005; Aiyer *et al.*, 2008).

1.2.2. Ernährungsphysiologische Aspekte

Aufgrund ihres ubiquitären Vorkommens in allen Pflanzenteilen sind Polyphenole ein wesentlicher Bestandteil der menschlichen Ernährung. Die Hauptquellen sind frisches Obst und Gemüse, aber auch Getränke, wie Tee und Rotwein (Scalbert und Williamson, 2000). Ihre positive Wirkung auf den Menschen wurde bereits in den 1930er Jahren im Rahmen der Charakterisierung von Ascorbinsäure (Vitamin C) erkannt und als Ascorbinsäure-ähnlich beschrieben. Aufgrund der Beeinflussung der vaskulären Permeabilität wurden sie kurzfristig als Vitamin P bezeichnet (Rusznayk und Szent-Györgyi, 1936). Durch ihre Eigenschaften als Antioxidantien und Radikalfänger können sie Zellen vor oxidativer Schädigung schützen.

In vielen epidemiologischen Studien wird ein sinkendes Risiko für chronische Krankheiten, wie Krebs, Atherosklerose, Herz-/Kreislaufkrankheiten oder Neurodegeneration, mit einer regelmäßigen Aufnahme von Pflanzenphenolen in Verbindung gebracht (Yahia, 2010; Scalbert *et al.*, 2005). Die präventiven Wirkungen pflanzlicher Phenole wurden in zahlreichen *in-vitro*- und Modell-Studien bestätigt, in denen ihnen u.a. die Hemmung bakterieller Replikationsenzyme, die

Hemmung der Proliferation von Tumorzellen, die Induktion der Apoptose in Tumorzellen und die Stimulation von Monozyten/Makrophagen zur Produktion von Cytokinen zugeschrieben wurden (Dou, 2009; Ferrazzano *et al.*, 2011; Sakagami *et al.*, 1999; Ververidis *et al.*, 2007). Ebenso wurde über die antimikrobiellen Effekte der Polyphenole und ihre Fähigkeit bakterielle Toxine zu inaktivieren berichtet, was aufgrund des Potentials zur Bekämpfung Antibiotika-resistenter Pathogene zunehmend von Interesse ist (Friedmann, 2007).

Eine reichhaltige Quelle an Phytochemikalien ist die Erdbeere. Nach zahlreichen Untersuchungen mit einzelnen Inhaltsstoffen der Erdbeerfrucht, werden nun auch vermehrt Studien mit ganzen Früchten durchgeführt. Unter den Früchten besitzt Beerenobst die höchsten Gehalte an Gesamtphenolen und das höchste antioxidative Potential (Wang *et al.*, 1996; Kähkönen *et al.*, 1999). Besonders die Erdbeere (*F. × ananassa*) zeigte gemeinsam mit der schwarzen Himbeere (*Rubus occidentalis* L.) die wirksamste Hemmung von Tumorzellen, vor Brombeere (*Rubus* sp.), Blaubeere (*Vaccinium corymbosum*), roter Himbeere (*Rubus idaeus* L.) und Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) (Seeram *et al.*, 2006). Eine Reihe weiterer positiver Wirkungen, wie die Verminderung von kardiovaskulären Krankheiten und die Verringerung von Neurodegeneration, ließen sich bestätigen (Giampieri *et al.*, 2012; Olsson *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2005).

1.2.3. Ligninbiosynthese

Lignin beschreibt eine Stoffklasse von phenylpropanoiden Polymeren, die durch die Ausbildung von Quervernetzungen entscheidend zur Strukturbildung und mechanischen Beanspruchbarkeit der Pflanze beitragen. Die Gerüstsubstanz wird v.a. beim sekundären Dickenwachstum der Sprossachse in die Zellwand eingelagert, weshalb Lignin in großen Mengen in Baumstämmen gefunden wird. Aufgrund ihrer hydrophoben Wirkung finden die Polymere auch beim Ausbau des Leitungssystems Verwendung (Boudet *et al.*, 1995). In der Erdbeerfrucht sind die Leitbündel und besonders die Nüsschen lignifiziert, während der verdickte Blütenboden vorwiegend durch Pektin, Cellulose und Hemicellulosen stabilisiert wird (Suutarinen *et al.*, 1998; Huber, 1984).

Die Ligninbiosynthese greift auf die gleichen Vorstufen wie der Flavonoidstoffwechsel zu. Ausgehend von *p*-Cumarsäure entsteht ein komplexes, heteropolymeres Netzwerk, bestehend aus hydroxylierten und methoxylierten Phenylpropanoid-Einheiten (**Abb. 5**). Die Bildung der Monolignole (Phenylpropanole) wurde in Erdbeerfrüchten bereits untersucht, dennoch sind nicht alle Einzelschritte eindeutig belegt (Singh *et al.*, 2010). Die Diversität der Substrate spricht für eine hohe Substrattoleranz der beteiligten Enzyme (Dixon *et al.*, 2001).

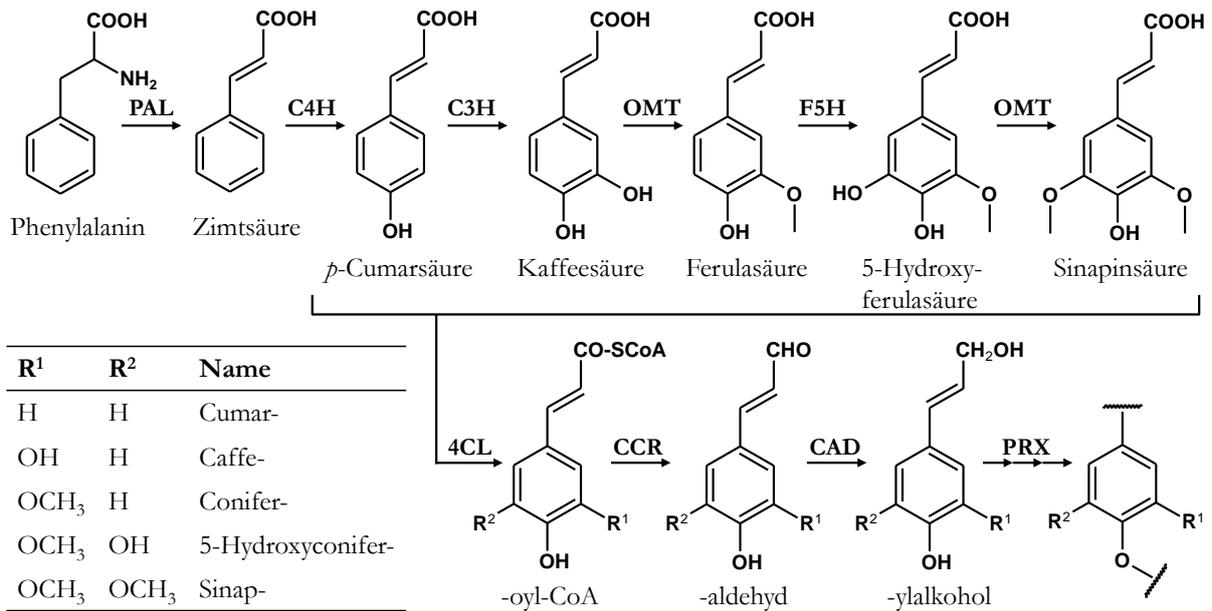


Abb. 5: Schema der Ligninbiosynthese (gekürzt von Dixon *et al.*, 2001). **PAL** Phenylalanin-Ammoniak-Lyase, **C4H** Zimtsäure-4-Hydroxylase, **C3H** *p*-Cumarsäure-3-Hydroxylase, **OMT** *O*-Methyltransferase, **F5H** Ferulasäure-5-Hydroxylase, **4CL** *p*-Cumaroyl-CoA-Ligase, **CCR** Zimtsäure-CoA-Reduktase, **CAD** Zimtalkohol-Dehydrogenase, **PRX** Peroxidase.

Die Expressionen von *CAD* und einer *OMT* aus *F. × ananassa* (*FaOMT*) verlaufen reifekorreliert und besitzen somit ihr Maximum im roten Stadium (Wein *et al.*, 2002; Blanco-Portales *et al.*, 2002), während *CCR* im T-Stadium die höchste Rate aufweist (Salentijn *et al.*, 2003). Phenylpropanoide Substrate fungieren unter Beteiligung von *CAD* auch als Aromavorstufen (Mitchell und Jelekovic, 1995), z.B. von Eugenol, welches im Aromaprofil der Walderdbeere *F. vesca* eine entscheidende Rolle spielt (Ulrich *et al.*, 2007). *FaOMT* katalysiert *o*-diphenolische Strukturen und somit neben der Reaktion von Kaffeesäure zu Ferulasäure auch die Methylierung der Aromakomponente DMHF zu DMMF (Wein *et al.*, 2002). Neben *FaOMT* wird von einer Beteiligung einer putativen Caffeoyl-CoA-*O*-Methyltransferase (*CCOMT*) (Nam *et al.*, 1999) und anderer *OMT*s an der Ligninbiosynthese berichtet (Boerjan *et al.*, 2003). Die Polymerisierungsreaktionen, die zur Ausbildung von Quervernetzungen führen, geschehen wahrscheinlich unter Katalyse von Peroxidasen (Boudet *et al.*, 1995; Ward *et al.*, 2001). Ernährungsphysiologisch wird den Ligninen keine Bedeutung beigemessen, da sie aufgrund von Polymerisierungsgrad und Molekulargröße vom menschlichen Verdauungssystem nicht resorbiert werden (Bravo, 1998).

1.3. Konzepte der Metabolit-Analytik

In der Metabolit-Analytik können im Wesentlichen vier Konzepte unterschieden werden: die zielgerichtete, absolute Quantifizierung spezifischer Metabolite, die semiquantitative und

qualitative Bestimmung einer Gruppe von strukturbekanntem Metaboliten, z.B. aus einem bestimmten Stoffwechselweg (*Metabolite Profiling* oder *Metabolic Profiling*), die Probenklassifizierung ohne ausführliche Identifizierung der Metabolite (*Metabolic Fingerprinting*) und die qualitative und semiquantitative Analyse aller Metabolite (*Metabolomics* oder *untargeted analysis*) (Fiehn, 2001).

Aufgrund der Menge und Vielfalt der Sekundärmetaboliten haben *Metabolomics*-Techniken in den letzten Jahren stark an Bedeutung gewonnen. Dabei wird anhand eines möglichst naturbelassenen Extraktes versucht, die Gesamtheit aller gebildeten, niedermolekularen Verbindungen meist durch den Einsatz von Massenspektrometrie (MS) gekoppelt mit Flüssigkeits- (LC) oder Gaschromatographie (GC) zu erfassen. Aufgrund der Komplexität der Metabolite kann jedoch mit den heutigen Methoden nur jeweils ein Bruchteil der Verbindungen analytisch bestimmt werden. Durch statistische, multivariate Analysen, wie die Hauptkomponentenanalyse (PCA), werden die generierten Daten komprimiert. Um Datenmengen, Zeitaufwand und Interpretationsspielraum zu reduzieren, wird das Konzept des *Metabolite Profiling* verwendet. Hierbei wird der Fokus der Analyse auf eine Metabolitgruppe oder einen Biosyntheseweg gelegt, wobei die chemischen Strukturen der Metabolite bekannt sind. Beim *Metabolic Fingerprinting* kommt meist die Nuklearmagnetische-Resonanz-Spektroskopie (NMR) zum Einsatz, sodass charakteristische „Fingerabdrücke“ der Proben entstehen, während die einzelnen Metabolite nicht identifiziert werden. In allen drei Fällen wird die Analytik v.a. durch die physikalische und chemische Diversität und die großen Konzentrationsunterschiede der Metabolite erschwert (Fiehn *et al.*, 2002).

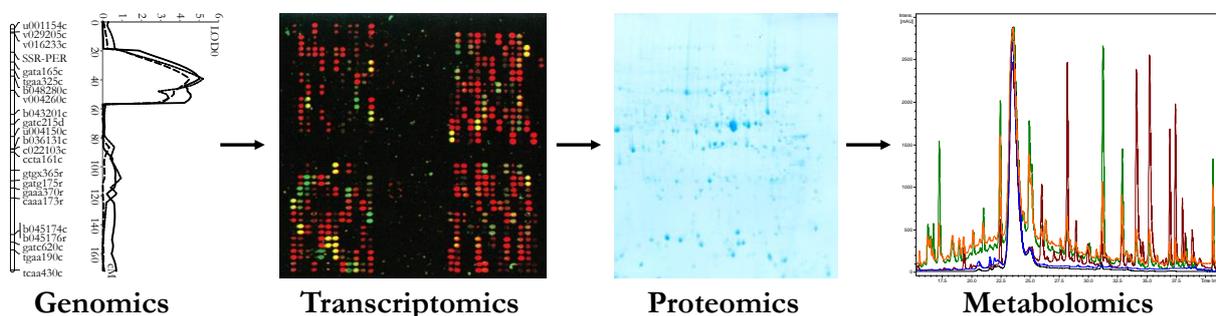


Abb. 6: Die „Omics“-Kaskade beschreibt die Analyse von DNA (Genomics), RNA (Transcriptomics), Proteinen (Proteomics) und Metaboliten (Metabolomics) (nach Dettmer *et al.*, 2007; Bild des Microarrays aus Aharoni *et al.*, 2000).

In der Kaskade der „Omics“-Techniken bedeutet die Einbeziehung des Metaboloms einen entscheidenden Schritt bei der Analyse biologischer Systeme (**Abb. 6**), sowohl bei der Entstehung von Phänotypen, als auch bei der Reaktion auf Einflüsse von Umwelt, Krankheit und

genetischer Variation (Dettmer *et al.*, 2007). Die genetische Funktion wird letztendlich durch die biochemischen Auswirkungen der gebildeten Metabolite bestimmt.

Neben der Aufklärung von Biosynthesewegen und Regulationsmechanismen in pflanzlichen Systemen (Aharoni *et al.*, 2002) finden *Metabolite Profiling*, *Metabolomics* und *Metabolic Fingerprinting* in der humanmedizinischen Diagnostik bereits vielfältig Verwendung (Sreekumar *et al.*, 2009), mit steigendem Interesse auch in der Ernährungswissenschaft oder auf dem noch jungen Gebiet der „personalisierten Medizin“ (Gibney *et al.*, 2005; McNiven *et al.* 2011).

Die zukünftige Herausforderung der „Omics“-Techniken liegt v.a. in der integrativen Kombination aller vier Disziplinen (Genomics, Transcriptomics, Proteomics und Metabolomics), um metabolische Änderungen in biochemischen Synthesewegen über die involvierten Enzyme mit der zugrunde liegenden genetischen Variation konsequent in Verbindung bringen zu können (Fiehn *et al.*, 2002).

1.4. Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war, das Wissen um die genetische Kontrolle und regulatorische Mechanismen bei der Bildung gesundheitsfördernder Inhaltsstoffe in der Erdbeerfrucht zu verbessern.

Die Erdbeere ist die beliebteste weiche Frucht weltweit und stellt eine reichhaltige Quelle an Phytochemikalien dar. Sie wird nicht nur aufgrund ihrer sensorischen Eigenschaften, sondern auch wegen ihres ernährungsphysiologischen Wertes sehr geschätzt. Da in der Entwicklung moderner Sorten vermehrt qualitätsgebende Eigenschaften zugunsten agronomischer Charakteristika, wie Fruchtgröße und Ertrag, reduziert wurden, ist die Verbesserung von Geschmack, Aroma und ernährungsphysiologischem Wert ein wichtiger Faktor für zukünftige Züchtungsprogramme (Rosati, 1993; Zorilla-Fontanesi *et al.*, 2011). Gesundheitsfördernde Inhaltsstoffe, wie die Polyphenole, unterliegen einer komplexen Biosynthese. Während die grundlegenden Züge aufgeklärt sind (Ververidis *et al.*, 2007), mangelt es am Verständnis um die Regulationsmechanismen von Fluss und Akkumulation innerhalb der Biosynthesewege, sowie um die Vernetzung verschiedener Stoffwechselwege.

Anthocyanidin-Reduktase (ANR) und Flavonol-Synthase (FLS) stellen zwei Enzyme der Flavonoidbiosynthese dar. Da bislang noch keine Berichte über die Auswirkungen einer Herabregulation der ANR- bzw. FLS-Expression in Erdbeeren vorliegen, sollten stabil transgene Linien von *F. × ananassa* mit eingeschränkter ANR- bzw. FLS-Expression analysiert werden. Durch die Bestimmung der Sekundärmetabolite, deren Gehalte durch die Herabregulation beeinflusst wurden, sollten die Funktionen der beiden Enzyme umfassend beleuchtet werden.

Ebenso sollte die Bedeutung des R2R3-Transkriptionsfaktors *FaMYB10* für die Anthocyanbiosynthese näher untersucht werden. Dazu sollten Erdbeerfrüchte mit transient herabregulierter *FaMYB10*-Expression analysiert werden.

Den Schwerpunkt der Arbeit bildeten *Metabolite Profiling*-Studien, die im Rahmen des trilateralen Projekts „FraGenomics: Genetische Genomik zur Verbesserung der ernährungsphysiologischen Qualität der Erdbeerfrucht“ durchgeführt wurden. Dazu wurde das Untersuchungsmaterial in drei Teile geteilt und den verschiedenen Kooperationspartnern zur Analyse von Genom (INRA, Villenave d'Ornon, Frankreich und IRTA, Barcelona, Spanien), Transkriptom (Universidad de Córdoba, Spanien) und Metabolom (TU München) zur Verfügung gestellt. Durch Korrelation metabolomischer, transkriptomischer und genomischer Erhebungen sollten neue Regulationsmechanismen der Polyphenolbiosynthese aufgeklärt werden. Ein ähnlicher Ansatz zeigte bereits das Potential derartiger komparativer Studien auf und dass Polyploidie dabei kein Hindernis darstellt. So führten Microarray-Analysen unreifer und reifer Früchte von *F. × ananassa* zur Identifizierung einer an der Aromabiogenese beteiligten Alkohol-Acyltransferase (Aharoni *et al.*, 2000).

Anhand von Metabolit-Analysen verschiedener Sorten und Kreuzungspopulationen von *F. × ananassa* wurden in der vorliegenden Arbeit bestimmte Genotypen ausgewählt, die zu weiterführenden Transkriptom- und Genom-Analysen eingesetzt wurden, um Gene aufzudecken, deren Expression mit abweichender Polyphenolkomposition korrelierte. Da das Aroma von Erdbeerfrüchten ein wichtiger qualitätsgebender Bestandteil ist und bei der Züchtung nicht vernachlässigt werden darf, wurden bei der Erstellung der Metabolit-Profile auch Aromakomponenten miteinbezogen.

Die Kombination aus *Metabolite Profiling* und *Transcriptomics* deckte ein Peroxidase-Gen auf, welches an der Ligninbiosynthese beteiligt ist und die höchsten Expressionsunterschiede zwischen polyphenolreichen und –armen Früchten aufwies. Zusätzlich konnten QTLs (*quantitative trait loci*) für Farbe und Gesamtpolyphenolgehalt in der Region des Peroxidase-Gens lokalisiert werden. Die Ergebnisse geben Aufschluss über die Verknüpfungsmechanismen von Lignin- und Flavonoidbiosynthese und helfen zukünftige Züchtungsprogramme zu optimieren.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Pflanzliches Material

2.1.1.1. Erdbeerfrüchte verschiedener Sorten und Kreuzungspopulationen

Früchte der Kulturerdbeere *F. × ananassa* wurden im roten, reifen Stadium geerntet, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Das Probenmaterial wurde anschließend von den Kooperationspartnern Prof. Dr. Juan Muñoz-Blanco (Universidad de Córdoba, Spanien) und Aurelie Petit (Ciref, Villenave d'Ornon, Frankreich) auf Trockeneis verschickt. Insgesamt wurden 520 Proben entgegen genommen und analysiert (**Tab. 3**).

Tab. 3: Anzahl der bezogenen Erdbeerproben pro Erntejahr und Land.

Herkunft	Erntejahr			Art der Proben
	2009	2010	2011	
Spanien	48	-	-	Sorten
	-	62	-	Individuen einer F2-Population
Frankreich	-	29	33	Sorten
	94	80	174	Individuen einer F1-Population

Die pseudo F1-Population der französischen Züchtungsfirma Ciref entstand durch Kreuzung der Sorten Capitola (CA75.121-101 × Parker, University of California, Davis, CA, USA) und CF1116 ([Pájaro × (Earlyglow × Chandler)], Ciref). Die beiden Eltern wurden ausgewählt, da sie die genetische Information einiger analysierter Merkmale, wie Fruchtfarbe, auf verschiedenen Allelen besitzen. Zudem wurden die Früchte von CF1116 in einer humansensorischen Studie aufgrund von Aroma, Süße und geringerer Säure klar gegenüber Capitola bevorzugt (Moing *et al.*, 2001). Die Nachkommen wurden über drei Jahre hinweg in Douville unter Plastiktunneln (0,7 m hoch und 0,8 m breit) kultiviert. Nicht alle der insgesamt 220 Individuen produzierten jährlich ausreichend Früchte, woraus die jährlich schwankenden Mengen resultierten. Die spanische F2-Segregationspopulation ging aus der Kreuzung von Dover × Camarosa hervor. Einen Überblick über die analysierten kommerziellen und nicht-kommerziellen Sorten gibt **Tab. 4**.

Tab. 4: Auflistung der analysierten Sorten. Fett gedruckt sind die Sorten, die zur Transkriptom-Analyse mittels Microarray (s. 3.6, S. 92 und **Abb. 9**, S. 64) verwendet wurden.

Herkunft: Spanien					
Nummer	Sorte	Nummer	Sorte	Nummer	Sorte
KBBE-1	Candonga	KBBE-17	92-38	KBBE-34	Parker
KBBE-2	Chiflón	KBBE-18	06-211	KBBE-35	Pájaro
KBBE-3	Ventana	KBBE-19	02-94	KBBE-36	Douglas
KBBE-4	Festival	KBBE-20	00-031	KBBE-37	Chandler
KBBE-5	Carmela	KBBE-21	Sweet Charlie	KBBE-38	Camarosa
KBBE-6	Macarena	KBBE-22	03-93	KBBE-39	Dover
KBBE-7	86-061	KBBE-23	Sabrina	KBBE-40	F1 (DxC)
KBBE-8	92-044	KBBE-24	70-07	KBBE-41	Selva
KBBE-9	89-14	KBBE-25	Selva AF	KBBE-42	Gariguette
KBBE-10	02-116	KBBE-26	98-75	KBBE-43	86-03
KBBE-11	01-63	KBBE-27	Cristal	KBBE-44	06-10
KBBE-12	97-88	KBBE-29	Tudla	KBBE-45	05-05
KBBE-13	97-102	KBBE-30	Camarosa	KBBE-46	05-100
KBBE-14	98-31	KBBE-31	Cartuno	KBBE-47	09-29
KBBE-15	97-81	KBBE-32	Oso grande	KBBE-49	Darlisette
KBBE-16	02-125	KBBE-33	Plasirfre	KBBE-50	Diana
Herkunft: Frankreich					
Nummer	Sorte	Nummer	Sorte	Nummer	Sorte
X00	Betty	X11	Charlotte	X22	Dover
X01	CF1116	X12	Ciflorette	X23	Elsanta
X02	CF1116_2	X13	Cigaline	X24	Mara des Bois
X03	CF2440	X14	Cigoulette	X25	Orléans
X04	CF3107	X15	Cijousée	X26	Pájaro
X05	CF3149	X16	Ciloé	X27	Saint Joseph
X06	CF3453	X17	CIR705	X28	Sweet Charlie
X07	CF4128	X18	Cirafine	X29	CF4402
X08	Camarosa	X19	Cirano	X30	Gariguette
X09	Candiss	X20	Cireine		
X10	Capitola	X21	DarSelect		

2.1.1.2. Transgene Pflanzen

Zur Charakterisierung zweier Enzyme des Flavonoidstoffwechsels wurden stabil transgene Linien der Kulturerdbeere *F. × ananassa* cv. Senga Sengana mit herabregulierter Anthocyanidin-Reduktase (*ANR*)- bzw. Flavonol-Synthase (*FLS*)-Expression erzeugt.

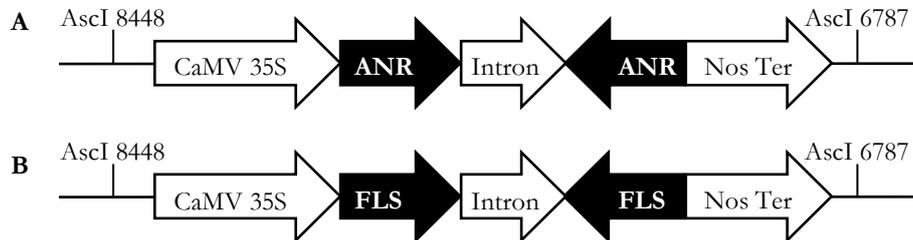


Abb. 7: Ausschnitte aus den pBI-Vektoren zur Herabregulation der Anthocyanidin-Reduktase (*ANR*; **A**) und der Flavonol-Synthase (*FLS*; **B**). **AscI** Restriktionsschnittstellen, **CaMV 35S** *cauliflower mosaic virus* 35S Promotor, **Nos Ter** Nopalin-Synthase Terminator.

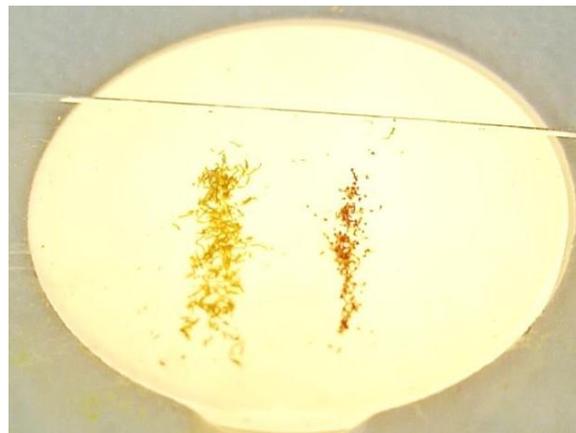
Die *hairpin*-Konstrukte (**Abb. 7**) zur Herabregulation der Gene mittels RNA-Interferenz wurden von Dr. Thomas Hoffmann entworfen (TU München). Sie enthalten einen *sense* und einen *antisense* Strang des jeweiligen Gens, die durch ein Intron voneinander getrennt sind. Bei der Expression entsteht ein haarnadelförmiger (*hairpin*) Doppelstrang, der die korrekte Expression des nativen Gens durch induzierte RNA-Interferenz verhindert (Hoffmann *et al.*, 2006). Die Transformation und Regeneration der Erdbeerpflanzen wurde von Dr. Henryk Flachowsky (JKI Dresden) durchgeführt (Flachowsky *et al.*, 2010).

Untersucht wurden zwei Kontrollpflanzen (K-3 und K-4), fünf si-*ANR*-Linien und drei si-*FLS*-Linien. Jede Linie stand für ein unabhängiges Transformationsexperiment und umfasste ein bis drei Pflanzen (**Tab. 5**). Früchte einer dritten Kontrollpflanze (K-5) und einer si-*ANR*-Pflanze der Linie 17 (F17-4) wurden von Prof. Dr. Thilo Fischer (LMU München) zur Analyse nachgereicht. Die Pflanzen wurden im zweiten Jahr in einem Gewächshaus (GHL Dürnast, TUM) kultiviert. Früchte wurden in folgenden Stadien der Fruchtreifung analysiert: klein Grün (G1), groß Grün (G2), Weiß (W), teilweise Rot (T) und Rot (R). Außerdem wurden neben dem Wachstum der Pflanzen auch Blüten, Blätter und Wurzeln untersucht. Zur Abnahme der Wurzeln wurden die Pflanzen ausgetopft und die äußeren Wurzeln mit einer Schere abgeschnitten, wobei darauf geachtet wurde nur junge Wurzeln zu entnehmen. Das Material wurde anschließend über einem Sieb gewaschen, getrocknet und bis zur Analyse bei -20 °C gelagert. Junge Blätter wurden abgetrennt und bei -20 °C gelagert.

Tab. 5: Untersuchte Linien von *F. × ananassa* cv. Senga Sengana.

Untersuchte Linien					
Wildtyp	K-3				
	K-4				
	K-5 (LMU)				
si- <i>ANR</i>	F14-3	F15-3	F17-4 (LMU)	F21-3	F22-3
	F14-4	F15-4	F17-5	F21-4	F22-4
	F14-5	F15-5		F21-5	F22-5
si- <i>FLS</i>	F25-3	F26-3	F29-3		
	F25-4	F26-5	F29-4		
	F25-5				

Blüten wurden mit einem Skalpell unter einem Binokular in Kronblätter, Griffel und Narben getrennt (**Abb. 8**) und einzeln analysiert. Wurzeln, Blätter und Kronblätter wurden vor der Analyse mit flüssigem Stickstoff gemörsert.

**Abb. 8:** Trennung der Fruchtblätter einer si-*ANR*-Blüte in Griffel (links) und Narben (rechts).

FaMYB10-RNAi-Früchte

Um die Rolle des Transkriptionsfaktor FaMYB10 in der Polyphenolbiosynthese zu untersuchen, stellte der Kooperationspartner Juan Muñoz-Blanco (Universität Córdoba, Spanien) reife Erdbeerfrüchte mit transient herabregulierter *FaMYB10*-Expression zur Verfügung. Die Herabregulation erfolgte durch Infiltration der reifenden Erdbeerfrüchte im W-Stadium mit Agrobakterien (*Agrobacterium tumefaciens*), die ein *FaMYB10*-RNAi-Konstrukt enthielten. Zur Kontrolle dienten Früchte, denen nicht transformierte Agrobakterien injiziert wurden. Vor der LC-MSⁿ-Analyse wurden den reifen Erdbeerfrüchten die Nüsschen entfernt.

2.1.2. Chemikalien

Sofern nicht anders in **Tab. 6** angegeben, entsprachen alle Chemikalien p.A. Qualität.

Tab. 6: Chemikalien.

Chemikalie	Hersteller
Aceton	Carl Roth, Karlsruhe
Acetonitril (für die HPLC bzw. LC-MS)	J.T. Baker, Griesheim
Acrylamid/Bisacrylamid 29:1 (AccuGel 29:1®)	National diagnostics, Atlanta, GA, USA
Agar	Molekula, Manchester, UK
Agarose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Amberlite XAD-2®	Supelco, Bellefonte, PA, USA
Ameisensäure ≥ 98 %	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumacetat	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumcarbonat reinst	Riedel-de Haën, Seelze
Ammoniumformiat	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat ≥ 98 % (APS)	Applichem, Darmstadt
Ammoniumsulfat	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Carl Roth, Karlsruhe
Benzylmercaptan	Sigma-Aldrich, Steinheim
Biochanin A	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Chloroform/Isoamylalkohol (24:1), ges. mit DEPC-Wasser	Carl Roth, Karlsruhe
3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat Hydrat ≥ 98 % (CHAPS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Coomassie Brilliant Blue G250	Fluka, Buchs
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Carl Roth, Karlsruhe
Dikaliumhydrogenphosphat wasserfrei	Carl Roth, Karlsruhe
1,2-Dimethoxyethan ≥ 99 %	Sigma-Aldrich, Steinheim
2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3[2H]-furanon (DMHF)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dinatriumhydrogenphosphat ≥ 98 %	Carl Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth, Karlsruhe
Ellagsäure ≥ 95 %	Sigma-Aldrich, Steinheim
Eriodictyol ≥ 99 %	Carl Roth, Karlsruhe

Chemikalie	Hersteller
Eriodictyol-7-glucosid ≥ 99 %	Carl Roth, Karlsruhe
Essigsäure 100 %	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol	J.T. Baker, Griesheim
Ethylendiamintetraacetat Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA)	Carl Roth, Karlsruhe
D-Glucose wasserfrei	Carl Roth, Karlsruhe
Glycerin ≥ 99 %	Carl Roth, Karlsruhe
Glycin ≥ 99 %	Carl Roth, Karlsruhe
Harnstoff	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt pulv., für die Bakteriologie	Carl Roth, Karlsruhe
Helium 5.0	Westfalengas, Münster
4-Hydroxy-5-methyl-3[2H]-furanon (HMF)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Iodacetamid (IAA)	Merck, Darmstadt
Isopropyl- β -D-thiogalactosid (IPTG)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat $\geq 99,5$ %	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumhydroxid	Carl Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Carl Roth, Karlsruhe
Lignin, hydrolytisch	Sigma-Aldrich, Steinheim
Lithiumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat Heptahydrat	Merck, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Methanol (für die HPLC bzw. LC-MS)	J.T. Baker, Griesheim
Methanol-d ₄ (deutertiert)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol-d ₄ (deutertiert) inkl. 0,03 % (v/v) TMS	Sigma-Aldrich, Steinheim
2-Methylbuttersäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
3-Methylbuttersäure ≥ 99 %	Sigma-Aldrich, Steinheim
4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid	Carl Roth, Karlsruhe
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)	Carl Roth, Karlsruhe
<i>Murashige and Skoog</i> (MS) Salzmischung	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	Fluka, Buchs

Chemikalie	Hersteller
Natriumchlorid ≥ 95 %	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat ≥ 98 %	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS) ≥ 99 %	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Hanns Nierle, Freising
Natriumthiosulfat	Fluka, Buchs
Orange G	Fluka, Buchs
Pelargonidin-3-O-glucosid-chlorid ≥ 94 % (Callistephinchlorid)	Carl Roth, Karlsruhe
Pepton aus Casein	Carl Roth, Karlsruhe
Phenol pH 8,0	Carl Roth, Karlsruhe
Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1)	Carl Roth, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Carl Roth, Karlsruhe
<i>o</i> -Phosphorsäure (85 %)	Merck, Darmstadt
Polyvinylpyrrolidon (PVPP) für Proteinextraktion	Sigma-Aldrich, Steinheim
Polyvinylpyrrolidon (PVP 40) für RNA-Extraktion	Sigma-Aldrich, Steinheim
Saccharose	Carl Roth, Karlsruhe
Salzsäure ≥ 32 %	Carl Roth, Karlsruhe
Seesand (gewaschen und geglüht)	Riedel de Haën, Taufkirchen
Spectinomycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Stickstoff, flüssig	Linde, München
Streptomycin	Carl Roth, Karlsruhe
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) ≥ 99 %	Applichem, Darmstadt
Thioglykolsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Trichloressigsäure	Fluka, Buchs
Triethanolamin ≥ 99 %	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) $\geq 99,5$ %	Carl Roth, Karlsruhe
Trypton aus Casein	Carl Roth, Karlsruhe
Wasser (für die LC-MS)	J.T. Baker, Griesheim

2.1.3. Medien

LB-Medium	10 g/L Trypton 5 g/L Hefeextrakt 10 g/L Natriumchlorid pH 7,0
LB-Agar	LB-Medium 1,5 % Agar
SOC-Medium	20 g/L Trypton 5 g/L Hefeextrakt 0,5 g/L Natriumchlorid 2,5 mM Kaliumchlorid 1 mM Magnesiumchlorid 2 mM Glucose (separat steril filtriert 0,22 µm)
YEB-Medium	5 g/L Rinderextrakt 1 g/L Hefeextrakt 1 g/L Pepton 5 g/L Saccharose 2 mM Magnesiumchlorid
MMA-Medium (mod.)	10 mM MES 4,3 g/L MS-Salze 20 g/L Saccharose pH 5,6
YPD-Medium	20 g/L Pepton 10 g/L Hefeextrakt 20 g/L Glucose pH 7,0
YPD-Agar (1 mg/L Ampicillin)	YPD-Medium 20 g/L Agar 1 mg/L Ampicillin

KB-Medium 20 g/L Pepton
 10 mL/L Glycerin
 1,5 g/L Kaliumhydrogenphosphat
 1,5 g/L Magnesiumsulfat
 pH 7,0

KB-Agar KB-Medium
 15 g/L Agar

2.1.4. Puffer

Natriumphosphatpuffer 68,4 mL 1 M Dinatriumhydrogenphosphat
 (0,1 M; pH 7,2) 31,6 mL 1 M Natriumdihydrogenphosphat
 ad 1 L mit dest. Wasser
 pH 7,2 eingestellt

TE-Puffer 10 mM Tris/HCl pH 7,5
 1 mM EDTA

1x TAE-Puffer 40 mM Tris
 20 mM Essigsäure
 1 mM EDTA

TFB-Puffer I 30 mM Kaliumacetat
 10 mM Calciumchlorid
 50 mM Mangan-(II)-chlorid
 100 mM Rubidiumchlorid
 15 % Glycerin
 pH 5,8 (mit 1 M Essigsäure eingestellt)
 steril filtriert

TFB-Puffer II 100 mM MOPS
 75 mM Calciumchlorid
 10 mM Rubidiumchlorid
 15 % Glycerin
 pH 6,5 (mit 1 M Kaliumhydroxidlösung eingestellt)
 steril filtriert

10x DNA-Ladepuffer	0,21 % Orange G 0,1 M EDTA 50 % Glycerin pH 8,0
RNA-Extraktionspuffer	3 % CTAB 3 % PVP 40 25 mM EDTA 2 M Natriumchlorid 100 mM Tris/HCl (pH 8,0) 4 % β -Mercaptoethanol* *direkt vor der Benutzung zugegeben
Proteinextraktionspuffer	1 % (w/v) PVPP 0,7 M Saccharose 0,1 M Kaliumchlorid 0,5 M Tris/HCl (pH 7,5) 50 mM EDTA (pH 8,0) 1 mM PMSF* 2 % (v/v) Mercaptoethanol* *direkt vor der Benutzung zugegeben
IEF-Puffer	9 M Harnstoff 4 % (w/v) CHAPS 0,002 % Bromphenolblau 30 mM DTT* 2 % Bio-Lyte [®] 3/10 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)** *direkt vor dem Resuspendieren der Probe zugegeben **direkt vor Rehydrierung zugegeben
Ladepuffer für 1D-SDS-Gele (6x Laemmli Puffer)	350 mM Tris/HCl (pH 6,8) 36 % Glycerin 10 % (w/v) SDS 5 % Mercaptoethanol 0,012 % Bromphenolblau

Equilibrierungspuffer I 6 M Harnstoff
30 % Glycerin
2 % SDS
50 mM Tris/HCl (pH 8,8)
0,002 % Bromphenolblau
1 % DTT*
*direkt vor der Benutzung zugegeben

Equilibrierungspuffer II 6 M Harnstoff
30 % Glycerin
2 % SDS
50 mM Tris/HCl (pH 8,8)
0,002 % Bromphenolblau
2,5 % Iodacetamid*
*direkt vor der Benutzung zugegeben

SDS-Gelpuffer (10 %) 0,375 M Tris/HCl (pH 8,8)
10 % Acrylamid (Acrylamid/Bisacrylamid 29:1)
1 % SDS
0,75 % APS
0,05 % TEMED

10x SDS-Laufpuffer 250 mM Tris
1,92 M Glycin
1 % SDS

2.1.5. Sonstige Lösungen

Interner Standard für 50 mg Biochanin A in 250 mL Methanol (LC-MS-Qualität) gelöst
Polyphenolanalytik (c = 0,2 mg/mL). Zugabe von 250 μ L $\hat{=}$ 50 μ g IS pro Ansatz.

Interner Standard für 125 mg Norfuranol in 2 mL Methanol (LC-MS-Qualität) gelöst und
DMHF-Analytik mit Wasser (LC-MS-Qualität) auf 25 mL aufgefüllt (c = 5,0 mg/mL).
Zugabe von 40 μ L $\hat{=}$ 200 μ g IS pro Ansatz.

Interner Standard für SPME-GC/MS	1:10000-Verdünnung von 1,2-Dimethoxyethan in dest. Wasser (c = 0,965 mmol/L = 86,97 mg/L). Zugabe von 50 µL $\hat{=}$ 4,35 µg IS pro Ansatz.
DEPC-Wasser	0,5 % (v/v) Diethylpyrocarbonat in Milli-Q-Wasser über Nacht gerührt und anschließend autoklaviert
CI	Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)

Lösungen für die 2D-Gelelektrophorese:

Agaroselösung zum Überschichten der 2D-Gele	0,5 % (w/v) Agarose 0,002 % Bromphenolblau ad 100 mL mit 1x SDS-Laufpuffer
Fixierlösung	40 % Ethanol 10 % Essigsäure
Färbelösung	<ol style="list-style-type: none"> 1) Coomassie Brilliant Blue Vorratslösung 5 % (w/v) Coomassie Brillant Blue G-250 2) Kolloidale Coomassie Vorratsfärbelösung 20 % Coomassie Brilliant Blue Vorratslösung 10 % Ammoniumsulfat 1,2 % Phosphorsäure (85 %) 3) <u>Kolloidale Coomassie Färbelösung (Endkonz. 0,8 % Coomassie)*</u> 80 % Kolloidale Coomassie Vorratsfärbelösung 20 % Methanol <p>*direkt vor Benutzung anmischen</p>
Entfärbelösung	25 % Methanol
Aufbewahrungslösung	2 % Essigsäure

2.1.6. Bakterienstämme

Escherichia Coli (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)
NEB10-beta

Escherichia Coli Chloramphenicol-Resistenz 34 mg/L (Novagen, Merck, Darmstadt)
Rosetta(DE3)pLysS

Agrobacterium tumefaciens Rifampicin-Resistenz 50 mg/L (Lazo *et al.*, 1991)
AgL0

2.1.7. Vektoren

pGEM-T Easy Ampicillin-Resistenz 100 mg/L (Promega, Madison, WI, USA)
pGEX 4T1 Ampicillin-Resistenz 50 mg/L (GE healthcare, Chalfont St. Giles, UK)
p9U10-RNAi Spectinomycin-Resistenz 50 mg/L (DNA Cloning, Hamburg)
pBI121 Kanamycin-Resistenz 15 mg/L (Jefferson, 1987)

2.1.8. Enzyme

DNA-Polymerasen *Taq* DNA Polymerase (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)
Phusion DNA Polymerase (Finnzymes, Espoo, Finnland)

Reverse Transkriptasen Superscript III (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
M-MLV (Promega, Madison, WI, USA)

Restriktionsenzyme HindIII (FastDigest, Fermentas, St. Leon-Rot)
BamHI (FastDigest, Fermentas)

Sonstige Enzyme T4 DNA Ligase (Promega)
Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIP) (New England Biolabs)
DNase I (Sigma-Aldrich, Steinheim)

2.1.9. Primer

Interspacer_f 5' ACCGTTGATTCGCACAATTGGTCATCG 3'
Interspacer_r 5' TACTGCGGGTCGGCAATCGGACG 3'

FaPRX27q_f	5' ATTTCCATGATTGCTTTGTCA 3'
FaPRX27q_r	5' CAACGGCTAAGATGTCAGAAC 3'
for_19544	5' ATGGCTGCTACTTCAA 3'
rev_19544	5' CTAATTGATCTTGCTGC 3'
FVescaCL1103C1_fq	5' AGGGTCCAAATCCGATCAGTCCCA 3'
FVescaCL1103C1_rq	5' GGCACGCCATTGATGACCCTGTTA 3'

2.1.10. Kommerzielle Kits

Folgende kommerzielle Kits wurden gemäß den Herstellerangaben verwendet:

- Modifizierte Bradford-Lösung zur Quantifizierung von Proteinen:
Modified Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)
- Isolierung von DNA:
Wizard[®] Plus SV Miniprep DNA Purification System (Promega, Madison, WI, USA)
- Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen:
Nucleo Spin[®] Extract II (Macherey-Nagel, Düren)

2.1.11. Sonstige Materialien

- 96-well Mikrotiterplatten zur qPCR (Applied Biosystems, Darmstadt)
- DNA-Marker für Agarosegele:
Gene Ruler DNA Ladder Mix (Fermentas, ThermoScientific, Waltham, MA, USA)
- Protein-Marker für 2D-Gele:
Precision Plus Protein Standards Kaleidoscope (Bio-Rad Laboratories)
- Ampholytengemisch für isoelektrische Fokussierung der Proteine (pH 3-10):
Bio-Lyte[®] 3/10 Ampholyte (Bio-Rad Laboratories)
- Gelstreifen für isoelektrische Fokussierung der Proteine:
ReadyStrip IPG pH 3-10 linear 17 cm (Bio-Rad Laboratories)
- Mineralöl zum Überschichten der Gelstreifen während Rehydrierung:
Mineral Oil (Bio-Rad Laboratories)

2.2. Geräte

2.2.1. Flüssigkeitschromatographie-Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie (LC-ESI-MSⁿ)

2.2.1.1. LC-ESI-MSⁿ: Analytisches System

HPLC-System	Agilent 1100 Series (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA)
Pumpe	Quaternäre Pumpe G1311A (Agilent)
Injektor	Sample Injector G1313A (Agilent)
Injektionsvolumen	5 µL
Trennsäule	Luna 3u C18(2) 100Å, 150 x 2 mm (Phenomenex, Aschaffenburg)
Vorsäule	Security Guard Cartridges C18 4 x 2 mm (Phenomenex)
Säulentemperatur	25 °C
Fließmittel	A: Wasser mit 0,1 % Ameisensäure B: Methanol mit 0,1 % Ameisensäure
Flussrate	0,2 mL/min
Gradient	0 - 50 % B in 30 min 50 - 100 % B in 5 min 100 % B für 15 min 100 - 0 % B in 5 min 0 % B für 10 min Laufzeit: 65 min
UV-Detektor	Variable Wavelength Detector G1314A (Agilent) Wellenlänge: 280 nm
DAD	Diodenarray Detektor G1315B (Agilent) Wellenlängen: 210, 280, 360, 520 und 570 nm Kontinuierliche Spektrenaufnahme von 190-600 nm
MS	Bruker Daltonics esquire 3000 ^{plus} Ionenfalle (Bruker Daltonics, Bremen)
Spraygas	Stickstoff (30,0 psi)
Trockengas	Stickstoff (330 °C, 9 L/min)
Auflösung	13000 $m/z/s$
Scanbereich	m/z 100 - 800

Polarität	positiv/negativ alternierend
ICC Target	20000 (positiv) bzw. 10000 (negativ)
Max.	200 ms
Akkumulationszeit	
Zielmasse (SPS)	m/z 400 (<i>smart parameter setting</i>)
Kapillarenspannung	\pm 4000 V
Endplattenspannung	\pm 3500 V (festgesetzt auf 500 V unter Kapillarenspannung)
MS/MS	Auto-tandem MS ²
Kollisionsgas	Helium 5.0 (4,21 x 10 ⁶ mbar)
Kollisionsspannung	1,0 V

Einstellungen Ionenfalle :

Skimmer	\pm 40,0 V
Cap Exit	\pm 121 V
Oct 1 DC	\pm 12,0 V
Oct 2 DC	\pm 1,7 V
Trap Drive	45,6
Oct RF	112,2 V _{pp}
Lens 1	\mp 5,0 V
Lens 2	\mp 60,0 V

Datenaufnahme Esquire 5.1 inkl. HP Chemstation A.09.03 (Bruker Daltonics)

2.2.1.2. LC-ESI-MSⁿ: Präparatives, biokompatibles System

HPLC-System	Jasco LC-2000plus Series (Jasco, Groß-Umstadt)
Pumpen	2x präparative Pumpe PU-2087plus (Jasco)
Manueller Injektor	Vier-Wege-Ventil 7725i (Rheodyne, Rohnert Park, CA, USA), Probenschleife 1 mL (Jasco)
Autoinjektor	Ansaugventil MTV-3-N1 (Takasago Electric, Nagoya, Japan), 20 mL Spritze
Mischkammer	Dynamic mixing chamber MIKA1000 (Portmann Instruments, Biel- Benken, Schweiz)
Trennsäule (Umkehrphase)	Synergi Fusion-RP 80Å, 4u, 250 x 15 mm (Phenomenex, Aschaffenburg)

Trennsäule (Normalphase)	SeQuant ZIC [®] -HILIC 200Å, 5u, 250 x 10 mm (Merck, Darmstadt)
Vorsäule	Security Guard Cartridges C18 (Phenomenex)
Säulentemperatur	25°C
Fließmittel	A: Wasser mit 0,1 % Ameisensäure B: Methanol mit 0,1 % Ameisensäure C: Acetonitril D: 5 mM Ammoniumformiat in Wasser
Flussrate	9,75 mL/min (RP) bzw. 4,75 mL/min (NP)
Gradient	s. 2.3.1.5 , S. 41
UV-Detektor	UV/VIS-Detektor UV-2075plus (Jasco) Wellenlänge: 280 nm
Fraktionssammler	Advantec CHF-122SC (Toyo Seisakusho Kaisha, Tokyo, Japan)
MS	Agilent LC-MSD Trap (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA)
Spraygas	Stickstoff (30,0 psi)
Trockengas	Stickstoff (330°C, 9 L/min)
Auflösung	26000 $m/z/s$
Scanbereich	m/z 50 - 800
Polarität	positiv/negativ alternierend
ICC Target	500000 (positiv) bzw. 300000 (negativ)
Max. Akkumulationszeit	200 ms
Zielmasse (SPS)	m/z 400
Kapillarenspannung	± 4000 V
Endplattenspannung	± 3500 V (festgesetzt auf 500 V unter Kapillarenspannung)
MS/MS	Auto-tandem MS ²
Kollisionsgas	Helium 5.0 (4,21 x 10 ⁶ mbar)
Kollisionsspannung	1,25 V
Einstellungen Ionenfalle :	
Skimmer	± 40,0 V
Cap Exit	± 121 V
Oct 1 DC	± 12,0 V
Oct 2 DC	± 1,7 V

Trap Drive	49,8
Oct RF	171,0 V _{pp}
Lens 1	± 5,0 V
Lens 2	± 60,0 V
Datenaufnahme	ChromPass 1.9.302.1124 (Jasco) FraColl 3.0.1 (Toyo Seisakusho Kaisha) 6300 series Trap Control 6.2 (Agilent)

2.2.2. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC/UV)

HPLC-System	Analytische HPLC Maxi-Star (Knauer, Berlin)
Pumpe	Maxi-Star K1000 (Knauer)
Injektor	Manuelles Vier-Wege-Ventil 7725i (Rheodyne, Rohnert Park, CA, USA), Probenschleife 450 µL (Knauer)
Injektionsvolumen	20-50 µL
Trennsäule	Grom-Sil 100Å ODS-1 PE, 5µ, 250 x 4 mm (Grom Analytik, Rottenburg)
Vorsäule	Security Guard Cartridges C18 4 x 2 mm (Phenomenex, Aschaffenburg)
Fließmittel	A: Wasser mit 0,1 % Ameisensäure B: Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure
Flussrate	1 mL/min
Gradient	siehe 2.3.1.5
UV-Detektor	Variable Wavelength Detector 29815 (Knauer) Wellenlänge: 288 nm
Datenaufnahme	EuroChrom2000 (Knauer)

2.2.3. Festphasen-Mikroextraktion-Gaschromatographie-Massenpektrometrie (SPME-GC/MS)

GC	Agilent 7890A (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)
Autosampler	CTC CombiPAL ausgerüstet mit SPME-Vorrichtung und Agitator (CTC Analytics, Zwingen, Schweiz)
SPME-Phase	75 µm corboxen/polydimethylsiloxane (CAR/PDMS) (Supelco, Bellefonte, PA, USA)

Autosampler-Zyklus	Inkubationstemperatur: 30 °C Vial-Eindringtiefe: 22 mm Extraktionszeit: 30 min Schüttelgeschwindigkeit: 250 rpm Desorption: GC-Injektor Injektor-Eindringtiefe: 54 mm Desorptionszeit: 10 min
Injektor	<i>Split/Splitless</i> -Injektor Temperatur: 250 °C
Injektion	<i>Splitless</i> Injektion für 6 min
Temperaturen GC	Injektor: 250 °C <i>Transferline</i> : 250 °C
Kapillarsäule	ZB-Wax 60 m x 0,25 mm (ID); 0,25 µm (FD) (Zebron, Phenomenex, Aschaffenburg)
Trägergas	Helium 5.0 konstanter Fluss von 1,03 mL/min
Temperaturprogramm	30 °C (15 min isotherm) 3 °C/min bis 50 °C 4 °C/min bis 110 °C 5 °C/min bis 150 °C 10 °C/min bis 250 °C 250 °C (10 min isotherm) Laufzeit: 64,67 min
MSD	Agilent 5975C
Ionisation	Elektronenstoßionisation (EI positiv), 70 eV
Temperaturen MSD	MS Ionenquelle: 230 °C MS Quadrupol: 150 °C
Photomultiplier	1212 V
Scanbereich	m/z 29 - 400
Scanrate	9,93 scans/s
Datenaufnahme und Datenauswertung	MSD ChemStation E.02.00.493 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) NIST MS Search 2.0 (FairCom, Columbia, MO, USA)

2.2.4. Nuklearmagnetische Resonanz-Spektroskopie (NMR)

NMR-Gerät	Avance III 500 (Bruker Daltonics, Bremen)
Mess-Temperatur	27 °C
Frequenz ¹ H-NMR	500 MHz
Frequenz ¹³ C-NMR	125 MHz

2.2.5. Sonstige Geräte

Autoklav	Zirbus LVSA 50/70 (Zirbus Technology, Bad Grund) Systec V 95 (Systec, Wetzlar)
Binokular-Mikroskop	No. 78/372 (Will Strübin, Wetzlar)
Densitometrischer Scanner (2D-Gele)	GS-800 Densitometer mit PDQuest 7.2 Software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)
Dispergierer	Ultra-Turrax® T18 basic (IKA works, Wilmington, NC, USA)
Geldokumentation (Agarosegele)	G:Box mit GeneSnap 6.07.04 Software (Syngene, Cambridge, UK) Alpha Imager 2200 mit Alpha Ease Software (Alpha Innotech, San Leandro, USA)
Gelelektrophorese	Spannungsquelle: Consort E835 (Consort, Turnhout, Belgien) Elektrophoresekammer (Carl Roth, Karlsruhe)
2D-Gelelektrophorese	Gelgießkammer: Protean Plus Multi-Casting Chamber 1. Dimension (IEF): Protean IEF Cell 2. Dimension (SDS): Protean Plus Dodeca Cell Pumpe: Variable Speed Pump Spannungsquelle: Power Vac (alle von Bio-Rad Laboratories)
Inkubator	Forma (Thermo, Cambridge, UK)
Lyophilisator	Savant ModulyoD Freeze Dryer (Thermo, Cambridge, UK)
Milli-Q-Anlage	Purelab Classic UVF MK2 (Elga LabWater, Marlow, UK)
Nanodrop	Nanodrop 1000 Spectrophotometer (Peqlab Biotechnologie, Erlangen)
pH-Meter	CG 820 (Schott Geräte, Mainz)
qPCR-Anlage	Step One Plus mit Step One 2.1 Software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
Reagenzglasschüttler	Vortex-Genie® 2 (Scientific Industries, Bohemia, NY, USA) WR3 (VWR, Darmstadt)
Rotationsvakuumkonzentrator	Christ RVC 2-18 (Christ, Osterode)

Rotationsverdampfer	Laborota 4000 mit Vac control automatic (Heidolph Instruments, Kehlheim)
Schüttelinkubator	GFL3033 (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel)
Schwingmühle	MM400 (Retsch, Haan)
Spektralphotometer	Nicolet evolution 100 (Thermo, Cambridge, UK)
Sterile Werkbank	Hera safe (Heraeus, Hanau)
Thermocycler	Labcyler (Sensoquest, Göttingen)
Thermomixer	Thermomixer comfort 1,5 & 2 mL (Eppendorf, Hamburg)
Ultraschallbad	Sonorex RK103H (Bandelin Electronic, Berlin)
Ultraschall- Homogenisator	Ultraschall-Homogenisator: Sonoplus UW 2070 Sonotrode: MS 73 (beide Bandelin Electronic, Berlin)
Waagen	TP 214 (Denver Instruments, Bohemia, NY, USA) Scout Pro SP U 4001 (Ohaus, Pine Brook, NJ, USA)
Wasserbad	HC 5/6 (Julabo Labortechnik, Seelbach)
Zentrifugen	Sigma 4K15 Kühlzentrifuge (Sigma, Osterode) Sigma 2K15 Kühlzentrifuge (Sigma, Osterode) Eppendorf 5415 R Kühlzentrifuge (Eppendorf, Hamburg) Eppendorf miniSpin (Eppendorf, Hamburg) Beckman Avanti J-25 (Beckman, Madrid, Spanien)

2.2.6. Software und Internetressourcen

- Auswertung der LC-MSⁿ-Daten:
 - DataAnalysis und QuantAnalysis in Bruker esquire 5.1 (Bruker Daltonics, Bremen)
 - MassBank (<http://www.massbank.jp>)
 - MZmine 0.60 (Katajamaa *et al.*, 2006)
(Quantitative Biology and Bioinformatics group, VTT, Espoo, Finland)
 - ProfileAnalysis 2.0 (Bruker Daltonics, Bremen)
 - R 2.9.2 (Ihaka and Gentleman, 1996)
 - SOFA 1.0.6 Statistics open for all (<http://www.sofastatistics.com>)
 - Systat 11 (Systat Software, Chicago, IL, USA)
 - TigrMev 4.8.1 (Saeed *et al.*, 2003)
(Institute for Genomic Research, Rockville, MD, USA)
 - XCMS 1.16.3 in R (Smith *et al.*, 2006)
(Scripps Center for Metabolomics, La Jolla, CA, USA)

- XCMS-Online 1.21.01 (Tautenhahn *et al.*, 2012)
(Scripps Center for Metabolomics, La Jolla, CA, USA)
- Auswertung der GC/MS-Daten:
 - MSD Chemstation E.02.00.493 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)
 - NIST MS Search 2.0 (FairCom, Columbia, MO, USA)
- Auswertung der NMR-Daten:
MestReNova 7.1.2 (Mestrelab Research, Santiago de Compostela, Spanien)
- Auswertung der 2D-Gele:
Proteom Weaver 3.0.9.3 (Definiens, München)
- DNA-Sequenzanalyse, Primerdesign und Alignment:
Geneious™ Pro 5.6 (Biomatters, Auckland, Neuseeland)
- Chemische Strukturformeln:
ACD/ChemSketch 5.12 (Advanced Chemistry Development, Toronto, Kanada)

2.3. Methoden

2.3.1. Analytische Methoden

2.3.1.1. Extraktion der Polyphenole aus Früchten

Pro Genotyp wurden durchschnittlich fünf Früchte zu einem Pool zusammengefügt. Zur Extraktion der Polyphenole wurden 50 mg lyophilisiertes Fruchtpulver eingewogen, mit 250 µL einer methanolischen Lösung des internen Standards Biochanin A ($c = 0,2 \text{ mg/mL}$) versetzt und mittels Vortex homogenisiert. Anschließend wurden 250 µL Methanol (LC-MS-Qualität) zugegeben, 1 min gevortext, 10 min im Ultraschallbad behandelt und anschließend 10 min bei 16000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Gefäß überführt, während der Rückstand ein weiteres Mal mit 500 µL Methanol wie beschrieben extrahiert wurde. Die Überstände wurden vereint und in einem Rotationsvakuumkonzentrator (*Speed-Vac*) bis zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in 35 µL Wasser (LC-MS-Qualität) resuspendiert, 1 min gevortext, 10 min im Ultraschallbad homogenisiert und anschließend bei 16000 g und 4 °C zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in Mikroeinsätze überführt und zur Analyse mittels LC-MSⁿ (s. 2.2.1.1, S. 30) eingesetzt. Pro Genotyp wurden mindestens drei unabhängige Aufarbeitungen vermessen.

Die Identifizierung der Metabolite erfolgte anhand von Retentionszeit und Fragmentierungsmuster authentischer Referenzsubstanzen, die unter gleichen Konditionen

vermessen wurden, und anhand von Literaturdaten (Fossen *et al.*, 2004; Griebler *et al.*, 2008a; Hanhineva *et al.*, 2008; Lunkenbein *et al.*, 2006) (**Tab. 7**).

Tab. 7: Retentionszeiten (t_R) und Fragmentierungsmuster der identifizierten Metabolite. MS²-Ionen sind nach sinkender Intensität geordnet. Abkürzungen der Reste: **Ac** Acetat, **Glc** Glucose, **Gln** Glucuronat, **Rha** Rhamnose, **Rut** Rutinose, **Mal** Malonat, **Cat** Catechin, **Afz** Afzelechin, **Cum** Cumarat.

Metabolit	t_R [min]	MS [m/z]	MS ² [m/z]
Ascorbinsäure	4,0	175 [M-H] ⁻	115 [M-Ac] ⁻
Zitronensäure	6,0	191 [M-H] ⁻	111, 173 [M-H ₂ O] ⁻
DMHF-glucosid	17,2	313 [M+Na] ⁺	185 [Glc+Na] ⁺ , 151 [M-Glc+Na] ⁺ , 285
<i>p</i> -Hydroxybenzoesäure-glucoseester	19,3	299 [M-H] ⁻	137 [M-Glc] ⁻ , 179 [Glc] ⁻ , 239 [M-Ac] ⁻
(Epi)Catechin Dimere (Proanthocyanidine)*	20,2	577 [M-H] ⁻	425, 289 [M-Cat] ⁻ , 407, 451
Kaffeesäure-glucoseester	21,1	341 [M-H] ⁻	179 [M-Glc] ⁻ , 161 [M-Glc-H ₂ O] ⁻ , 203
Epiafzelechin-(4 α →8)-pelargonidin- 3- <i>O</i> -glucosid	22,1	705 [M] ⁺	543 [M-Glc] ⁺
(Epi)Afzelechin-(epi)catechin Dimere*	22,5	561 [M-H] ⁻	289 [M-Afz] ⁻
Catechin	22,9	289 [M-H] ⁻	245 [M-CO ₂] ⁻
Ellagsäure	23,3	301 [M-H] ⁻	168, 283 [M-H ₂ O] ⁻
Cyanidin-3- <i>O</i> -glucosid	23,7	449 [M] ⁺	287 [M-Glc] ⁺
<i>p</i> -Cumarsäure-glucoseester/-glucosid*	24,1	325 [M-H] ⁻	145 [M-Glc-H ₂ O] ⁻ , 163 [M-Glc] ⁻ , 187
Pelargonidin-3- <i>O</i> -glucosid	24,5	433 [M] ⁺	271 [M-Glc] ⁺
Ferulasäure-glucoseester	24,9	355 [M-H] ⁻	193 [M-Glc] ⁻ , 217, 175 [M-Glc-H ₂ O] ⁻
Pelargonidin-3- <i>O</i> -rutinosid	26,2	579 [M] ⁺	433 [M-Rha] ⁺ , 271 [M-Rut] ⁺
Epicatechin	26,4	289 [M-H] ⁻	245 [M-CO ₂] ⁻
Pelargonidin-3- <i>O</i> -(6"-malonyl)-glucosid	30,0	519 [M] ⁺	271 [M-Mal-Glc] ⁺ , 433 [M-Mal] ⁺ , 475 [M-CO ₂] ⁺
Zimtsäure-glucoseester	31,6	333 [M+Na] ⁺	185 [Glc+Na] ⁺

Metabolit	t _R [min]	MS [<i>m/z</i>]	MS ² [<i>m/z</i>]
Naringenin-7- <i>O</i> -glucosid	33,3	457 [M+Na] ⁺	273 [M-Glc] ⁺
Quercetin-3- <i>O</i> -glucosid	34,1	463 [M-H] ⁻	301 [M-Glc] ⁻
Quercetin-3- <i>O</i> -glucuronid	34,4	477 [M-H] ⁻	301 [M-Gln] ⁻
Kaempferol-3- <i>O</i> -glucosid	35,1	447 [M-H] ⁻	285 [M-Glc] ⁻
Kaempferol-3- <i>O</i> -glucuronid	36,4	461 [M-H] ⁻	285 [M-Gln] ⁻
Kaempferol-3- <i>O</i> -(6"-cumaroyl)-glucosid	38,5	593 [M-H] ⁻	285 [M-Cum-Glc] ⁻
Epiafzelechin-glucosid	41,6	437 [M+H] ⁺	275 [M-Glc] ⁺
Biochanin A (interner Standard)	42,8	283 [M-H] ⁻	-

* Doppelpeak aus zwei Isomeren

Ausgehend von einem Responsefaktor von 1 erfolgte die Quantifizierung relativ zum internen Standard Biochanin A nach folgender Formel:

$$E(\text{Analyt}) = E(\text{IS}) \cdot \frac{A(\text{Analyt})}{A(\text{IS})}$$

$$\text{rel. Konz. [\% equ. TM]} = \frac{E(\text{Analyt}) [\mu\text{g}]}{EW [\text{mg}]}$$

mit

A Peakfläche

E Masse, E(IS) = 50 µg

IS Interner Standard

EW Einwaage an lyophilisiertem Pulver

Relative Konzentrationen wurden in % equ. TM ($\hat{=}$ mg equ./g TM) angegeben, da sie sich auf Äquivalente (equ.) des internen Standards Biochanin A in gefriergetrockneten Früchten (Trockenmasse, TM) bezogen. Die Bestimmung der Nachweisgrenzen erfolgte anhand eines Signal-zu-Rausch-Verhältnisses von 3. Dazu wurde die Fläche eines Peaks des Hintergrundrauschens mit dem Faktor 3 multipliziert und der berechnete Gehalt als relative Nachweisgrenze in [% equ. TM] angegeben.

2.3.1.2. Extraktion der Polyphenole aus Blütenorganen

Die Blüten wurden unter dem Mikroskop wie unter Kapitel 2.1.1.2 (S. 19) beschrieben in Narben, Griffel und Kronblätter getrennt. Die separierten Blütenbestandteile wurden jeweils in vorgewogene Eppendorf® Reaktionsgefäße (ERGs) überführt und nochmals ausgewogen. Die

Menge an Kronblättern pro Blüte entsprach etwa 25 mg und war somit ausreichend für eine Aufarbeitung pro Blüte. Aufgrund der geringen Einwaage von Narben und Griffel wurden hierzu jeweils drei Blüten zu einem Pool zusammengefügt. Daraus ergaben sich durchschnittliche Einwaagen von 0,8 mg für die Narben und 1,8 mg für die Griffel.

Zwölf Blüten der Wildtyp-Pflanze, was einer Vierfachbestimmung für Narben bzw. Griffel entsprach, wurden mit 15 Blüten von vier *si-ANR*-Linien (F14, 15, 17 (je drei Blüten) und 18 (sechs Blüten)) bzw. zwölf Blüten von vier *si-FLS*-Linien (F25, 26 (je drei Blüten) und 29 (sechs Blüten)) verglichen.

Zur Extraktion wurde eine Spatelspitze Seesand und 10 μ L der Lösung des internen Standards Biochanin A zugegeben, sowie 200 μ L Methanol. Anschließend wurde 1 min gevortext, 5 min im Ultraschallbad behandelt und 10 min bei 16000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues ERG überführt, während der Rückstand zwei weitere Male mit 200 μ L bzw. 100 μ L Methanol wie beschrieben extrahiert wurde. Die Überstände wurden vereint und im Rotationsverdampfer (*Speed-Vac*) unter Vakuum zur Trockne einrotiert. Der Rückstand wurde in 15 μ L Wasser aufgenommen, 1 min gevortext, 5 min im Ultraschallbad homogenisiert und für 10 min bei 16000 g zentrifugiert. Der klare Überstand wurde zur Analyse mittels LC-MSⁿ eingesetzt.

2.3.1.3. Extraktion der Polyphenole aus Blättern, Nebenblättern und Wurzeln

Die Extraktion der Polyphenole aus Blättern, Nebenblättern und Wurzeln erfolgte wie unter 2.3.1.1 beschrieben. Die Einwaage an Wurzeln betrug 50 mg lyophilisierten Materials. Blätter und Nebenblätter wurden frisch analysiert. Die Einwaage an Blättern betrug 500 mg, die der Nebenblätter 10 bis 20 mg.

2.3.1.4. Isolierung von Metaboliten: Probenvorbereitung und Festphasenextraktion

Gefriergetrocknetes Material

Etwa 50 g lyophilisierten Fruchtpulvers der Gartenerdbeere *F. × ananassa* cv. Senga Sengana wurden in mehreren Schritten mit insgesamt 1 L Methanol (HPLC-Qualität) extrahiert. Hierzu wurde jeweils 30 sec gevortext, 5 min im Ultraschallbad behandelt und anschließend 10 min bei 5000 g zentrifugiert. Die Überstände wurden vereint und am Rotationsverdampfer unter Vakuum und 42 °C zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wurde zweimal in je 150 mL dest. Wasser aufgenommen, 1 min gevortext, im 10 min Ultraschallbad gelöst und abzentrifugiert (5000 g, 10 min). Der Überstand wurde in mehreren Schritten auf eine selbst gepackte Polystyrolharz (XAD[®])-Säule, die zuvor mit Methanol konditioniert und anschließend ausgiebig mit Wasser gespült wurde, gegeben. Die Säule wurde mit etwa 100 mL dest. Wasser gewaschen, um Zucker,

Fruchtsäuren und Proteine aus der Probe zu entfernen. Anschließend wurden die Polyphenole mit etwa 100 mL Methanol eluiert. Der Zyklus aus Probengabe, Waschen und Eluieren wurde mehrmals mit kleinen Probepolumina wiederholt, um die Säule nicht zu überladen. Die vereinten Eluate wurden am Rotationsverdampfer auf etwa 50 mL eingengt, filtriert (0,45 µm) und zur Fraktionierung an der präparativen LC-ESI-MSⁿ (s. **2.2.1.2**, S. 31) eingesetzt.

Frisches Material

Da einige Metabolite, die der bioinformatischen Auswertung zufolge entscheidend für eine Differenzierung ausgewählter Sorten sind, nicht in *F. × ananassa* Senga Sengana vorkommen, wurden in einem zweiten Ansatz tiefgefrorene Früchte folgender Sorten aufgearbeitet: Candiss, CF4402, Cigoulette, Ciloé, CIR705, Cirafine, Mara des Bois, Saint Joseph und Sweet Charlie. Sie entstammten den Ernten 2010 und 2011 der französischen Lieferungen (s. **2.1.1.1**, S. 16). Die Früchte wurden von grünen Teilen befreit, aufgetaut, mit etwas dest. Wasser versetzt und mittels Ultra-Turrax[®] dispergiert. Das Fruchthomogenat wurde bei 5000 g für 10 min abzentrifugiert und über Glaswolle filtriert. Der Rückstand wurde nochmals mit Wasser extrahiert, mittels Vortex 1 min homogenisiert, zentrifugiert (5000 g, 10 min) und über Glaswolle filtriert. Die vereinten Filtrate wurden wie oben beschrieben auf einer XAD[®]-Säule aufgereinigt und zur Fraktionierung an der präparativen LC-ESI-MSⁿ eingesetzt.

2.3.1.5. Isolierung von Metaboliten: Aufreinigung und NMR

Die folgende Beschreibung bezieht sich beispielhaft auf die Aufreinigung des unbekanntes Metaboliten 371neg, mit $-MS^1 m/z$ -371, $-MS^2 m/z$ -209 und Retentionszeit 35,8 min. Andere Metaboliten wurden nach gleicher Vorgehensweise isoliert, wobei der Gradient der Retentionszeit des jeweiligen Metaboliten angepasst wurde.

Präparative LC-MS

Der gewonnene Extrakt aus *F. × ananassa* Senga Sengana (s. **2.3.1.4**) wurde zunächst auf einer präparativen LC-MS (s. **2.2.1.2**, S. 31) bei einem Fluss von 9,75 mL/min über eine Säule mit Umkehrphase (*reversed phase*) fraktioniert. Als Fließmittel wurden 0,1 % Ameisensäure in Wasser (A) und 0,1 % Ameisensäure in Methanol (B) verwendet. Es wurde 16-mal je 1 mL Extrakt (entspricht insgesamt ca. 160 g Erdbeeren Frischgewicht) injiziert und mit folgendem Gradienten aufgetrennt: 0 % B für 2 min, 0-40 % B für 28 min, 100 % B für 5 min und 0 % B für 10 min. Nach einer Wartezeit von 5 min fing der Fraktionssammler sechs Fraktion á 5 min auf. Der gesuchte Metabolite mit m/z 371 und MS^2 von 209 im negativen Modus war in Fraktion fünf vorhanden. Diese Fraktion wurde am Rotationsverdampfer unter Vakuum und 42 °C bis auf

2 mL eingengt, in ein ERG überführt und bei 16000 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut injiziert und mit folgendem Gradient aufgetrennt: 20 % B für 2 min, 20-40 % B für 28 min, 100 % B für 5 min, 20 % B für 10 min. Nach einer Wartezeit von 2 min wurde der Lauf in 35 Fraktionen á 1 min aufgeteilt. Der gesuchte Metabolit befand sich in den Fraktionen 17-20, welche anschließend vereint und am Rotationsverdampfer auf 1 mL eingengt wurden. Nach Zentrifugation wurde der Extrakt auf der präparativen LC-MS bei einem Fluss von 4,75 mL/min über eine polare Säule (Normalphase) aufgetrennt. Hierzu wurden 5 mM Ammoniumformiat in Wasser (A) und Acetonitril (B) als Fließmittel mit folgendem Gradienten verwendet: 95 % B für 2 min, 95-80 % B für 28 min, 40 % B für 5 min, 95 % B für 10 min. Der Fraktionssammler fing ohne Wartezeit 35 Fraktionen á 1 min auf, wobei sich der gesuchte Metabolit in Fraktion vier befand.

Analytische HPLC/UV

Nachdem Fraktion vier aus der präparativen Fraktionierung eingengt und zentrifugiert wurde, wurden je 50 µL auf einem analytischen HPLC/UV-System (s. 2.2.2) aufgetrennt und die Metabolite anhand des UV-Signals manuell aufgefangen. Als Fließmittel diente Wasser mit 18 % Acetonitril und 0,1 % Ameisensäure (Endkonzentration) bei einem Fluss von 1,0 mL/min. Aus dem UV-Signal ergaben sich fünf Peaks, die auf der analytischen LC-MSⁿ (s. 2.2.1.1, S. 30) auf den gesuchten Metaboliten kontrolliert wurden.

Vorbereitung zur NMR-Spektroskopie

Aufgrund des Resultats der analytischen LC-MS wurde das Eluat von Peak fünf zur Trockne einrotiert, im Lyophilisator für 5 h getrocknet und mit deuteriertem Methanol gewaschen. Anschließend wurde die erneut getrocknete Probe in 150 µL deuteriertem Methanol, welches 0,03 % Tetramethylsilan (TMS) als internen Standard enthält, gelöst, in ein NMR-Röhrchen überführt und am NMR (s. 2.2.4) vermessen.

2.3.1.6. Ligninextraktion

Die Ligninextraktion aus Erdbeerfrüchten erfolgte als Sechsfachbestimmung entlang der Protokolle von Meyer *et al.* (1998) und Franke *et al.* (2002). 50 mg lyophilisierten Fruchtpulvers wurden eingewogen, zweimal mit 1,5 mL 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,2) versetzt, 1 min im Ultraschallbad behandelt und für 30 min bei 40 °C und 500 rpm inkubiert. Nach Zentrifugation für 30 min bei 16000 g wurde der Überstand verworfen, während der Rückstand zweimal mit 1,5 mL 80 % Ethanol gewaschen, 1 min im Ultraschallbad behandelt und 10 min bei 80 °C und 500 rpm inkubiert wurde. Um den Überstand zu entfernen, wurde für 10 min bei

16000 g zentrifugiert und anschließend der Rückstand mit 1,5 mL Aceton gewaschen. Nach 1 min im Ultraschallbad und Zentrifugation für 30 min bei 16000 g wurde der Überstand verworfen und der Rückstand in 950 µL 1 M Natriumhydroxid-Lösung für 16 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösung wurde anschließend mit 950 µL 1 M Salzsäure neutralisiert und für 10 min bei 16000 g zentrifugiert. Der Rückstand wurde zweimal mit 1,5 mL Wasser gewaschen, gefolgt von 1 min im Ultraschallbad und Zentrifugation für 15 min bei 16000 g. Der so gewonnene Rückstand wurde analog zu den Standards aus hydrolytischem Lignin, die zur Erstellung der Kalibriergerade genutzt wurden, zur Quantifizierung eingesetzt (s. 2.3.1.7).

2.3.1.7. Quantifizierung von Lignin

Die Quantifizierung von Lignin erfolgte nach Campbell und Ellis (1992). Fünf Einwaagen (1, 2,5, 5, 7,5 und 10 mg) von hydrolytischem Lignin dienten als Kalibrierpunkte und wurden genauso behandelt wie der gewonnene Rückstand aus der Ligninextraktion. Nach Zugabe von 750 µL Wasser, 250 µL konzentrierter Salzsäure (32 %) und 100 µL Thioglykolsäure wurde die Probe für 3 Stunden bei 80 °C inkubiert und anschließend für 5 min bei 16000 g zentrifugiert. Der Rückstand wurde mit 1 mL Wasser gewaschen, für 1 min im Ultraschallbad behandelt und nochmals zentrifugiert. Zur Lösung des Rückstandes wurde 1 mL 1 M Natriumhydroxid-Lösung zugesetzt und bei Raumtemperatur für 12 Stunden bei 500 rpm inkubiert. Nach 5 min Zentrifugation bei 16000 g wurde der Überstand in ein neues Gefäß überführt, mit 200 µL konzentrierter Salzsäure (32 %) vermischt und das Lignin für 4 Stunden bei 4 °C präzipitiert. Nach 10 min Zentrifugation bei 4 °C und 16000 g wurde der Rückstand abschließend in 1 mL 1 M Natriumhydroxid-Lösung gelöst und falls nötig verdünnt. Die Messung der Absorption erfolgte photometrisch bei 280 nm. Aus einer Dreifachbestimmung der Standards des hydrolytischen Lignins wurde eine Kalibriergerade aufgenommen.

2.3.1.8. Extraktion von 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3[2H]-furanon (DMHF)

Die Extraktion von DMHF (2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3[2H]-furanon, Furaneol[®]) erfolgte modifiziert nach Kalinowski (2009). Ein Gramm des mit flüssigem Stickstoff homogenisierten Fruchtpulvers wurde eingewogen, mit 40 µL einer Lösung des internen Standards Norfuraneol (c = 5 mg/mL in Wasser) versetzt und mittels Vortex homogenisiert. Nach Zugabe von 500 µL Ethylacetat wurde 1 min gevortext, gefolgt von 5 min im Ultraschallbad. Der nach Zentrifugation für 10 min bei 13000 g erhaltene Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt, während der Rückstand erneut mit 500 µL Ethylacetat wie beschrieben extrahiert wurde. Nach Zentrifugation wurde die Überstände vereint, 20 µL Wasser (LC-MS-Qualität) zugegeben und das Ethylacetat im

Rotationsvakuumkonzentrator (*Speed-Vac*) entfernt. Das Volumen wurde mit Wasser auf 40 μL ergänzt und die Probe für 1 min mittels Vortex und 5 min im Ultraschallbad behandelt. Nach Zentrifugation (10 min, 13000 g) wurde der klare Überstand zur Analyse mittels LC-MSⁿ (s. 2.2.1.1, S. 30) eingesetzt.

Die Qualifizierung der Metabolite erfolgte durch den Vergleich von Retentionszeit und Fragmentierungsmuster mit den Werten authentischer Referenzsubstanzen (**Tab. 8**).

Tab. 8: Retentionszeiten (t_R) und Fragmentierungsmuster der identifizierten Metabolite.
Me Methylrest

Metabolit	t_R [min]	MS [m/z]	MS ² [m/z]
HMF (Norfuraneol, interner Standard)	11,5	115 [M+H] ⁺ 381 [3M+Ka] ⁺	- 285, 308, 267
DMHF (Furaneol [®])	17,9	129 [M+H] ⁺	111 [M-H ₂ O] ⁺ , 101 [M-CO] ⁺
DMMF (Mesifuran)	17,2	143 [M+H] ⁺	111 [M-H ₂ O] ⁺ , 129 [M-Me] ⁺

Mit Ausnahme von Ascorbinsäure konnten ebenfalls die in **Tab. 7** (S. 38) gelisteten Verbindungen der Methanolextrakte identifiziert werden, jedoch mit geringeren Intensitäten. Die Quantifizierung erfolgte relativ zum internen Standard Norfuraneol nach folgender Formel mit einem angenommenen Responsefaktor von 1, weshalb die ermittelten Werte als Äquivalente (equ.) des internen Standards angegeben sind.

$$E(\text{Analyt}) = E(\text{IS}) \cdot \frac{A(\text{Analyt})}{A(\text{IS})}$$

$$\text{rel. Konz. [ppm equ.]} = \frac{E(\text{Analyt}) [\mu\text{g}]}{EW [g]}$$

mit

A Peakfläche

E Masse, E(IS) = 200 μg

IS Interner Standard

EW Einwaage an frischem Erdbeerhomogenat

2.3.1.9. Analyse flüchtiger Verbindungen mittels SPME-GC/MS

Zu 1 g des mit flüssigem Stickstoff homogenisierten Erdbeerfruchtpulvers wurden 50 µL der Lösung des internen Standards 1,2-Dimethoxyethan ($c = 0,965 \text{ mmol/L}$) gegeben. Um die Polarität der Lösung zu erhöhen, und somit die Evaporation der flüchtigen Bestandteile zu erleichtern, wurden 2 mL einer gesättigten Natriumchloridlösung zugesetzt. Zudem wurde dadurch eine Minimierung der mikrobiellen Aktivität bewirkt. Die Probe wurde mittels Vortex homogenisiert und direkt zur SPME-GC/MS-Analyse (s. **2.2.3**, S. 33) eingesetzt. Die Berechnung erfolgte relativ zum internen Standard 1,2-Dimethoxyethan. Ausgehend von einem Responsefaktor von 1 wurde die gleiche Formel wie eben unter **2.3.1.8** beschrieben verwendet.

2.3.1.10. Thiolytische Spaltung der Proanthocyanidine

Extraktion und Thiolyse der Proanthocyanidine erfolgten nach Gu *et al.* (2003). Rote, reife Erdbeerfrüchte wurden gefriergetrocknet und anschließend mit einer Mühle fein vermahlen. Pro Ansatz wurden 0,5 g Fruchtpulver eingewogen, mit 10 mL der Extraktionslösung (Aceton/Wasser/Eisessig, 70/29,5/0,5, v/v/v) versetzt, 30 sec gevortext und 10 min bei 37 °C im Ultraschallbad behandelt, wobei das Gefäß nach den ersten 5 min einmal invertiert wurde. Die Probe wurde anschließend 50 min bei Raumtemperatur inkubiert und nach der Hälfte der Zeit 30 sec gevortext. Nach Zentrifugation (3500 rpm, 15 min) wurden 7,5 mL des Überstandes entnommen und mittels *Speed-Vac* zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in 6 mL Methanol (30 %, v/v) aufgenommen und auf eine selbst gepackte Sephadex LH-20 Säule (6 x 1,5 cm, 3 g), die zuvor für 4 h mit Methanol (30 %, v/v) equilibriert wurde, gegeben. Nachdem die Probe auf die Säule geladen wurde, wurde unter Anlegen eines leichten Vakuums mit insgesamt 40 mL Methanol (30 %, v/v) gewaschen. Die Proanthocyanidine wurden mit 70 mL Aceton (70 %, v/v) eluiert und am Rotationsverdampfer unter Vakuum zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in 2,5 mL der Extraktionslösung (Aceton/Wasser/Eisessig, 70/29,5/0,5, v/v/v) resuspendiert.

Zur Thiolyse wurden 50 µL des Proanthocyanidin-Extrakts bei 25 °C in der *Speed-Vac* getrocknet und anschließend in 50 µL Methanol aufgenommen. Nach Zugabe von 50 µL angesäuertem Methanol (3,3 % HCl_{konz} , v/v) und 100 µL Benzylmercaptan (5 % v/v in Methanol) wurden die Gefäße verschlossen für 10 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Reaktion wurden die Lösungen kurz bei -20 °C gelagert und anschließend 10 µL zur Analyse mittels RP-HPLC-MSⁿ (s. **2.2.1.1**, S. 30) eingesetzt, wobei folgender Gradient verwendet wurde: B (0,1 % Ameisensäure v/v in Methanol) von 15 auf 80 % in 45 min.

Die Ergebnisse von vier biologischen Replikaten pro si-ANR-Linie wurden einer Dreifachbestimmung der Kontrolle (WT) gegenüber gestellt. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mittels Wilcoxon-Mann-Whitney U-Test überprüft (Hart *et al.*, 2001).

2.3.1.11. Berechnung des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman

Zum Vergleich verschiedener Jahrgänge der Kreuzungspopulation wurden nur Individuen berücksichtigt, die in allen drei Jahrgängen verfügbar waren. Die Verteilungen der Proben nach absteigenden relativen Konzentrationen wurden pro Metabolit bzw. Metabolitgruppe (wie Gesamtpolyphenole) gegenübergestellt und verglichen, inwiefern der Rang einer jeden Probe in zwei verschiedenen Jahrgängen variierte (Differenz d_i). Die Berechnung des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman r_s erfolgte nach folgender Formel:

$$d_i = rg(x_i) - rg(y_i)$$

$$r_s = 1 - \frac{6 \cdot \sum_{i=1}^n d_i^2}{n \cdot (n^2 - 1)}$$

mit

i Nummer der Probe

x, y die zu vergleichenden Jahrgänge (z.B. $x = 2009, y = 2010$)

$rg(x_i)$ Rang von x_i (z.B. Rang der Probe #1 in 2009)

$rg(y_i)$ Rang von y_i (z.B. Rang der Probe #1 in 2010)

n Anzahl der Proben

Der Rangkorrelationskoeffizient r_s kann Werte zwischen -1 und +1 annehmen und wurde in der vorliegenden Arbeit in Prozent angegeben. Je größer der Betrag desto stärker ist der proportionale bzw. indirekt proportionale Zusammenhang. Kritische Werte von r_s für statistische Signifikanz eines zweiseitigen Tests wurden Tabellen entnommen oder nach folgender Formel berechnet (Sachs, 1999; Lane, 2012):

$$r_s = \frac{z}{\sqrt{n - 1}}$$

mit

$z = 1,960$ (5 % Signifikanzniveau)

$z = 2,576$ (1 % Signifikanzniveau)

$z = 3,291$ (0,1 % Signifikanzniveau)

Für die Berechnung ergab sich in Microsoft Excel 2010 folgendes Schema:

Probe	Rang in 2009	Rang in 2010	d_i^2
Probe #1	x_1	y_1	$(x_1 - y_1)^2$
Probe #2	x_2	y_2	$(x_2 - y_2)^2$
...	
Probe #n	x_n	y_n	$(x_n - y_n)^2$

Die Sortierung der Proben erfolgte automatisiert. Der Rang bezüglich der relativen Konzentration sollte nach numerischer Reihenfolge der Proben sortiert werden. Dazu wurden die Proben zunächst nach absteigender relativer Konzentration geordnet und mit dem jeweiligen Rang versehen. Zusätzlich wurde eine Hilfsspalte eingefügt, die die Platzierung der Probe nach numerischer Reihenfolge wiedergab (=RANG()). Anschließend wurden die Proben nach ihrer numerischen Reihenfolge dargestellt und der jeweilige Rang bezüglich relativer Konzentration abgelesen (=SVERWEIS(KKLEINSTE(),...)).

Beispiel für $n = 5$. Die Proben 21 - 25 werden nach absteigenden relativen Konzentrationen sortiert und anschließend in folgende Matrix unter Spalte C eingegeben:

	A	B	C	D	E
1	Hilfsspalte	Rang	Proben (nach Konz. sortiert)	Proben (numerisch)	Rang
2	5	1	25	21	4
3	3	2	23	22	3
4	2	3	22	23	2
5	1	4	21	24	5
6	4	5	24	25	1

Formeln in der Tabelle:

A2 =RANG(C2,\$C\$2:\$C\$6,1)

D2 =SVERWEIS(KKLEINSTE(\$A\$2:\$A\$6,B2),(\$A\$2:\$C\$6),3,0)

E2 =SVERWEIS(KKLEINSTE(\$A\$2:\$A\$6,B2),(\$A\$2:\$C\$6),2,0)

2.3.1.12. **Bioinformatische Auswertung (*untargeted analysis*)**

Zur bioinformatischen Auswertung wurden methanolische Extrakte aus Erdbeerfrüchten (s. 2.3.1.1, S. 37) eingesetzt. Die Aufnahme der Daten erfolgte randomisiert auf einem analytischen LC-ESI-MSⁿ-System (s. 2.2.1.1, S. 30) in einem Scanbereich von m/z 100 – 800 alternierend im positiven und negativen Modus. Um Peaks herauszufiltern, die nicht von den

Proben stammen, wurden Leerläufe aufgenommen. Diese wurden während des gesamten Extraktionsprozesses bis zur Analyse wie die Proben – jedoch ohne Einwaage – behandelt.

Für die Evaluierung der Daten mit `profileAnalysis` (Bruker Daltonics, Bremen) konnten die Chromatogramme als *.D-Dateien direkt verwendet werden, während sie für die Bearbeitung mit XCMS zunächst in einheitlich positive oder negative MS¹-Daten umgeschrieben werden mussten. Das zur Konvertierung nötige Macro *MSExp.M* wurde von Dr. Thomas Hoffmann (TU München) zur Verfügung gestellt. Aus den resultierenden cdf-Dateien wurden mit Hilfe von XCMS und XCMS-Online Peaklisten erstellt. Als Skript in XCMS diente das *faabKO*-Standardprotokoll von Smith (2010) mit folgenden Befehlen:

```
myAlign <- function () {
  myDir = "C:/... (Dateipfad der cdf-Daten)"
  myClass1 = "Unterordner 1"
  myClass2 = "Unterordner 2"
  myResultDir = "myAlign"
  setwd(myDir)
  library(xcms)
  xset <- xcmsSet()
  xset
  xset <- group(xset, sleep=.0001)
  xset2 <- retcor(xset, family="s", plottype="m")
  xset2 <- group(xset2, bw =10)
  xset3 <- fillPeaks(xset2)
  xset3
  reporttab <- diffreport(xset3, myClass1, myClass2, myResultDir, 20, metlin = 0.15)
  print("Finished, open by yourself the file myAlign.tsv and pictures in myAlign_eic")
}
```

Einstellungen für die Erstellung von Peaklisten mit Hilfe von XCMS-Online sind in **Tab. 9** zusammengefasst:

Tab. 9: Parameter für die Erstellung von Peaklisten mit XCMS-Online.

Feature Detection	
Method	matched Filter
FWHM (full width at half maximum)	30
Step	0.1
mzdiff (min. difference in m/z for peaks with overlapping retention times)	0.5

Feature Detection	
S/N (signal to noise) ratio cutoff	10
Max. number of peaks per extracted ion chromatogram	10
Retention time correction	
Method	peak groups
Number of extra peaks to allow in retention time correction group	5
Number of missing samples to allow in ret. time corr. group	5
Alignment	loess (non-linear) [Ausnahme: Bei positiven Daten wurde meist "linear alignment" gewählt]
Family	Gaussian
Span (degree of smoothing for local polynomial regression fitting)	0.2
Alignment	
minfrac (minimum fraction of samples necessary in at least one of the sample groups for it to be a valid group)	0.5
bw (Bandwidth (std. deviation or half width at half max.) of Gaussian smoothing kernel to apply to the peak density chromatogram = allowable retention time deviation in seconds)	20
mzwid (width of overlapping m/z slices to use for creating peak density chromatograms and grouping peaks across samples)	0.5

Die erhaltenen Peaklisten wurden anschließend in Microsoft Excel so bearbeitet, dass Peaks, die aus Lösungsmitteln oder Verunreinigungen stammen, entfernt werden konnten. Hierzu wurden für jeden Peak die Mittelwerte der Leerläufe von den Probenläufen subtrahiert. Anschließend wurden alle negativen Argumente mit Hilfe einer Wenn-Bedingung (Bsp.: Wenn $A1 < 0,0, A1$) durch 0 ersetzt und die Anzahl der 0-Argumente pro Peak gezählt. Peaks, die in über 10 % der Proben keinen Wert besaßen, wurden in einer extra Spalte mit einer 0 markiert und gelöscht, so dass nur Peaks, die in mindestens 90 % der Proben vorhanden waren, für die endgültige Peakliste verwendet wurden (Bsp.: Wenn($Zählenwenn(A1:XY1,0) > 10\%$ der Proben,0,1)).

Zur Auswertung wurden die Listen als *.txt-Dateien in TigrMev importiert, normalisiert und mittels Hauptkomponentenanalyse (PCA) nach ihrer Ähnlichkeit gruppiert. Anschließend wurden zwischen einzelnen Gruppen statistische Tests wie t-Test oder ANOVA mit Standard-Bonferroni-Korrektur und einem Signifikanzniveau von 0,01 % ($p < 0,0001$) durchgeführt.

Die Darstellung der Metabolite, die für eine Differenzierung der Proben in der PCA verantwortlich waren, erfolgte durch eine hierarchisch gegliederte *Heat Map*. Aus den Daten der verschiedenen Sorten und Segregationspopulationen wurde eine Liste häufig auftretender Kandidatenmetabolite generiert.

2.3.2. Molekularbiologische Methoden

2.3.2.1. Extraktion von totalRNA

Die RNA-Extraktion erfolgte nach Chang *et al.* (1993) mit CTAB-Puffer. 2 – 3 g Pflanzenmaterial wurden unter flüssigem Stickstoff mit Hilfe einer Kugelmühle zu feinem Pulver vermahlen und zu 20 ml RNA-Extraktionspuffer, der zuvor auf 65 °C erhitzt und anschließend mit 800 µL β-Mercaptoethanol versetzt wurde, gegeben. Die Probe wurde gemischt und für 10 min bei 65 °C inkubiert, wobei alle 3 min von Hand invertiert wurde. Nach Zugabe des gleichen Volumens an CI (24:1) wurde 10 min per Hand invertiert und anschließend für 10 min bei 12000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und ein weiteres Mal wie beschrieben mit dem gleichen Volumen an CI (24:1) gewaschen. Der erhaltene Überstand wurde in eine neues Gefäß überführt, mit einem Drittel Volumen 8 M Lithiumchloridlösung gemischt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach Zentrifugation für 30 min bei 12000 g und 4 °C wurde das Pellet in 0,5 % SDS (in DEPC-Wasser) gelöst und in ein ERG überführt wurde. Nach Zugabe von 500 µL CI (24:1) wurde 30 sec per Hand invertiert, zentrifugiert (10 min, 16000 g, 4 °C) und der Überstand in ein neues ERG überführt. Anschließend wurde 100 % Ethanol (-20 °C) zugegeben und für 2 h bei -20 °C inkubiert. Durch Zentrifugation für 30 min bei 16000 g und 4 °C wurde das RNA-Pellet erhalten, welches anschließend mit je 500 µL 70 % Ethanol (-20 °C) und 100 % Ethanol (-20 °C) gewaschen wurde. Hierauf wurde für 5 min bei 16000 g und 4 °C zentrifugiert, restliches Lösungsmittel entfernt und das RNA-Pellet in 40 µL DEPC-Wasser resuspendiert.

2.3.2.2. Reinigung der RNA (DNA-Verdau)

Zur Reinigung der RNA wurde ein DNA-Verdau mittels DNase durchgeführt. Dazu wurden 40 µL (4 – 5 µg) der extrahierten RNA mit 5 µL DNase und 5 µL des entsprechenden 10x Puffers (inkl. Magnesiumchlorid) versetzt und 1 h bei 37 °C im Thermoblock inkubiert. Nach Zugabe von 100 µL DEPC-Wasser und 150 µL Phenol/C/I (25:24:1) wurde gevortext und anschließend für 5 min bei 16000 g zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues ERG überführt und mit 150 µL CI (24:1) wie eben beschrieben gewaschen. Nach Zentrifugation wurde die obere Phase in ein neues ERG überführt, während die untere Phase mit 100 µL

DEPC-Wasser versetzt, gevortext und 2 min bei 16000 *g* zentrifugiert wurde. Die Überstände wurden vereint und mit dem dreifachen Volumen 100 % Ethanol (-20 °C) und einem Zehntel Volumen 3 M Natriumacetat (in DEPC-Wasser) versetzt, gemischt und 1,5 h bei -80 °C inkubiert. Nach 30 min Zentrifugation bei 16000 *g* und 4 °C wurde der Überstand abgenommen und verworfen, während das Pellet mit jeweils 300 µL 70 % Ethanol (-20 °C) und 100 % Ethanol (-20 °C) gewaschen wurde. Nach 2 min Zentrifugation bei 16000 *g* und 4 °C wurde das Lösungsmittel abpipettiert, das Pellet kurz bei 37 °C getrocknet und anschließend in 35 µL DEPC-Wasser resuspendiert. Die RNA-Konzentration wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm unter Verwendung folgender Gleichung berechnet:

$$\text{RNA } [\mu\text{g}/\mu\text{L}] = \text{OD}_{260} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot 0,04$$

Das Verhältnis $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ spiegelt die Verunreinigung der RNA durch Proteine wider, wobei reine RNA einen Wert von 2 aufweist. Zur Kontrolle der RNA-Extraktion und -Reinigung wurde ein Agarosegel angefertigt.

2.3.2.3. cDNA-Synthese (Reverse Transkription)

Zur cDNA-Synthese wurde zunächst folgender Ansatz für 5 min bei 65 °C inkubiert:

- 10 µL RNA (1 µg)
- 2 µL Random Hexamer oder Oligo(dT) Primer (25 µM)
- 1 µL dNTPs (10 mM)

Nach dem Abkühlen auf Eis wurden folgende Lösungen hinzugefügt:

- 4 µL 5x M-MLV-Puffer
 - 1 µL RNase Inhibitor (Peqlab Biotechnologie, Erlangen)
 - 1 µL Reverse Transkriptase M-MLV (oder Superscript III*)
- *Bei Verwendung der reversen Transkriptase Superscript III wurden statt 4 µL 5x M-MLV-Puffer 4 µL 5x First Strand Puffer und zusätzlich 1 µL 0,1 M DTT-Lösung zugegeben.

Die cDNA-Synthese erfolgte für 1 h bei 50 °C, gefolgt von 10 min bei 72 °C zur Inaktivierung der reversen Transkriptase.

2.3.2.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Vervielfältigung von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Für Standardanwendungen, die der Kontrolle dienen, wie Kolonie-PCR, wurde die *Taq*

Polymerase eingesetzt. Als *template* der Kolonie-PCR wurde 1 μL einer Suspension aus einer Kolonie und 10 μL LB-Medium verwendet. Bei positivem Nachweis wurden die restlichen 9 μL zur Animpfung des jeweiligen Selektionsmediums genutzt. Die Amplifizierung eines DNA-Abschnitts für Genstilllegungsversuche wurde aufgrund der geringeren Fehlerrate mit einer *proof-reading* Phusion Polymerase durchgeführt (**Tab. 10**).

Tab. 10: Pipettierschema für die Polymerase-Kettenreaktion.

	<i>Taq</i> Polymerase	Phusion Polymerase
Puffer	2,0 μL (10x Puffer)	4 μL (5x Puffer)
dNTPs [10 μM]	0,5 μL	0,5 μL
Forward Primer [10 μM]	0,5 μL	0,5 μL
Reverse Primer [10 μM]	0,5 μL	0,5 μL
Polymerase	0,5 μL	0,1 μL
<i>Template</i>	1 μL	1 μL
Wasser	ad 20 μL	ad 20 μL

Im Allgemeinen wurde beim Pipettieren mit einem Master-Mix, bestehend aus Puffer, dNTPs, Primerpaar und Polymerase, gearbeitet, so dass den einzelnen Proben nur noch das *template* hinzugefügt werden musste. Anschließend wurde die PCR mit folgendem Temperaturprogramm (**Tab. 11**) durchgeführt, wobei die initiale Denaturierung bei der Kolonie-PCR auf 10 min bei 95 °C verlängert wurde, um einen vollständigen Zellaufschluss zu gewährleisten.

Tab. 11: Standard-Temperaturprogramm der Polymerase-Kettenreaktion.

	<i>Taq</i> Polymerase	Phusion Polymerase
Initiale Denaturierung	2 min bei 95 °C	2 min bei 95 °C
Denaturierung	15 sec bei 95 °C	10 sec bei 95 °C
Primerhybridisierung	40x 15 sec bei 58 °C	40x 15 sec bei 58 °C
Elongation	45 sec bei 72 °C	30 sec bei 72 °C
Finale Elongation	5 min bei 72 °C	5 min bei 72 °C

2.3.2.5. Agarosegelelektrophorese

Die Probe wurden entsprechend mit 10x DNA-Ladepuffer (Orange-G) versetzt und auf Agarosegelen (1,25 % Agarose in 1x TAE-Puffer, 0,00625 % Ethidiumbromid) bei 120 V in 1x TAE als Laufpuffer aufgetrennt. Zur Abschätzung der Größe und Menge der DNA-Fragmente dienten 6 μL eines DNA-Größenstandards ($c = 0,5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$).

2.3.2.6. Quantitative PCR (qPCR)

Zur quantitativen PCR wurde die cDNA 1:50 verdünnt, bzw. 1:4000 als Vorlage für das Referenzgen (*Interspacer* 26S-18S RNA), welches zum Normalisieren der Ergebnisse verwendet wurde. Mit der Software *geneious*TM wurden Primer konstruiert, die einen hohen GC-Anteil aufwiesen, nicht zur Bildung von Dimeren oder Haarnadeln neigten und ein Amplikon von etwa 200 bp Länge ergaben. Die Genspezifität des Amplikons wurde mit Hilfe der Genomdatenbank von *F. vesca* (Shulaev *et al.*, 2011) überprüft. Zur qPCR wurden 20 µL-Ansätze nach folgendem Schema vorbereitet:

10 µL SYBR[®] Green Mix
 0,6 µL forward Primer (10 µM)
 0,6 µL reverse Primer (10 µM)
 2 µL *template*
 6,8 µL Wasser

Für eine erhöhte Reproduzierbarkeit wurde stets mit einem Master-Mix, bestehend aus SYBR[®] Green Mix, Primerpaar und Wasser, gearbeitet.

Jede Reaktion wurde als Dreifachbestimmung mit folgendem Temperaturprogramm durchgeführt:

Initiale Denaturierung		10 min bei 95 °C
Denaturierung	40x	15 sec bei 95 °C
Primerhybridisierung		30 sec bei 60 °C
Elongation		15 sec bei 72 °C

Die amplifizierten Sequenzen wurde anschließend mittels einer Schmelzpunktanalyse, sowie einer gelelektrophoretischen Auftrennung der Fragmente (s. 2.3.2.5), kontrolliert.

Mit Hilfe der StepOnePlus Software wurden die Daten auf das Referenzgen normalisiert. Zur Berechnung der relativen Genexpression wurde die $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode angewandt (Raab *et al.* 2006) und die Werte als Änderung bezogen auf die Kontrolle (weiße oder unbehandelte Frucht) angegeben.

2.3.2.7. Konstruktion von p9U10-RNAi-Vektoren

Um die Funktion eines Kandidatengens zu untersuchen, wurde ein Konstrukt entworfen, mit dem die Expression des jeweiligen Gens herabreguliert werden sollte. Der Vektor p9U10-RNAi

enthält zwei gegenläufige 35S-Promotoren, die den dazwischen liegenden Bereich in beiden Richtungen ablesen lassen, was zur RNA-Interferenz führt. Begrenzt wird dieser Bereich durch Restriktionsschnittstellen von *Bam*HI und *Hind*III.

Aus cDNA roter Früchte von *F. × ananassa* cv. Elsanta wurde zunächst mit der Phusion Polymerase und dem entsprechenden Primerpaar ein PCR-Produkt mit glatten Enden amplifiziert. Die genspezifischen Primer wurden so konstruiert, dass sie jeweils eine Restriktionsschnittstelle besaßen. Während der *reverse* Primer direkt auf eine vorhandene *Bam*HI-Schnittstelle gelegt wurde, wurde beim *forward* Primer eine *Hind*III-Schnittstelle mit drei Basen als Überhang eingefügt.

Nach Restriktionsverdau (s. 2.3.2.8) mit *Bam*HI und *Hind*III wurden Vektor und PCR-Produkt ligiert (s. 2.3.2.9) und in kompetente *E. coli* NEB10-beta-Zellen transformiert (s. 2.3.2.11). Die isolierte Plasmid-DNA wurde anschließend in *A. tumefaciens* AgL0 transformiert und zur Transfektion von Erdbeerfrüchten verwendet.

2.3.2.8. Restriktion

Folgender Restriktionsansatz wurde mit 4 µL p9U10-Vektor (c = 250 ng/µL) bzw. 16 µL PCR-Produkt (c = 15 ng/µL) für 2 h bei 37 °C durchgeführt:

2 µL *Fast Digest* 10x Puffer
1 µL *Bam*HI
1 µL *Hind*III
1 µg DNA
ad 20 µL Wasser

Anschließend wurde zum Ansatz des Vektors 1 µL CIP (Alkaline Phosphatase) zugegeben und eine weitere Stunde bei 37 °C inkubiert, um eine Re-Ligation zu verhindern.

Die Ansätze wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt und die jeweilige Bande des verdauten Vektors bzw. PCR-Produkts unter UV-Licht ausgeschnitten. Die DNA wurde mit Hilfe eines kommerziellen Kits extrahiert und mittels Nanodrop quantifiziert.

2.3.2.9. Ligation

Zur Ligation wurde folgender Ansatz vorbereitet:

- 1 μ L T4 DNA Ligase
- 1 μ L 10x Puffer
- 2 μ L p9U10 (verdaut)
- 6 μ L PCR-Produkt (verdaut)

Für den Kontrollansatz wurden 6 μ L Wasser statt PCR-Produkt eingesetzt. Die Ligation fand bei 4 °C über Nacht statt.

2.3.2.10. Herstellung kompetenter *Escherichia coli* NEB10-beta Zellen

Entsprechend einer 1:100-Verdünnung wurden 250 mL LB-Medium mit 2,5 mL einer Übernachtskultur von *Escherichia coli* NEB10-beta angeimpft und bis zu einer OD_{600} von 0,5 – 0,6 bei 37 °C angezogen. Durch 5-minütiges Zentrifugieren bei 4500 g und 4 °C wurden die Zellen geerntet und mit 30 mL 0,1 M Calciumchloridlösung (4 °C) gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren wurde das Pellet in 2 mL 0,1 M Calciumchloridlösung (15 % Glycerin, 4 °C) resuspendiert, zu je 200 μ L aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

2.3.2.11. Transformation von *Escherichia coli*

Ligations- und Kontrollansatz (s. 2.3.2.9) wurden vor der Transformation für 10 min bei -80 °C inkubiert und anschließend gemeinsam mit chemokompetenten *Escherichia coli* NEB10-beta Zellen in 10 min auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 5 μ L Plasmid-DNA zu je 100 μ L kompetenten *E. coli* Zellen wurde vorsichtig gerührt und für 30 min auf Eis inkubiert. Mit einem Hitzeschock für 30 sec bei 42 °C im Wasserbad, gefolgt von weiteren 5 min auf Eis wurde die Transformation beendet und die Zellen zur Expression der für die Antibiotikaresistenz nötigen Enzyme für 1-2 h in 950 μ L SOC-Medium bei 37 °C kultiviert. Durch Zentrifugation (4500 g, 30 sec) wurden die Zellen auf etwa 100 μ L aufkonzentriert, auf einer auf 37 °C vorgewärmten Selektionsplatte (LB-Agar mit 50 μ g Spectinomycin/mL) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Gewachsene Kolonien wurden mit einer Kolonie-PCR getestet und ggf. in flüssigem Selektionsmedium über Nacht bei 37 °C weiter kultiviert. Mit Hilfe eines kommerziellen Kits wurde die Plasmid-DNA der Übernachtskultur isoliert und nochmals mit einer Standard-PCR kontrolliert.

2.3.2.12. Herstellung kompetenter *Agrobacterium tumefaciens* AgL0 Zellen

200 mL YEB-Medium (50 µg Rifampicin/mL) wurden mit einer Übernachtskultur von *A. tumefaciens* AgL0 angeimpft und für 3 – 4 h bei Raumtemperatur bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 1,0 angezogen. Nach Zentrifugation (3000 g, 4 °C, 20 min) wurde das Pellet in 1 mL eiskalter 20 mM Calciumchloridlösung resuspendiert, zu je 250 µL aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

2.3.2.13. Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* AgL0

Die Transformation kompetenter *A. tumefaciens* AgL0 Zellen erfolgte nach Höfgen und Willmitzer (1988). Nach 10-minütigem Auftauen auf Eis wurden 250 µL Zellen mit 5 µL Plasmid-DNA (Kontrollansatz mit 5 µL Wasser) vermischt und für jeweils 5 min auf Eis, in flüssigem Stickstoff und abschließend bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Nach Zugabe von 1 mL LB-Medium wurde für 2-4 h bei 28 °C geschüttelt. Durch Zentrifugation (6000 g, 4 °C, 30 sec) wurde die Zellsuspension auf etwa 100 µL aufkonzentriert, auf LB-Agar-Platten mit je 50 µg/mL Spectinomycin und Rifampicin ausplattiert und für 2 – 3 Tage bei 28 °C kultiviert.

Analog zu 2.3.2.11 wurden gewachsene Kolonien und anschließend isolierte Plasmid-DNA mit PCR getestet.

2.3.2.14. Anlegen von Glycerinkulturen

Zur Langzeitlagerung von Kulturen wurden 750 µL der entsprechenden Übernachtskultur mit der gleichen Menge 50 % Glycerin vermischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.3.2.15. Transfektion der Erdbeerfrüchte mit *A. tumefaciens*

Die Vorbereitung der Zellen auf die Infiltration verlief nach Spolaore *et al.* (2001) und Hoffmann *et al.* (2006). 200 mL LB-Medium mit Rifampicin und Spectinomycin (je 50 µg/mL) wurden mit einem transformierten *A. tumefaciens* AgL0 Glycerolstock angeimpft und für 2 Tage bei 28 °C kultiviert. Nach Zentrifugation bei 5000 g und 4 °C für 10 min wurde das Pellet in 100 mL MMA-Medium gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 20 – 25 mL MMA-Medium aufgenommen, so dass die Zellsuspension eine OD₆₀₀ von 2,2 – 2,4 aufwies.

Zur Infiltration wurden Erdbeerfrüchte der Sorte Elsanta im weißen oder fortgeschrittenen grünen Stadium gewählt. Pro Frucht wurde etwa 1 mL Zellsuspension mit einer Spritze und einer Sterican-Nadel (Gr. 20; 0,4 x 20 mm; Braun) injiziert. Die Früchte wurden anschließend kurz mit 70 % Ethanol abgewischt und etwa 14 Tage nach Injektion geerntet.

Zur Kontrolle diente ein *intron-hairpin* (ihp)-RNA-Konstrukt aus dem pBI121-Vektor mit dem Glucuronidase-Gen (GUS), dessen *sense* und *antisense* Strang durch das Intron der Chinon-Oxidoreduktase unterbrochen ist (pBI-Intron).

2.3.2.16. Klonierung und Expression von *F. × ananassa* Peroxidase 27 (*FaPRX27*)

Die Klonierung und Expression der Peroxidase 27 aus *F. × ananassa* wurde von Dr. Stephanie Hücherig durchgeführt. Die Vollängesequenz von gene19544 (*FaPRX27*) wurde mit den Primern for_19544 (5'-ATG GCT GCT ACT TCA A-3') und rev_19544 (5'-CTA ATT GAT CTT GCT GC-3') aus der cDNA roter Früchte von *F. × ananassa* cv. Elsanta isoliert. Das Amplifizierungsprodukt wurde mit einem *A-tail* (Rest aus Adenosinnukleotiden) versehen und in den pGEM-T-easy Vektor kloniert. Das Ligationsprodukt wurde in kompetente *E. coli* NEB10-beta Zellen transformiert. Die Identifizierung des geklonten Gens erfolgte durch Sequenzierung des eingebauten Amplikons (MWG Biotech, Ebersberg) und anhand eines Restriktionsverdaus mit *Pst*I/*Sac*I und *Nco*I. Die Schnittstellen für *Sma*I und *Xho*I wurden durch *sense* bzw. *antisense* Primer eingeführt. Das PCR-Produkt wurde mit einer codierenden Region für einen C-terminalen GST-*tag* in den pGEX Expressionsvektor kloniert und mittels Sequenzanalyse kontrolliert.

Der *FaPRX27*-Expressionsvektor wurde anschließend in *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS-Zellen transformiert, welche über Nacht bei 37 °C in LB-Medium mit Carbenicillin (50 µg/mL) und Chloramphenicol (34 µg/mL) aufgezogen wurden. Die gewachsenen Kulturen wurden mit LB-Medium inklusive der entsprechenden Antibiotika auf ein Endvolumen von 400 mL und eine OD₆₀₀ von 0,06 verdünnt und anschließend bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 – 0,4 kultiviert. Zur Induktion der Proteinexpression wurden 200 µL 1 M IPTG zugegeben und über Nacht (19 – 24 h) bei 16 – 18 °C inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet und bei -80 °C gelagert. Das Pellet wurde in 10 mL Extraktionspuffer (100 mM KP_i, pH 6,6, 0,5 % Triton X 100, 2 mM EDTA), dem zuvor 10 µL des Proteinaseinhibitors PMSF (10 mM in Isopropanol) zugegeben wurde, resuspendiert. Durch Ultraschallbehandlung (3x 30 min, 18 % Intensität) wurden die Zellen lysiert und anschließend kräftig gevortext. Der Proteinrohextrakt wurde zentrifugiert (6000 g, 4 °C) und der Überstand für die Peroxidase-Enzymassays eingesetzt.

2.3.2.17. Enzymassay mit *FaPRX27*

Die Überprüfung der Enzymaktivität wurde von Dr. Stephanie Hücherig nach Vitali *et al.* (1998) in Lösungen aus 2,8 mL Puffer (0,1 M KP_i, pH 7,0), 50 µL Substrat (18 mM), 50 µL H₂O₂ (30 %)

und 100 μL FaPRX27-Rohextrakt (1 mg/mL) durchgeführt. Der Reaktionsverlauf wurde photometrisch bei den jeweiligen Absorptionsmaxima der eingesetzten Substrate verfolgt.

Zusätzlich wurden 50 μL des Ansatzes abgenommen, mit 25 μL Methanol versetzt, gevortext und abzentrifugiert (14000 g , 5 min). Der Überstand wurde zur LC-MSⁿ-Analyse eingesetzt. Als Kontrolle wurden *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS-Zellen mit einem leeren pGEX Vektor transformiert und der resultierende Proteinextrakt unter den gleichen Bedingungen untersucht. Fernerhin dienen Ansätze ohne Proteinzusatz als weitere Kontrolle.

2.3.2.18. Proteinextraktion zur 2D-Gelelektrophorese

Die Proteinextraktion wurde nach Saravanan und Rose (2004) durchgeführt und erfolgte aus lyophilisiertem Material, welches zunächst rehydriert werden musste. Dazu wurden 500 mg gefriergetrocknetes Fruchtpulver mit 4 mL autoklaviertem Milli-Q-Wasser versetzt und homogenisiert. Anschließend wurden 15 mL eiskalter Proteinextraktionspuffer zugegeben und 30 min auf Eis inkubiert, wobei alle 5 min gevortext wurde. Nach Zugabe von 15 mL Phenol folgten weitere 30 min Inkubation auf Eis mit Vortexen in 5-minütigen Abständen. Anschließend wurde 20 min bei 17000 g und 4 °C zentrifugiert. Die Phenolphase (oben) wurde in ein neues Gefäß überführt, mit dem gleichen Volumen Proteinextraktionspuffer versetzt, 15 min auf Eis inkubiert und alle 5 min gevortext. Nach Zentrifugation (20 min, 17000 g , 4 °C) wurde die Phenolphase erneut wie beschrieben mit Proteinextraktionspuffer gewaschen. Die finale Phenolphase wurde in ein neues Gefäß überführt, mit dem fünffachen Volumen methanolischer gesättigter Ammoniumacetatlösung (ca. 8 mM) versetzt und zur Präzipitation der Proteine über Nacht bei -20 °C gelagert. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 17000 g und 4 °C wurde der Überstand verworfen, während das Pellet mit 6 mL -20 °C kaltem Methanol und zweimal mit je 6 mL Aceton (-20 °C) gewaschen wurde. Zur Entfernung von Lösungsmittelresten wurde 1 min bei 6000 rpm zentrifugiert und das Pellet 5 min bei 37 °C getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 500 μL IEF-Puffer resuspendiert, falls nötig zentrifugiert, und in ein 1,5-mL-ERG überführt.

2.3.2.19. Gießen der SDS-Gele

Für ein 2D-Gel wurden 60 mL SDS-Gelpuffer (10 %) verwendet:

28,92 mL Wasser

15 mL 1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)

15 mL 40 % Acrylamid-/Bisacrylamidlösung (29:1) [Lagerung bei 4 °C]

600 µL 10 % SDS

30 µL TEMED [Lagerung bei 4 °C]

450 µL 10 % Ammoniumpersulfat [Lagerung bei -20 °C]

Da TEMED und Ammoniumpersulfat die Vernetzungsreaktion auslösen, wurde nach deren Zugabe und kurzem Umschwenken sofort mit dem Gießen des Gels begonnen. Um eine gleichmäßige Abschlusslinie zu erhalten, wurden die Gele mit Isopropanol überschichtet. Nach 2 h Aushärtung wurden die Gele mit feuchtem Papier und Klarsichtfolie umwickelt und bis zum Gebrauch bei 4 °C gelagert.

2.3.2.20. Isoelektrische Fokussierung (1. Dimension)

Nachdem die Proteine mittels eines modifizierten Bradford-Assays von Bio-Rad quantifiziert wurden, wurden 400 µg Protein in folgendem Ansatz nach Görg und Weiss (2004) zur Elektrophorese eingesetzt:

400 µg Protein

6 µL Bio-Lyte® Ampholytengemisch

ad 300 µL IEF-Puffer inkl. DTT und Bromphenolblau

Die Rehydrierung der IPG-Gelstreifen mit den 300 µL des Probenansatzes erfolgte aktiv bei 50 V für 12 h. Um Verdunstung zu vermeiden, wurden die Gelstreifen mit etwa 1,5 mL Mineralöl überschichtet. Im Anschluss wurden die Proteine bei der isoelektrischen Fokussierung (1. Dimension) anhand ihres isoelektrischen Punktes mit folgendem Programm aufgetrennt:

Schritt 1: 500 V, 1 h, linear

Schritt 2: 10000 V, 5 h, linear

Schritt 3: 10000 – 60000 Vh, linear

Schritt 4: 500 V, 24 h, rapid (Standby-Zustand)

2.3.2.21. SDS-PAGE (2. Dimension)

Zur Vorbereitung der IPG-Gelstreifen auf die SDS-PAGE (2. Dimension) wurden diese einer zweistufigen Equilibrierung unterzogen. Dazu wurden pro Streifen je 3,5 mL

Equilibrierungspuffer I (inkl. DTT) in einer Wanne vorgelegt und die Gelstreifen unter leichtem Schwenken für 15 min inkubiert. Anschließend wurden die Streifen in Equilibrierungspuffer II (inkl. Iodacetamid) überführt und nochmals für 15 min behandelt.

Die Gelstreifen wurden luftblasenfrei an die SDS-Gele angelegt, ebenso ein Stückchen Filterpapier mit 5 µL Proteinmarker, und mit Agaroselösung überschichtet. Nach 5 min Aushärtung wurden die Gele in die mit 1x SDS-Laufpuffer gefüllte Kammer überführt. Die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgte bei 75 V für ca. 17 h. Die zweite Dimension wurde beendet, sobald die Bromphenolblaufront etwa 1 cm vor Ende des Gels angekommen war.

2.3.2.22. Kolloidale Coomassie-Färbung

Aufgrund der höheren Sensitivität gegenüber der herkömmlichen Coomassie-Färbung (Coomassie/Ethanol/Eisessig, 0,1/40/10) wurden die 2D-Gele mit einer kolloidalen Coomassie-Lösung nach Neuhoff *et al.* (1988) gefärbt. Hierzu wurden die aus den Gekassetten entnommenen Gele zunächst für 1,5 h unter leichtem Schwenken in Fixierlösung behandelt. Nach zweimaligem Waschen mit dest. Wasser wurden die Gele mit 250 mL kolloidaler Coomassie-Färbelösung versetzt und unter leichtem Schwenken über Nacht eingefärbt. Nach Waschen mit dest. Wasser wurde zweimal mit je 125 mL Entfärbelösung für 1 min entfärbt, bevor die Gele nach nochmaligem Waschen mit dest. Wasser in Aufbewahrungslösung bei 4 °C gelagert wurden. Die Dokumentation der 2D-Gele erfolgte über einen densitometrischen Scanner und die Proteom-Weaver Software.

2.3.2.23. Entwicklung und Bearbeitung der Transkript-Datenbank (EST-Datenbank)

Der Aufbau der EST-Datenbank erfolgte durch Prof. Dr. Juan Muñoz-Blanco (Universidad de Córdoba, Spanien). Mit Hilfe des EGassemblers (www.egassembler.hgc.jp) wurden die Rohdaten von insgesamt 29741 EST (*expressed sequence tags*)-Sequenzen der Erdbeere bearbeitet (Masoudi-Nejad *et al.*, 2006). Dabei wurden Vektor- und Adaptersequenzen, kleine RNA, poly-T-tails, *low-complexity sequences*, repetitive Einheiten, wie *simple repeats*, *rolling-circles*, *interspersed repeats*, sowie Sequenzen mit weniger als 100 bp Länge und mehr als 3 % N entfernt. Anschließend wurden Sequenzen aus der *Arabidopsis* RepBase Datenbank (hauptsächlich Retroelemente und DNA Transposons) mit Hilfe der langsamen Methode (0 – 5 % gesteigerte Sensitivität gegenüber der schnellen) ausgesondert, ebenso wie Vektor- und Organellensequenzen mittels der *Core NCBI* Vektor- bzw. *Arabidopsis thaliana* Plastid-Datenbank. Nach Entfernung der Redundanzen wurden die ESTs unter Verwendung des CAP3-Programms (*max. gap length*: 20 Basen, *identity cutoff*: > 75 %, *overlap similarity score cutoff*: 700) zusammengeführt und gruppiert. Auf diese Weise konnte

aus überlappenden DNA-Sequenzen (*contigs*) eine komplette, zusammengehörende Datenbank in Form einer Textdatei aufgebaut werden.

Mit dem JAVA Paket Blast2Go (Götz *et al.*, 2008) wurde eine Ähnlichkeitssuche und eine funktionale Annotation mit den zusammengeführten Sequenzen durchgeführt. Dies geschah in mehreren aufeinanderfolgenden Schritten, um die putativen Funktionen möglichst vieler Sequenzen bestimmen zu können. Dazu wurden die Sequenzen zunächst in einer BlastX-Suche (*cutoff expect value: 0,00001*) mit der korrespondierenden NCBI Proteindatenbank (nicht-redundante Proteinsequenzen) abgeglichen. Für alle erfassten Sequenzen wurden funktionale Annotationen mittels Gene Ontology (GO), InterPro, Enzyme und KEGG zusammengetragen. Zur weiteren Bearbeitung und Analyse wurden Sequenzen, denen bei der BlastX-Suche E-Werte oberhalb von $1,0E-15$ zugewiesen wurden, ausgeschlossen. Die Annotation mittels GO wurde unter Nutzung der GO Blast2Go Datenbank auf dem spanischen Server (Stand Mai 2010) durchgeführt. Die Sequenzen, die bei der BlastX-Suche nicht erfasst werden konnten, wurden für weitere Suchen mittels BlastN und TblastX eingesetzt.

2.3.2.24. Microarray-Analyse

Die Microarray-Analyse erfolgte durch Prof. Dr. Juan Muñoz-Blanco (Universidad de Córdoba, Spanien). Aus der Transkript-Datenbank nicht-redundanter Sequenzen wurde eine auf Oligonukleotiden (60-mer Länge) basierende Microarray-Plattform mit insgesamt 18162 *unigenes* von *F. × ananassa* entworfen (NimbleGen Systems, Basel, CH). Für jede Sequenz wurden vier Oligonukleotide pro Block und vier Blöcke pro Datenset gedruckt.

Aus dem Blütenboden der Erdbeere extrahierte Gesamt-RNA wurde mit DNase I behandelt und gemäß den Herstellerangaben mit Qiagen-Säulen (Qiagen, Hilden) aufgereinigt. Markierung (Cy3), Hybridisierung und Normalisierung der Proben erfolgte wie von NimbleGen Systems unter „Expressionsanalyse“ (www.nimblegen.com) publiziert. Mittels des cDNA-Synthese-Systems von Roche (Roche, Basel, CH) wurden 10 µg Gesamt-RNA in Volllänge revers transkribiert und die cDNA mittels des *High Pure PCR Product Purification Kits* (Roche) laut den Herstellerangaben aufgereinigt. Je Probe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Je 1 µg cDNA wurde unter Verwendung des *NimbleGen One-Color DNA Labeling Kits* (NimbleGen Systems) entsprechend des Protokolls mit Cy3-Nonameren markiert. Markierte cDNA-Proben wurden durch beliebige Zuweisung auf die 12x135K Array-Plattform aufgetragen. Jeder Träger enthielt zwölf unabhängige Arrays, je mit 140572 Sonden, die 35143 Gene abdeckten (vier Sonden pro Targetgen). Die Arrays wurden anschließend für 16 Stunden bei 42 °C hybridisiert, gewaschen, getrocknet und mit einer Auflösung von 2 µm eingescannt (NimbleGen MS 200

Microarray Scanner). Mit der NimbleGen v2.6 Software wurden die Fluoreszenzintensitäts-Signale der eingescannten Bilder durch *Robust-Multi-Array-Analyse* in relative Genexpression umgerechnet, unabhängig für jedes der drei Replikate (ausgegangen von je 10 µg Gesamt-RNA). Weitere Datenauswertungen der Expressionsanalysen erfolgten mit der DNASTAR Software (www.dnastar.com). Mittels t-Test und FDR (Benjamini und Hochberg, 1995) wurden auf einem Signifikanzniveau von $p < 0,01$ statistisch signifikante Unterschiede in der Genexpression erfasst.

2.3.2.25. Genotypisierung und QTL-Analyse

Die Detektion von QTLs (*quantitative trait loci*) erfolgte durch Dr. Beatrice Denoyes (INRA, Villenave d'Ornon, Frankreich) und Dr. Amparo Monfort (IRTA, Barcelona, Spanien). Um die Genomsequenz in der Nähe des *FaPRX27*-Gens zu ermitteln, wurde die Datenbank von *F. vesca* (Shulaev *et al.*, 2011) untersucht. Mit Hilfe der *Tandem Repeat Finder* Software (www.tandem.bu.edu/trf/trf.html) konnte ein Mikrosatellit (*simple sequence repeats* (SSR)) 50 kb *upstream* des Gens detektiert werden. Der Entwurf von Primern, die den Mikrosatellit umgeben, erfolgte mit der Software Primer3 (www.frodo.wi.mit.edu). Die spanische Segregationspopulation wurde mit dem Marker SSRCL317CGf genotypisiert. Dazu wurde die DNA von 93 Individuen der F2-Kreuzungspopulation (Dover × Camarosa) extrahiert und mittels PCR und folgenden Primern amplifiziert: SSRCL317CGf_forward 5' AGT GTG CAG TTT CCA CAA CG 3' und SSRCL317CGf_reverse 5' TGC GGA ATT GAT GTT CTG TC 3'. Der Marker SSRCL317CGf wurde mit der JOINMAP Software (van Ooijen, 2006) lokalisiert. Die Detektion von QTLs erfolgte mittels *composite interval mapping* (CIM) (Zeng, 1994) unter Verwendung der QTL Cartographer Software (Basten *et al.*, 1997) für jedes Elternteil separat. Während für die französische F1-Segregationspopulation Capitola × CF1116 jeweils die weibliche bzw. männliche Genkarte verwendet wurde, kamen bei der spanischen Kreuzungspopulation Kopplungskarten zum Einsatz. Um die fünf Co-Faktoren mit den höchsten F-Werten auszuwählen, wurde eine Regression stufenweise vorwärts/rückwärts durchgeführt, bevor die QTLs mittels CIM detektiert werden konnten. Eine Fenstergröße von 10 cM um das Testintervall, in dem die Co-Faktoren nicht berücksichtigt wurden, wurde festgelegt (QTL Cartographer Modell 6). Der Grenzwert für die statistische Signifikanz eines putativen QTLs wurde anhand von Permutationen des Datensets bestimmt. Nach 1000 Permutationen wurde eine mittlere Bestimmungsgrenze von 3,1 für die französische bzw. 3,0 für die spanische Segregationspopulation gewählt. Die Werte entsprachen einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ auf Genomebene. Der Anteil der phänotypischen Variation, die durch den jeweiligen signifikanten Marker erklärt wurde, wurde als das Bestimmtheitsmaß (R^2) an der höchsten QTL-Position mittels der QTL Cartographer Software abgeschätzt.

3. Ergebnisse

3.1. *Metabolite Profiling*

3.1.1. Analyse der spanischen Sortenkollektion von 2009

Methanolische Extrakte lyophilisierter Erdbeerfrüchte wurden mittels LC-MSⁿ analysiert. Dabei wurden die in **Tab. 12** aufgelisteten Metabolite relativ zum internen Standard quantifiziert und den jeweiligen Metabolit-Gruppen zugeordnet. Durch Addition der Gehalte an Phenylpropanen, Flavonoiden, Anthocyanen und Ellagsäure wurde ein „Gesamtpolyphenolgehalt“ gebildet. Die Methode diente nicht zur Ermittlung absoluter Konzentrationen, sondern ermöglichte vielmehr, innerhalb eines kurzen Zeitraums eine große Anzahl verschiedener Sorten anhand vieler Metabolite miteinander zu vergleichen und nach ihren relativen Gehalten zu sortieren.

Tab. 12: Mittels LC-MSⁿ quantifizierte Metabolite und Zuordnung zu den jeweiligen Gruppen.

Phenylpropane	Flavonoide
<i>p</i> -Cumarsäure-glucoseester/-glucosid*	(Epi)Afzelechin-(epi)catechin Dimere*
Ferulasäure-glucoseester	(Epi)Afzelechin-glucosid
<i>p</i> -Hydroxybenzoesäure-glucoseester	Catechin
Kaffeesäure-glucoseester	(Epi)Catechin Dimere (Proanthocyanidine)*
Zimtsäure-glucoseester	Epicatechin
	Naringenin-glucosid
	Quercetin-3- <i>O</i> -glucosid
	Quercetin-3- <i>O</i> -glucuronid
	Kaempferol-3- <i>O</i> -glucosid
	Kaempferol-3- <i>O</i> -glucuronid
	Kaempferol-3- <i>O</i> -(6"-cumaroyl)-glucosid
Anthocyane	Organische Säuren und andere
Cyanidin-3- <i>O</i> -glucosid	Ascorbinsäure
Epiafzelechin-(4 α →8)-pelargonidin-3- <i>O</i> -glucosid	DMHF-glucosid
Pelargonidin-3- <i>O</i> -glucosid	Ellagsäure
Pelargonidin-3- <i>O</i> -(6"-malonyl)-glucosid	Zitronensäure
Pelargonidin-3- <i>O</i> -rutinosid	

* Aufgrund schlechter Trennung als Summe angegeben.

Die Analyse einer Kollektion von 16 in Spanien verfügbaren Sorten ist in **Abb. 9** zusammengefasst.

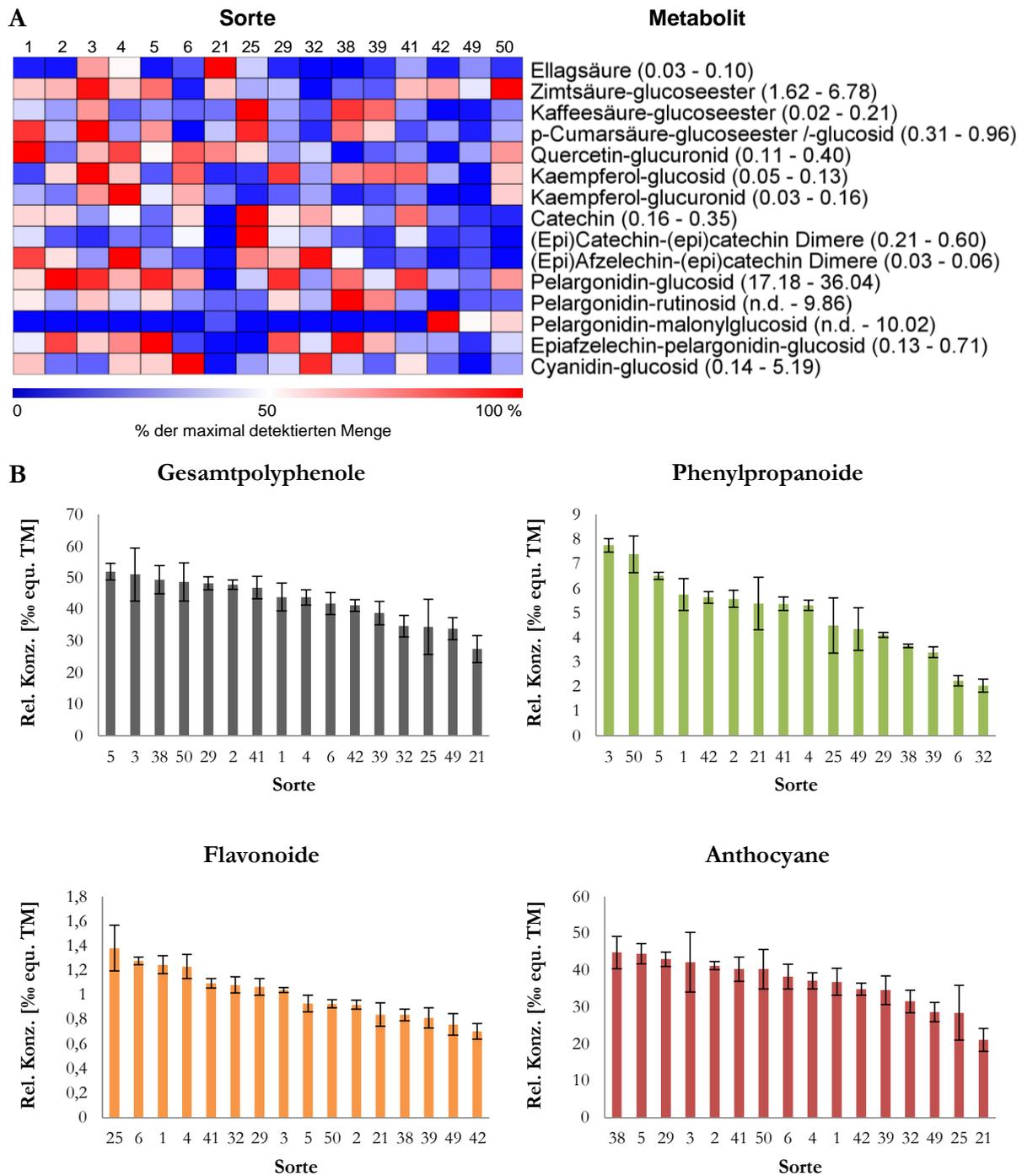


Abb. 9: LC-MSⁿ-Analyse 16 verschiedener Sorten aus Spanien, 2009. **A)** Darstellung der Gehalte verschiedener Metabolite in einer *Heat Map*. **Spalten:** Sorten, **Zeilen:** Metabolite, **in Klammern:** Bereich der gemessenen relativen Konzentrationen [%o equ. TM], **n.d.** = nicht detektierbar, **Farbskala:** 0 % = niedrigster Wert (blau) bis 100 % = höchster Wert (rot). **B)** Nach absteigenden relativen Konzentrationen (\pm SA) an Gesamtpolyphenolen, Phenylpropanoiden, Flavonoiden und Anthocyanen geordnete Sorten.

Unterschiede zwischen den analysierten Sorten sind anhand der roten und grünen Rechtecke in der *Heat Map* ersichtlich. Eine rote Färbung steht für den höchsten Gehalt des jeweiligen Metaboliten im Vergleich zu den anderen Proben, blau für den geringsten. Während manche Proben wie #49 (cv. Darlisette) durchweg niedrige Gehalte aufwiesen, produzierten andere Sorten wie #3 (cv. Ventana) hohe Mengen an den meisten quantifizierten Metaboliten und standen somit für eine generell erhöhte Biosynthese von löslichen Polyphenolen. Einige Sorten fielen durch ihre Präferenz bezüglich bestimmten Verbindungen auf. So bestach #21 (cv. Sweet Charlie) durch die höchste Konzentration an Ellagsäure, wobei andere Metabolite nur wenig akkumuliert wurden. Bei #25 (cv. Selva AF) schien sich die Polyphenol-Biosynthese auf *upstream*-Produkte zu konzentrieren, da im Gegensatz zu Anthocyanen vornehmlich Phenylpropanoide und Flavonoide gebildet wurden. Dies zeigt sich ebenfalls in den zusammenfassenden Säulendiagrammen. Während #25 den höchsten Flavonoidgehalt besitzt, ordnet sie sich bei den Gesamtpolyphenolen aufgrund des geringen Anthocyangehaltes am unteren Ende ein.

Im Vergleich zu den anderen Proben der Kollektion enthielt #38 (cv. Camarosa) die höchste relative Konzentration an Anthocyanen, #21 und 25 hingegen die geringsten Gehalte. Durch diese Analyse ließen sich zudem Beobachtungen, wonach die Früchte einiger Sorten bereits visuell unterschieden werden konnten, bestätigen. So fielen etwa #21 und 25 durch ihre helle Färbung auf, während #38 eine tiefe, dunkelrote Farbe besaß.

Neben den Rückschlüssen über die unterschiedliche Regulierung der Polyphenol-Biosynthese der verschiedenen Sorten ließen sich anhand der *Heat Map* auch Aussagen über die Akkumulation ähnlicher Metabolite treffen, indem sie ähnliche Verteilungsmuster zwischen den Proben zeigten. So reicherten sich Catechin und Catechin-Dimere (Proanthocyanidine) in den gleichen Sorten an bzw. ab. Eine Parallelität der Verteilung zeigte sich ebenfalls bei Pelargonidin-glucosid, Pelargonidin-rutinosid und Epiafzelechin-pelargonidin-glucosid, sowie bei Kaffeesäure-glucoseester und *p*-Cumarsäure-glucoseester/-glucosid. Zwischen Quercetin-glucuronid, Kaempferol-glucuronid und Kaempferol-glucosid konnte, wenn auch in einem schwächeren Ausmaß, eine parallele Verteilung beobachtet werden, wobei sich die beiden Glucuronide ähnlicher verhielten als Kaempferol-glucuronid zu -glucosid. Auf diese Weise ließen sich verwandte Bildungswege in der Biosynthese verdeutlichen.

Zudem konnte anhand der *Heat Map* gezeigt werden, dass manche Verbindungen größeren Schwankungen ausgesetzt waren als andere. Hinter dem jeweiligen Metaboliten geben die Werte in Klammern den Bereich zwischen niedrigster und höchster gemessener relativer Konzentration an. Die Varianz zwischen den verschiedenen Sorten bezüglich Gesamtpolyphenolgehalt fiel mit einem Faktor von etwa 2 geringer aus als die Varianz bei bestimmten Einzelverbindungen.

Obwohl manche Substanzen ebenfalls um Faktor 2 variierten, schwankten die meisten um Faktor 4 – 5. Deutlicher wurden die Schwankungen z.B. bei Cyanidin-glucosid, welches in #6 (cv. Macarena) mit einem 35-fach höheren Gehalt als in #49 gemessen wurde. Pelargonidin-rutinosid lag in etwa 10 % der Proben unterhalb der Nachweisgrenze (NWG) von 0,12 mg/g TM, Pelargonidin-3-O-(6''-malonyl)-glucosid sogar in 75 % der Proben (NWG = 0,05 mg equ./g TM).

Metabolite, die starken Schwankungen unterworfen sind, könnten als Markersubstanzen z.B. für einen erhöhten Polyphenolgehalt dienen. Eine Korrelation zwischen dem Vorhandensein von Pelargonidin-malonylglucosid und dem Gesamtpolyphenolgehalt konnte allerdings nicht nachgewiesen werden.

Die Analyse der organischen Säuren Ascorbinsäure (Vitamin C) und Zitronensäure verlief analog zur Polyphenolanalytik. Der Gehalt zeigte innerhalb der verschiedenen Proben nur geringe Varianz (< Faktor 2).

3.1.2. Analyse der Segregationspopulation Capitola × CF1116

Die Analyse der Segregationspopulation Capitola × CF1116 aus den Jahren 2009, 2010 und 2011 verliefen analog zu den Messungen der eben beschriebenen, spanischen Varietätenkollektion (s. Anhang **Tab. 24**).

Zwischen den Individuen der Segregationspopulation herrschte eine ebenso große Varianz wie zwischen verschiedenen Sorten. Das gleiche Bild präsentierte sich durchgängig über alle Jahrgänge hinweg. Beispielhaft sind in **Abb. 10** drei Diagramme der Segregationspopulation von 2011 dargestellt. Während die Summe aller quantifizierten Polyphenole (Gesamtpolyphenole) lediglich um Faktor 2,5 schwankte, zeigten sich bei einzelnen Verbindungen Unterschiede von Faktor 5 bis 10, bis hin zu Pelargonidin-malonylglucosid, welches nur in 50 % der Individuen nachgewiesen werden konnte.

Wie auch in der Sortenkollektion erschienen in der Segregationspopulation manche Genotypen mit durchgehend hohen bzw. durchgehend niedrigen Gehalten an allen quantifizierten Metaboliten, während andere Individuen nur bestimmte Verbindungen anreicherten. #6 produzierte in jedem der drei Jahre die meisten Gesamtpolyphenole, #49 die wenigsten. Des Weiteren zählten die Nummern 85, 215 und 216 in jedem der drei Jahre zu den Individuen, die am meisten Gesamtpolyphenole ausbildeten, während #10, 46, 75, 94, 109 und 180 stets niedrige Gehalte aufwiesen.

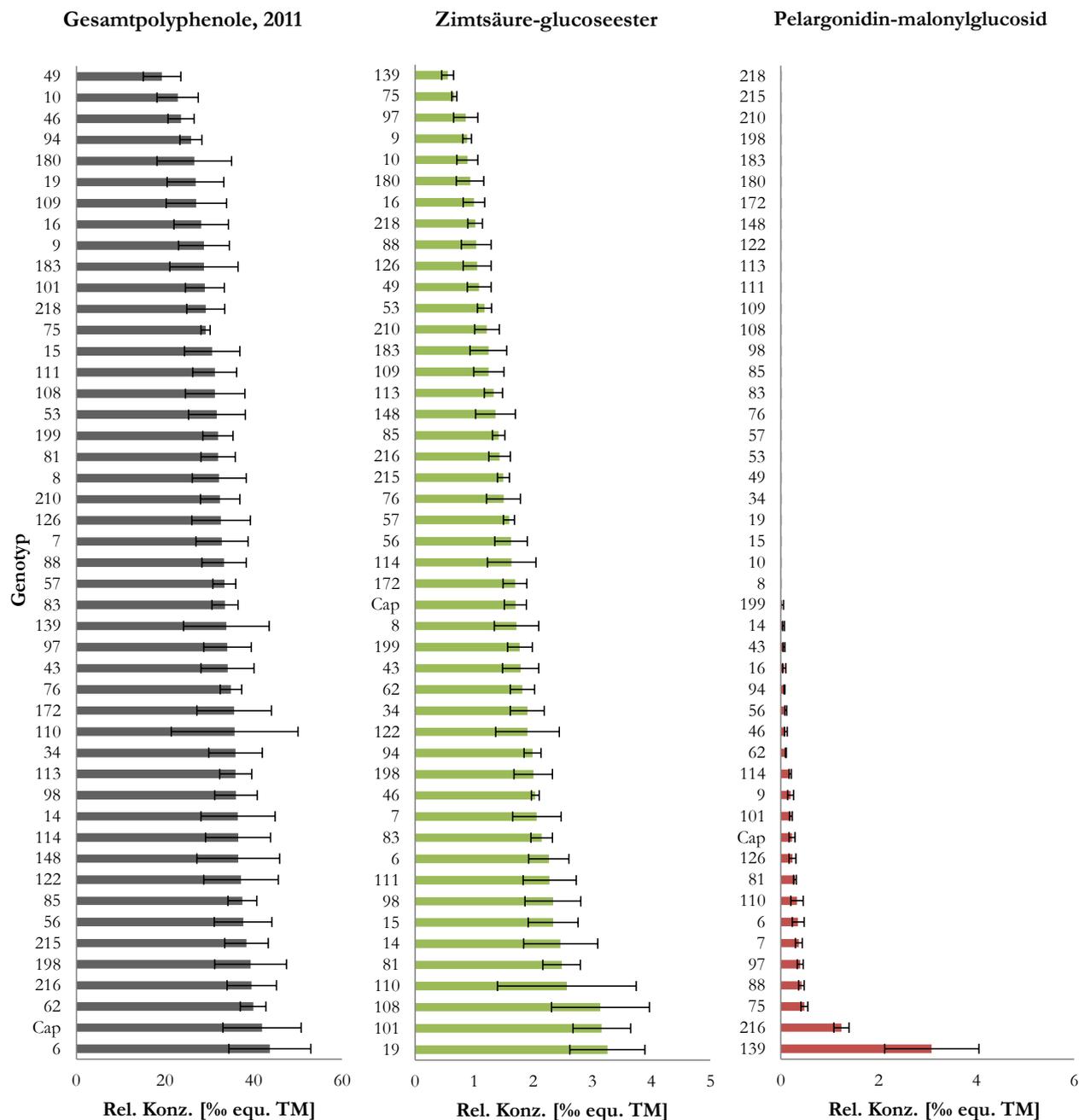


Abb. 10: Relative Konzentrationen (\pm SA) an Gesamtpolyphenolen, Zimtsäure-glucoseester und Pelargonidin-3-O-(6^o-malonyl)-glucosid der Segregationspopulation Capitola \times CF1116 aus dem Jahr 2011. Abgebildet sind nur Individuen, die in allen drei Jahrgängen vorkamen. **Cap** Capitola.

Beide Eltern der Segregationspopulation lagen mit ihren relativen Konzentrationen stets im Durchschnitt der gesamten Population, wobei Capitola meist leicht höhere Gehalte als CF1116 aufwies. Bezüglich der Anthocyane und Gesamtpolyphenole befanden sie sich gemeinsam im oberen Mittelfeld, betreffend der Flavonoide zeigten beide vergleichbar niedrige Gehalte. Unterschiede zwischen den Eltern ließen sich hinsichtlich der Phenylpropanoide erkennen, da Capitola hier relativ hohe Konzentrationen akkumulierte, während sich CF1116 mit geringen

Gehalten im Vergleich zu den anderen Individuen weiter unten einreichte. Eine deutlich unterschiedliche Akkumulation ergab sich bei DMHF-glucosid, wobei Capitola einen entscheidend höheren Gehalt als CF1116 zeigte.

Durch die Anwendung einer Hauptkomponentenanalyse (PCA) wurden weitere Differenzen zwischen den beiden Eltern der Segregationspopulation sichtbar (**Abb. 11**).

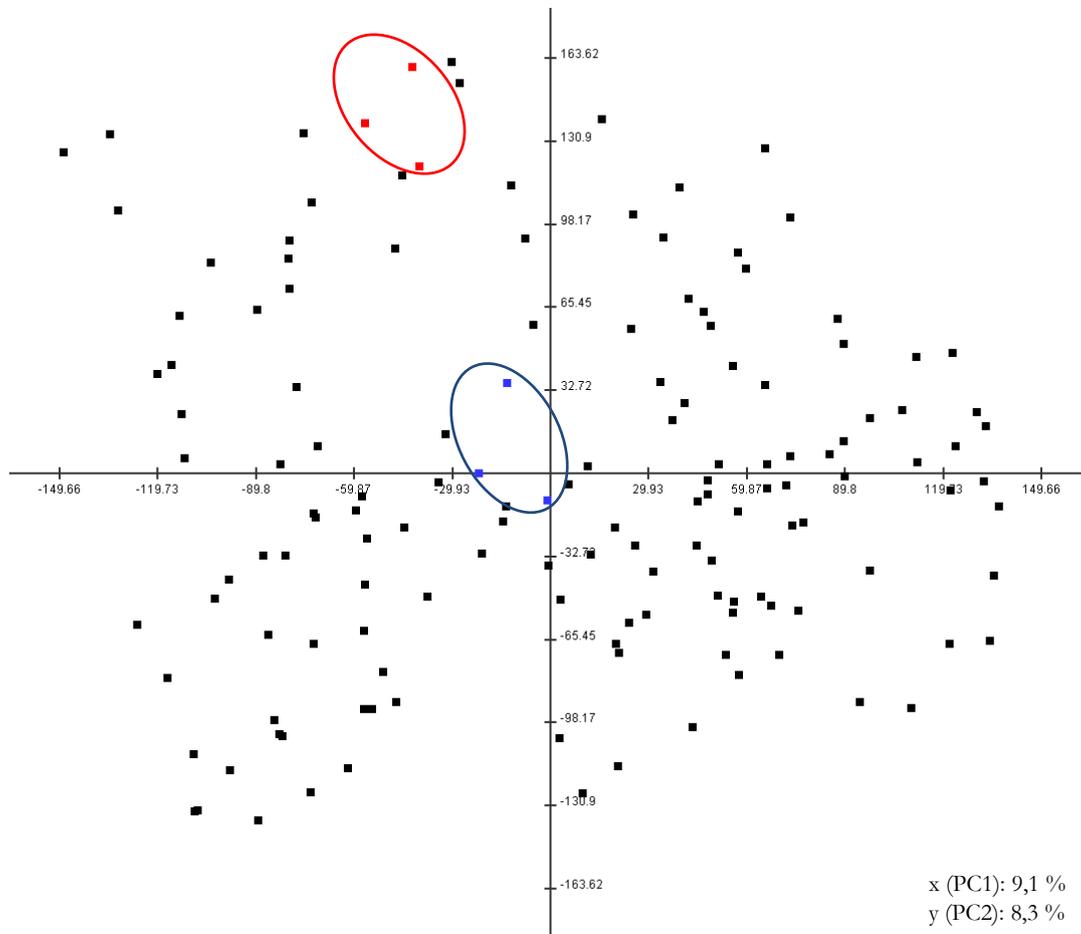


Abb. 11: Hauptkomponentenanalyse (PCA) aus LC-MS¹-Daten (positiver Ionisationsmodus) der Segregationspopulation Capitola × CF1116 aus dem Jahr 2010. Die drei biologischen Replikate von Capitola sind **rot** gefärbt, die von CF1116 **blau**.

Während sich CF1116 im Zentrum der PCA befand, sonderte sich Capitola an den oberen Rand ab. Laut eines Vergleichs mittels t-Test ($p < 0,0001$) lag dies an den höheren Gehalten an DMHF-glucosid und zwei unbekanntem Verbindungen (+MS¹ m/z 574 → MS² m/z 335 bei 38,5 min und +MS¹ m/z 556 → MS² m/z 333 bei 39,7 min) in Capitola.

Unter **3.9** ab S. 104 wird näher auf die bioinformatische Auswertung der Segregationspopulationen und Sortenkollektionen eingegangen.

3.1.3. Analyse der französischen Sortenkollektionen von 2010 und 2011

Die Analyse der Kollektionen von in Frankreich verfügbaren Sorten aus den Jahren 2010 und 2011 verliefen wie schon die Messreihe der Segregationspopulation gleichartig zu der Analyse der spanischen Sortenkollektion aus dem Jahr 2009 (s. Anhang **Tab. 25**).

Analog zu der spanischen Varietätenkollektion und der französischen Segregationspopulation ergaben sich auch hier Proben, die in beiden Jahren eine im Vergleich zu den anderen Sorten gesteigerte bzw. verminderte Produktion löslicher Polyphenole aufwiesen. Oft verhielten sich die Gehalte an Gesamtpolyphenolen gegensätzlich zu den relativen Konzentrationen an DMHF-glucosid. Die Sorten Camarosa, Cijosée, Cirafine und CF3149 akkumulierten in beiden Jahren hohe Gehalte an Gesamtpolyphenolen. Während CF3149 in beiden Jahren niedrige Gehalte an DMHF-glucosid aufwies, lag Cijosée mit den gebildeten Mengen in 2010 im Durchschnitt der Sortenkollektion. In 2011 besaß Cijosée nur noch eine der geringsten relativen Konzentrationen an DMHF-glucosid, zeigte aber zugleich den höchsten Gesamtpolyphenolgehalt aller Sorten auf. Cirafine schwankte ebenfalls von geringen Gehalten an DMHF-glucosid in 2010 zu mittleren in 2011, während sich Camarosa in beiden Jahren im Durchschnitt der Kollektion befand.

Die Sorten Sweet Charlie, Saint Joseph, CIR705, Cigaline und Ciloé enthielten in beiden Jahren geringe Gesamtpolyphenolgehalte. Während CIR705 bei der Produktion von DMHF-glucosid im Durchschnitt der Kollektion lag, zeigten die Sorten Sweet Charlie, Saint Joseph, Cigaline und Ciloé eine starke Akkumulation von DMHF-glucosid. In beiden Jahren wiesen Saint Joseph die höchste bzw. Ciloé die zweithöchste relative Konzentration auf. Die Anthocyanproduktion wurde in den Sorten Sweet Charlie, Cigaline und CIR705 zugunsten der Flavonoide vernachlässigt, bei Saint Joseph und Ciloé herrschten Phenylpropanoide vor.

Zusammenfassend konnte das gegensätzliche Verhalten der Gehalte an Gesamtpolyphenolen zu DMHF-glucosid in den Sorten Camarosa, Cijosée, Cirafine und CF3149 zugunsten der Gesamtpolyphenolproduktion und in den Sorten Sweet Charlie, Saint Joseph, Cigaline, Ciloé und CIR705 zugunsten von DMHF-glucosid beobachtet werden.

3.1.4. Rangkorrelationskoeffizienten

Wie bereits beschrieben, variierte der Gesamtpolyphenolgehalt zwischen den verschiedenen Sorten, sowie zwischen den Nachkommen der Kreuzungspopulation etwa um den Faktor 2,5 (**Tab. 13** jahrgangintern). Um die verschiedenen Jahrgänge der Segregationspopulation (2009, 2010, 2011) bzw. der französischen Varietätenkollektion (2010, 2011) vergleichen zu können, wurde für jedes Individuum der Gesamtpolyphenolgehalt in den einzelnen Jahrgängen gegenüber

gestellt (**Tab. 13** zwischen den Jahrgängen). Um Vergleichbarkeit mit den jahrgangsisernen Faktoren zu gewährleisten, wurde für jeden Genotyp jeweils die höhere relative Konzentration durch die niedrigere dividiert. Die Mittelwerte über alle Genotypen zeigten, dass die Gesamtpolyphenolgehalte in Sorten und Nachkommen der Segregationspopulation in aufeinander folgenden Jahrgängen lediglich um einen Faktor von 1,2 schwankten.

Tab. 13: Schwankungen des Gesamtpolyphenolgehalts. **Jahrgangsisern:** Verhältnis zwischen der Probe mit der höchsten und der Probe mit der niedrigsten gemessenen relativen Konzentration pro Jahrgang. **Zwischen den Jahrgängen:** Durchschnittliche Variation der Gesamtpolyphenolgehalte zwischen den Jahrgängen. **Var.** Varietätenkollektion, **Sp.** Segregationspopulation.

	Jahrgangsisern			Zwischen den Jahrgängen	
	2009	2010	2011	2009 vs. 2010	2010 vs. 2011
Sp. (n = 47)	2,5	2,8	2,3	1,2	1,2
Var. (n = 27)	--	1,9	2,9	--	1,2

Um weiterführende Vergleiche zwischen den Jahrgängen anzustellen, wurden Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman berechnet. Dazu wurden nur Individuen berücksichtigt, die in allen Jahrgängen verfügbar waren. Zunächst wurden die Proben nach absteigenden relativen Konzentrationen sortiert und mit Rängen (1. – n.) versehen. Anschließend wurden die Verteilungen der Proben pro Metabolit bzw. Metabolitgruppe (wie Gesamtpolyphenole) gegenübergestellt und verglichen, inwiefern der Rang einer jeden Probe in den verschiedenen Jahrgängen variierte. Je kleiner die Rangdifferenz, desto größer der Rangkorrelationskoeffizient und somit der Zusammenhang. Die Werte des Rangkorrelationskoeffizienten liegen zwischen -1 und +1 und können in Prozent angegeben werden, wobei 100 % eine perfekte Korrelation und -100 % einen genau entgegengesetzten Zusammenhang bedeuten. Da die Signifikanz von der Anzahl der Proben abhängt, sind in **Tab. 14** weitere kritische Werte angegeben.

Tab. 14: Grenzwerte [%] der Rangkorrelationskoeffizienten für folgende Signifikanzniveaus.

	p<0,05	p<0,01	p<0,001
Segregationspopulation (n = 47)	28,8 %	37,4 %	48,0 %
Varietätenkollektion (n = 27)	38,2 %	49,1 %	60,8 %

Da für die Berechnung der Rangkorrelationskoeffizienten jeweils nur zwei Verteilungen miteinander verglichen werden können, wurden die drei Jahrgänge der Segregationspopulation in

zwei Ansätzen bearbeitet: 2009 vs. 2010 und 2010 vs. 2011. Anschließend wurden Mittelwerte gebildet.

Wie bereits beschrieben, ergaben sich zwischen den drei Jahrgängen der Segregationspopulation einige Gemeinsamkeiten, wie z.B. Individuen, die dreijährig konstant hohe bzw. konstant niedrige Gehalte produzierten. Auf der anderen Seite schwankten einige Genotypen hinsichtlich ihrer Polyphenolproduktion in den verschiedenen Jahren. Aus der Berechnung des Rangkorrelationskoeffizienten ergab sich für den Gesamtpolyphenolgehalt eine positive Korrelation von 59 % (Mittelwert aus 60 % für den Ansatz 2009 vs. 2010 und 58 % für 2010 vs. 2011). Der Wert liegt oberhalb des Schrankenwertes für eine statistische Signifikanz von $p < 0,001$ und war zugleich der höchste beobachtete Wert. Die stärksten Produktionsschwankungen zeigten sich bei Quercetin-glucuronid, hier ergab sich ein Koeffizient von lediglich 12 % (2009 vs. 2010: 14 %, 2010 vs. 2011: 10 %). Die durchschnittliche Korrelation aller ermittelten Metabolite lag bei 44 % und lieferte wie bei den meisten Verbindungen in beiden Ansätzen sehr ähnliche Werte (2009 vs. 2010: 42 %, 2010 vs. 2011: 46 %). Die größten Unterschiede zwischen den beiden Ansätzen 2009 vs. 2010 und 2010 vs. 2011 ergaben sich für Zimtsäure-glucosester (32 % und 60 %) und Ellagsäure (26 % und 47 %).

Bei der Varietätenkollektion lag die Korrelation der Gesamtpolyphenole bei 55 % und somit auf vergleichbarem Niveau wie bei der Segregationspopulation, wenn auch die statistische Signifikanz mit $p < 0,01$ etwas geringer ausfiel, da hierbei die Probenanzahl kleiner war und die Grenzwerte dementsprechend höher lagen.

Für DMHF-Glucosid betrug der Rangkorrelationskoeffizient nur 33 %, obwohl die Anordnung der meisten Sorten in beiden Jahren sehr ähnlich ist. Der Grund für die schlechte Korrelation ist die Schwankung der Sorte Candiss, die im Jahr 2010 die zweitniedrigste relative Konzentration an DMHF-glucosid ausbildete, im Jahr 2011 hingegen die dritthöchste. Wäre Candiss aus der Berechnung ausgeschlossen worden, hätte sich ein Rangkorrelationskoeffizient von 51 % ergeben. Die niedrigsten Koeffizienten ergaben sich für Catechin (31 %) und (Epi)Afzelechin-(epi)catechin Dimere (26 %). Das bei der Segregationspopulation schlecht korrelierende Quercetin-glucuronid wies bei der Varietätenkollektion eine Korrelation von 55 % auf. Die durchschnittliche Korrelation aller ermittelten Metabolite lag mit 62 % knapp im Bereich für ein statistisches Signifikanzniveau von $p < 0,001$.

Sorten, die zwischen den zwei Jahrgängen am wenigsten variierten, waren CIR705, Cireine, Mara des Bois, Saint Joseph, Ciflorette und Cigaline mit jeweils ca. 15 % (entspricht einer durchschnittlichen Differenz von etwa vier Rängen pro Metabolit zwischen den beiden Jahren).

Die Sorten Ciloé, Dover, Candiss, DarSelect, Orléans und Pájaro schwankten um 33 - 42 % (9 - 11 Ränge).

Hinsichtlich des Durchschnitts aller ermittelten Metabolite korrelierten die Individuen der Segregationspopulation (44 %, $p < 0,01$) etwas schwächer als die Varietäten (62 %, $p < 0,001$). Die Gesamtpolyphenolgehalte schwankten hingegen auf einem ähnlichen Niveau (Segregationspopulation: 59 %, $p < 0,001$; Varietäten: 55 %, $p < 0,01$). Bei der Sortenkollektion entsprechen die Werte einer Einfachbestimmung, da nur zwei Jahrgänge kultiviert wurden, während bei der Segregationspopulation Mittelwerte gebildet werden konnten.

Zusätzlich zum Vergleich verschiedener Jahrgänge bietet der Rangkorrelationskoeffizient die Möglichkeit verschiedene Metabolite gegenüber zu stellen und somit mögliche Zusammenhänge in der Biosynthese zu erkennen. Demnach bedeutet eine positive Korrelation zweier Metabolite, dass sie sich in den gleichen Proben an- bzw. abreichern. Negative Werte stehen für eine gegensätzliche Akkumulation. Derartige Effekte konnten bereits anhand einer *Heat Map* (**Abb. 9**, S. 64) dargelegt werden, lassen sich aber durch die Berechnung der Rangkorrelationskoeffizienten, wie in **Tab. 15**, auch bei einer schwächeren Ausprägung und in Tendenzen erfassen. Zudem können Zahlenwerte besser verglichen und Signifikanzen bestimmt werden.

Für das Vergleichspaar Catechin und Catechin Dimere ergab sich in allen sechs Analysen ein deutlicher, signifikanter Zusammenhang, ebenso für *p*-Cumarsäure-glucoseester und Kaffeesäure-glucoseester. Die Korrelation zwischen den Glucuroniden von Quercetin und Kaempferol fiel ebenfalls in fast allen Analysen signifikant aus und erwies sich stärker als der Zusammenhang zwischen Kaempferol-glucosid und -glucuronid. Für Pelargonidin-glucosid ergaben sich positive Korrelationen mit Pelargonidin-rutinosid und mit Afzelechin-pelargonidin-glucosid, wobei letztere etwas deutlicher ausgeprägt war. Der Zusammenhang zwischen Pelargonidin-rutinosid und Pelargonidin-malonylglucosid zeigte sich in Segregationspopulation und Varietätenkollektion verschieden. Während sich bei den drei Jahrgängen der Segregationspopulation ein positiver Trend abzeichnete, ließ sich bei den Varietätenkollektionen eine negative Tendenz erkennen. Sorten, die viel Pelargonidin-rutinosid bildeten, produzierten demnach weniger Pelargonidin-malonylglucosid.

Tab. 15: Rangkorrelationskoeffizienten [%] nach Spearman für die angegebenen Vergleichspaare. **Sp.** Segregationspopulation, **Var.** Varietätenkollektion (alle aus Frankreich, bis auf Var. 2009 aus Spanien (\tilde{n})), Abkürzungen: **gln** Glucuronid, **glu** Glucosid, **rut** Rutinosid, **mal-glu** Malonylglucosid, **glce** Glucoseester, **Afz** Afzelechin, **Pel** Pelargonidin, **Gesamt-PPs** Gesamtpolyphenole. Spezifisch für jeden Jahrgang sind die Werte oberhalb der jeweiligen Schranken für folgende Signifikanzniveaus markiert: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$. Positive Werte sind rot hinterlegt, negative Werte grün. Mit steigendem Betrag nimmt die Farbintensität zu.

Vergleichspaar		Sp.			Var.		
		2009	2010	2011	2009 \tilde{n}	2010	2011
Catechin	Catechin Dimere	72***	83***	85***	83***	81***	88***
Quercetin-gln	Kaempferol-gln	50***	39***	37***	71**	34	44*
Kaempferol-glu	Kaempferol-gln	20	40***	9	36	15	37*
Pelargonidin-glu	Pelargonidin-rut	60***	28*	51***	51*	36	69***
Pelargonidin-glu	Afz-pel-glu	44***	67***	76***	71**	37*	84***
Pelargonidin-rut	Pel-mal-glu	29**	10	29***	-34	-17	-27
Cumarsäure-glce	Kaffeesäure-glce	54***	58***	67***	77***	54**	47**
Gesamt-PPs	Ellagsäure	18	-29**	3	-34	-11	-3
Gesamt-PPs	DMHF-glu	-17	2	-17*	-45	-13	-54**
DMHF-glu	Catechin	-44***	-20	-24**	-9	-15	-45*

Das gegensätzliche Verhalten der Gehalte an Gesamtpolyphenolen und Ellagsäure, wie es sich in der spanischen Sortenkollektion von 2009 präsentierte, ließ sich nicht konsequent bestätigen. Die Rangkorrelationskoeffizienten zeigten zwar in drei der sechs Analysen negative Tendenzen, in zwei Bestimmungen allerdings mit Werten nahe 0 die Abwesenheit jeglichen Zusammenhangs und in einem Jahrgang der Segregationspopulation sogar einen leicht positiven Trend an. Deutlicher konkurrierte der Gehalt an Gesamtpolyphenolen mit der Akkumulation von DMHF-glucosid. In fünf der sechs Analysen ergaben sich gegensätzliche Korrelationen, zwei davon signifikant. Am offensichtlichsten wurde die indirekt proportionale Akkumulation von DMHF-glucosid im Vergleich zu Catechin. Hier ergaben sich durchweg negative Rangkorrelationskoeffizienten, die in der Hälfte der Analysen signifikant ausfielen.

3.1.5. Nachweisgrenzen

Ausgehend von einem Signal-zu-Rausch-Verhältnis von 3 wurden relative Nachweisgrenzen (**Tab. 16**) ermittelt.

Tab. 16: Relative Nachweisgrenzen (NWG).

Metabolit	NWG [mg equ./g TM]
(Epi)Afzelechin-(epi)catechin Dimere	0,02
Ascorbinsäure	0,02
Catechin	0,03
(Epi)Catechin Dimere (Proanthocyanidine)	0,06
<i>p</i> -Cumarsäure-glucoseester/-glucosid	0,02
Cyanidin-3-glucosid	0,07
DMHF-glucosid	0,07
Ellagsäure	0,01
Epiafzelechin-(4→8)-pelargonidin-3-glucosid	0,03
Epiafzelechin-glucosid	0,06
Epicatechin	0,03
Ferulasäure-glucoseester	0,02
<i>p</i> -Hydroxybenzoesäure-glucoseester	0,01
Kaffeesäure-glucoseester	0,01
Kaempferol-cumaroylglucosid	0,01
Kaempferol-glucosid	0,04
Kaempferol-glucuronid	0,01
Naringenin-glucosid	0,04
Pelargonidin-3-glucosid	0,14
Pelargonidin-3-malonylglucosid	0,05
Pelargonidin-3-rutinosid	0,12
Quercetin-glucosid	0,03
Quercetin-glucuronid	0,01
Zimtsäure-glucoseester	0,11
Zitronensäure	0,04

Quercetin-glucosid war zwar in der Sorte Senga Sengana enthalten, konnte aber in keiner der restlichen Proben (Varietätenkollektionen oder Segregationspopulationen) nachgewiesen werden.

Bei einer gezielten Aufnahme weniger Ionenspuren im Massenspektrometer könnten die Nachweisgrenzen durch Unterdrückung des Hintergrundrauschens wesentlich verringert werden. In der vorliegenden Arbeit war jedoch die Aufnahme im *full-scan*-Modus erforderlich.

3.2. Bestimmung von DMHF

Die Aglyka DMHF und DMMF konnten in Methanolextrakten lyophilisierter Früchte nicht identifiziert werden. Sie wurden daher aus frischem Erdbeerhomogenat mit Ethylacetat als Extraktionsmittel bestimmt. Einen Responsefaktor von 1 annehmend erfolgte die Quantifizierung relativ zum internen Standard Norfuraneol. Die Analyse wurde zunächst nur bei der spanischen Sortenkollektion von 2009 durchgeführt.

Die Varianz zwischen den Proben fiel sehr hoch aus. Die Sorten #25 (cv. Selva AF), 26, 12, 49 (cv. Darlisette) und 21 (cv. Sweet Charlie) zeigten mit etwa 20 ppm equ. die höchsten relativen Konzentrationen an DMHF, während #41 (cv. Selva), 39 und 17 nur sehr geringe Gehalte um 0,5 ppm equ. aufwiesen. Die Schwankung entsprach einem Faktor von 40. Die Sorte #21 (cv. Sweet Charlie) fiel ebenfalls in den französischen Varietätenkollektionen von 2010 und 2011 (s. 3.1.3, S. 69) durch ihre im Vergleich zu anderen Sorten erhöhte Produktion von DMHF-glucosid auf.

Die relativen Konzentrationen an DMMF variierten vergleichbar stark von 0,5 – 23 ppm, wobei die Sorte #49 auch hier wieder einen der höchsten Gehalte und #41 einen der niedrigsten aufwies. In Kontrast zu den hohen Gehalten an DMHF, produzierte die Sorte #25 sehr wenig DMMF.

Die höchsten relativen Konzentrationen an DMHF (26 ppm equ.) und DMMF (20 ppm equ.) besaß allerdings unerwartet die Sorte Senga Sengana, die nur zu Testzwecken vermessen wurde. Sie wurde 2006 in großen Mengen (ca. 15 kg) in Freising geerntet und vier Jahre bei -20 °C gelagert.

Die Berechnung der Rangkorrelationskoeffizienten ergab einen indirekt proportionalen Zusammenhang von -51 % ($p < 0,05$) zwischen den Gehalten an DMHF und Gesamtpolyphenolen in den untersuchten Sorten. Zwischen DMMF und Gesamtpolyphenolen zeigte sich mit -9 % lediglich eine leicht negative Tendenz. Ebenso unbestimmt erschien der Zusammenhang für das Vergleichspaar DMMF und DMHF (29 %).

Die Korrelation des Aglykons von DMHF mit dessen Glucosid, welches mit der standardisierten Aufarbeitungsmethode mittels Methanolextraktion aus lyophilisierten Früchten erfasst wurde,

ließ sich mit 89 % ($p < 0,001$) sehr deutlich bestätigen. Da die Handhabung und Lagerung lyophilisierter Homogenate einfacher als bei frischem Material ist und beide Methoden nahezu identische Rangabfolgen der Proben lieferten, wurde bei den weiteren Analysen lediglich das Glucosid als Anhaltspunkt für die DMHF-Produktion bestimmt.

3.3. SPME-GC/MS von flüchtigen Komponenten

Der Dampfraum frischen Erdbeerfruchthomogenats wurde mittels SPME-GC/MS untersucht. Ausgehend von einem Responsefaktor von 1 wurden die in **Tab. 17** gelisteten Metabolite relativ zum internen Standard 1,2-Dimethoxyethan quantifiziert.

Tab. 17: Mittels SPME-GC/MS bestimmte Metabolite.

Ester	Säuren
Ethylbutanoat	Buttersäure
Ethylhexanoat	Essigsäure
Ethyl-2/3-methylbutanoat*	2/3-Methylbuttersäure
Methylbutanoat	
Methylhexanoat	
Methyl-2/3-methylbutanoat*	
Terpene	Sonstige
Linalool	Diacetyl
Nerolidol	DMMF (Mesifuran, Methoxyfuraneol)
	(Z)-3-Hexenal

* Aufgrund schlechter Trennung als Summe angegeben.

Die Analyse der spanischen Sortenkollektion von 2009 ist in **Abb. 12** zusammengefasst. Den größten Anteil an flüchtigen Komponenten machten Fruchtester, v.a. Methylbutanoat und -hexanoat, aus. Die Summe aller erfassten flüchtigen Verbindungen schwankte zwischen den verschiedenen Sorten um einen Faktor von etwa 6 (13 – 73 ppm equ.), während einzelne Metabolite eine durchschnittliche Varianz von einem Faktor von 20 aufwiesen.

Im Vergleich zu den anderen Sorten erschienen #49 und 25 mit durchweg höheren Gehalten an flüchtigen Komponenten. Die Sorten #6 und 32 produzierten zwar größere Mengen an Fruchtestern, besaßen aber nur geringe Gehalte an Säuren (#6) bzw. Terpenen (#32). Während sich keine Sorte mit durchgehend niedrigen relativen Konzentrationen zeigte, enthielten die meisten Sorten mit geringen Fruchtestergehalten stattdessen erhöhte Mengen an Säuren (#38, 39, 21 und 4) oder Terpenen (#2, 41 und 42).

Verglichen mit den Gehalten an Gesamtpolyphenolen (**Abb. 9**, S. 64) fielen die Sorten #25, 32 und 49 auf, da sie die höchsten relativen Konzentrationen an flüchtigen Komponenten aufwiesen, jedoch die geringsten Gehalte an Gesamtpolyphenolen. Dieses gegensätzliche Verhalten ließ sich allerdings nicht durchweg bestätigen. So zeigten beispielsweise die Sorten #21 und 39 in beiden Fällen geringe relative Konzentrationen bzw. die Sorten #38 und 5 in beiden Fällen relativ hohe Werte.

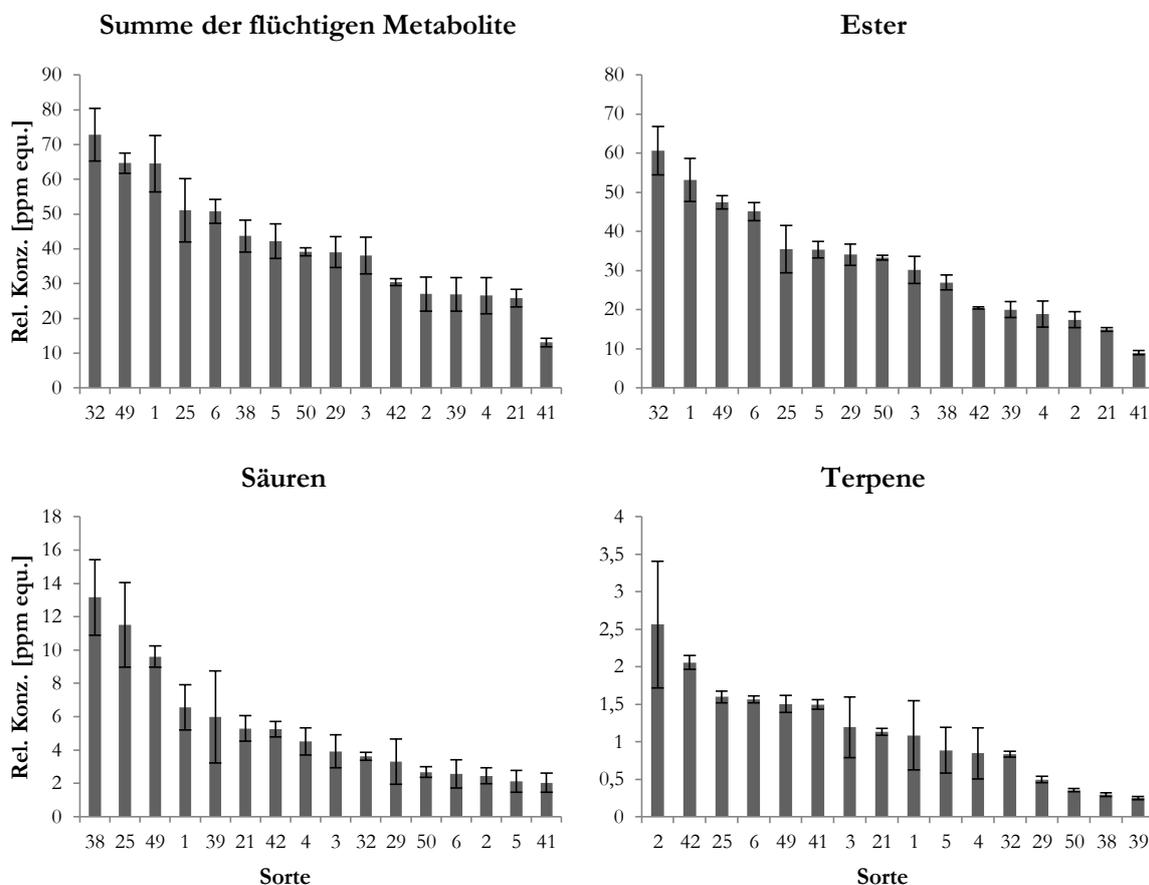


Abb. 12: SPME-GC/MS-Analyse der spanischen Sortenkollektion von 2009. Relative Konzentrationen der Summe aller erfassten flüchtigen Metabolite, sowie an Estern, Säuren, und Terpenen.

Die Berechnung der Rangkorrelationskoeffizienten ergab einen Wert von -10 % für den Vergleich von Gesamtpolyphenolgehalt und der Summe aller flüchtigen Verbindungen. Trotz des niedrigen Wertes ließ sich eine leichte Tendenz zu einer gegensätzlichen Korrelation erkennen.

Der Vergleich der beiden Bestimmungen von DMMF (LC-MS aus Ethylacetatextrakten vs. SPME-GC/MS) ergab einen Rangkorrelationskoeffizient von 98 %, was für eine sehr gute Reproduzierbarkeit beider Methoden stand. Beide Ansätze lieferten demnach nahezu identische Rangabfolgen der Proben.

3.4. Polyphenolanalysen transgener si-*ANR*- und si-*FLS*-Linien

Um den Beitrag zweier Enzyme zur Polyphenolbiosynthese zu untersuchen, wurden Blüten, Früchte, Blätter, Nebenblätter und Wurzeln stabil transgener Pflanzen der Kulturerdbeere *F. × ananassa* cv. Senga Sengana mit herabregulierter Anthocyanidinreduktase (*ANR*) bzw. Flavonolsynthase (*FLS*) analysiert. Die Analyse erfolgte mittels LC-MSⁿ nach methanolischer Extraktion wie unter 2.3.1.1 bis 2.3.1.3 (S. 37ff) beschrieben. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp und der jeweiligen transgenen Probe wurden mittels Wilcoxon-Mann-Whitney U-Test berechnet.

3.4.1. Analyse der si-*ANR*-Pflanzen

3.4.1.1. Phänotyp

Die Blüten von Wildtyp und si-*ANR*-Pflanzen konnten visuell unterschieden werden. Während die Stempel beim Wildtyp komplett gelb gefärbt waren, zeigte sich bei den si-*ANR*-Blüten eine charakteristische Rotfärbung, die sich gezielt auf die Narben begrenzte (**Abb. 13**). In manchen si-*ANR*-Blüten waren zusätzlich die Kronblätter rosa gefärbt.



Abb. 13: Blüten von Wildtyp (**links**) und si-*ANR* (**rechts**). Die charakteristische Rotfärbung der Narben der si-*ANR*-Blüte ist zu erkennen.

Im Grünstadium der Fruchtreifung zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen Wildtyp und si-*ANR*-Linien. Während die Kontrollfrüchte grün waren, wiesen die Früchte der si-*ANR*-Linien eine Rotfärbung auf, deren Intensität mit zunehmender Fruchtgröße abnahm (**Abb. 14**). Im reifen Zustand ergaben sich keine visuellen Unterschiede.

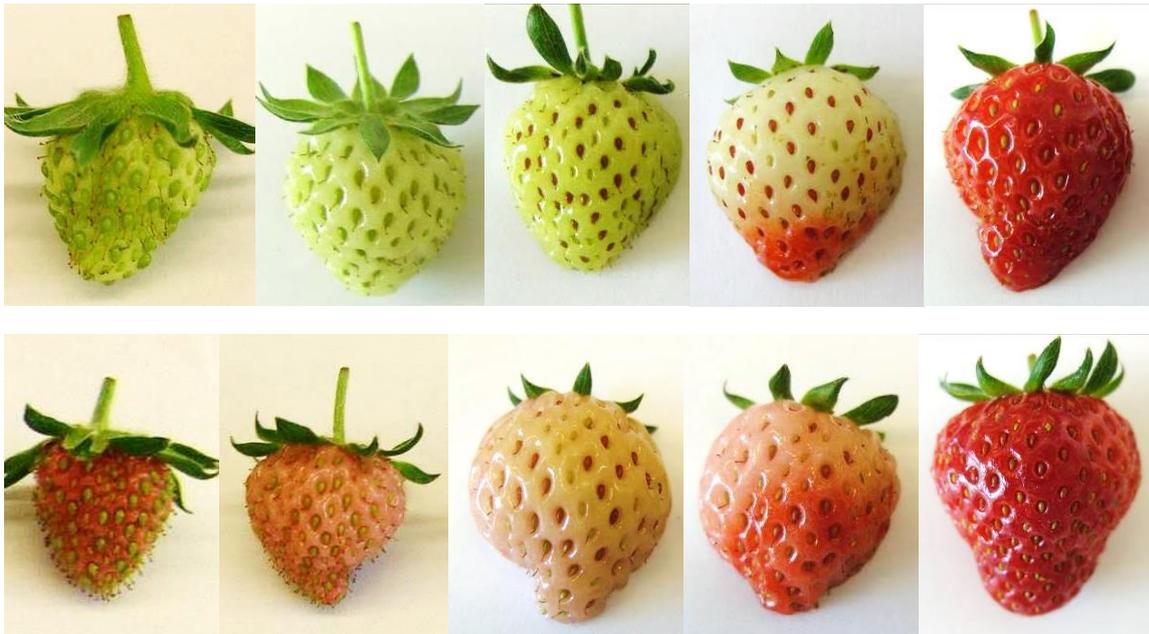


Abb. 14: Verschiedene Reifestadien von Wildtyp (**oben**) und si-*ANR* (**unten**): G1, G2, W, T, R (von links nach rechts). Fotos Corina Sutter (TU München).

3.4.1.2. LC-MSⁿ von si-*ANR*-Blüten

Zwölf Blüten der Wildtyp-Pflanze und insgesamt 15 Blüten von vier si-*ANR*-Linien wurden unter dem Mikroskop in Narben, Griffel und Kronblätter aufgetrennt und separat analysiert. Aufgrund der geringen Einwaage wurden für Narben und Griffel jeweils drei Blüten zu einem Pool zusammengefügt. Die Unterschiede zwischen Wildtyp und si-*ANR*-Linien wurden mittels Wilcoxon-Mann-Whitney U-Test (Hart *et al.*, 2001) auf statistische Signifikanz hin überprüft.

Den visuellen Eindruck bestätigend ergaben sich für Narben und Kronblätter hinsichtlich des Gehalts an Cyanidin-glucosid signifikante Unterschiede (**Abb. 15**). Während der Wildtyp kein Anthocyan bildete, zeigte sich in den Narben und Kronblättern der si-*ANR*-Pflanzen die typisch rote Färbung, die durch die Einlagerung von Cyanidin-glucosid zustande kam. Die Narben der si-*ANR*-Blüten zeigten zudem einen erhöhten Gehalt an Quercetin-glucuronid auf. (Epi)Catechin Dimere waren in Griffeln der Kontrollpflanze in leicht höheren relativen Konzentrationen nachzuweisen als im transgenen Material.

Die teilweise recht hohen Standardabweichungen erschweren trotz offensichtlicher Unterschiede zwischen Wildtyp und si-*ANR*-Proben die Ausbildung deutlicher Signifikanzen und kommen durch den Einsatz kleinster Mengen zustande. Pro Ansatz betrug die Einwaage der Narben meist zwischen 0,5 und 1,0 mg, die der Griffel bis 2 mg (jeweils Pool aus drei Blüten) und die der

Kronblätter um 25 mg (Ansatz pro Blüte). Zudem wurden die Resultate der zweiten Blühperiode (Juni) mit den bisherigen Ergebnissen (April) verrechnet.

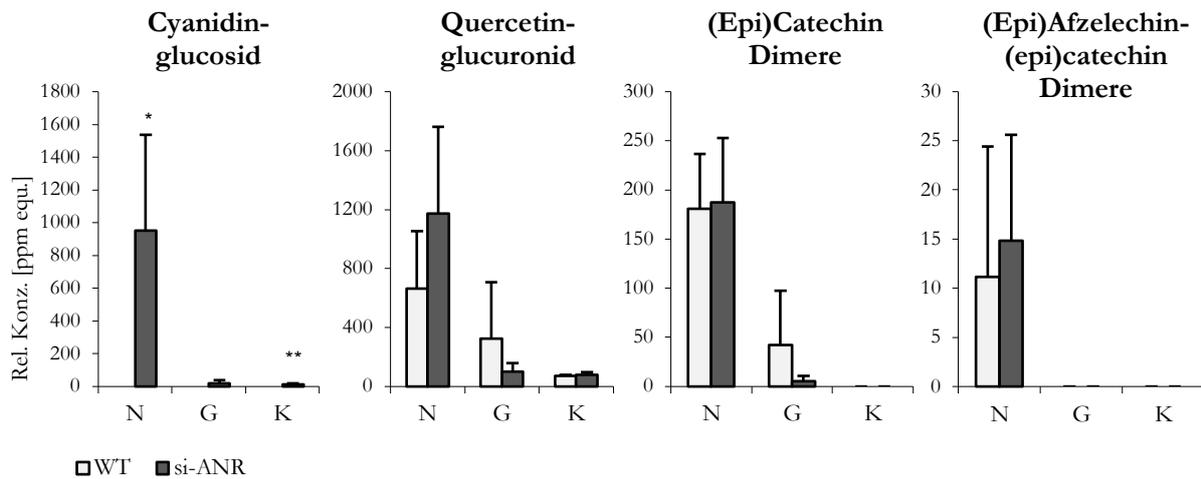


Abb. 15: Relative Konzentrationen (+ SA) verschiedener Metabolite in den Blütenbestandteilen (**N** Narben, **G** Griffel, **K** Kronblätter) des Wildtyps (**WT**) und der si-*ANR*-Linien F14, 15, 17 und 18. Signifikante Unterschiede zwischen WT und si-*ANR* wurden auf folgenden Niveaus markiert: * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$.

3.4.1.3. LC-MSⁿ von si-*ANR*-Früchten

Der visuelle Unterschied von Wildtyp und si-*ANR*-Linien im Grünstadium der Früchte ließ sich durch LC-MSⁿ-Analysen bestätigen. Im Grünstadium bildete sich nur in den si-*ANR*-Linien Cyanidin-glucosid (**Abb. 16**), welches für die rote Färbung der G1/2-Früchte verantwortlich war. Im Verlauf der Reifung glich sich der Gehalt an Cyanidin-glucosid immer weiter an, bis er im reifen Zustand bei Wildtyp und si-*ANR*-Linien auf dem gleichen Niveau lag. Neben Cyanidin-glucosid wurde im Grünstadium der si-*ANR*-Früchte zu kleinen Teilen auch Pelargonidin-glucosid produziert, welches im reifen Stadium den Großteil der Anthocyane ausmacht. Für Pelargonidin-glucosid ist die relative Konzentration in den si-*ANR*-Linien im reifen Zustand etwas niedriger als im Wildtyp.

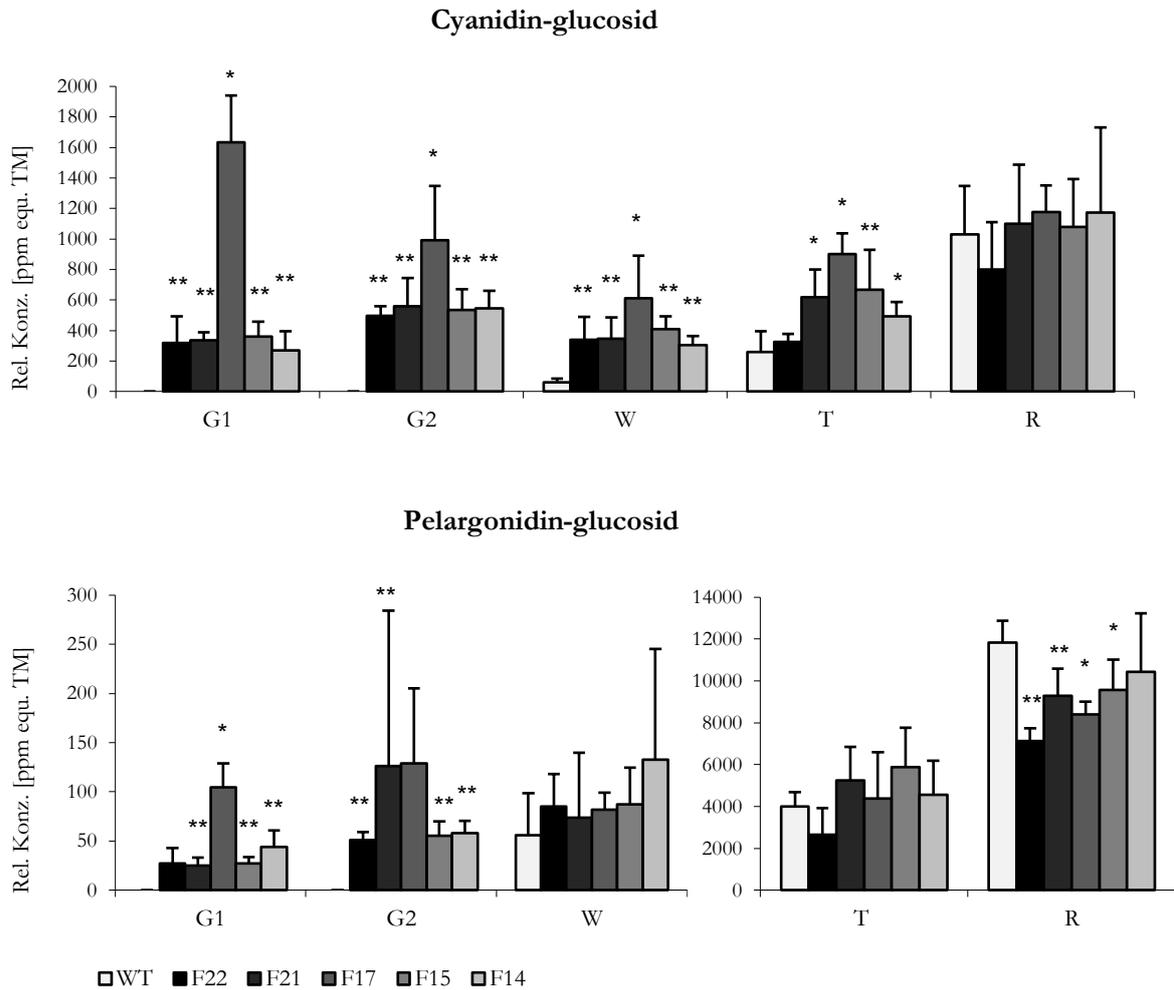


Abb. 16: Relative Konzentrationen (+ SA) der beiden Anthocyane Cyanidin-glucosid und Pelargonidin-glucosid in verschiedenen Reifestadien der Früchte der *si-ANR*-Pflanzen (F14-22). Unterschiede zum Wildtyp (**WT**) sind auf folgenden Signifikanzniveaus gekennzeichnet: * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$.

Die Proanthocyanidin-Gehalte nahmen im Verlauf der Reifung ab, wobei *si-ANR*-Früchte geringere Mengen als der Wildtyp akkumulierten (**Abb. 17**). In den einzelnen Reifestadien traten signifikante Unterschiede nur in jeweils einem der beiden konfigurationsisomeren Dimere von (Epi)Catechin-(epi)catechin bzw. (Epi)Afzelechin-(epi)catechin auf. Die in geringerer Konzentration auftretenden Isomere schienen demnach einen höheren Anteil an *cis*-Flavan-3-olen, wie Epicatechin, zu enthalten, da deren Bildung durch die Herabregulation der *ANR* verringert wird.

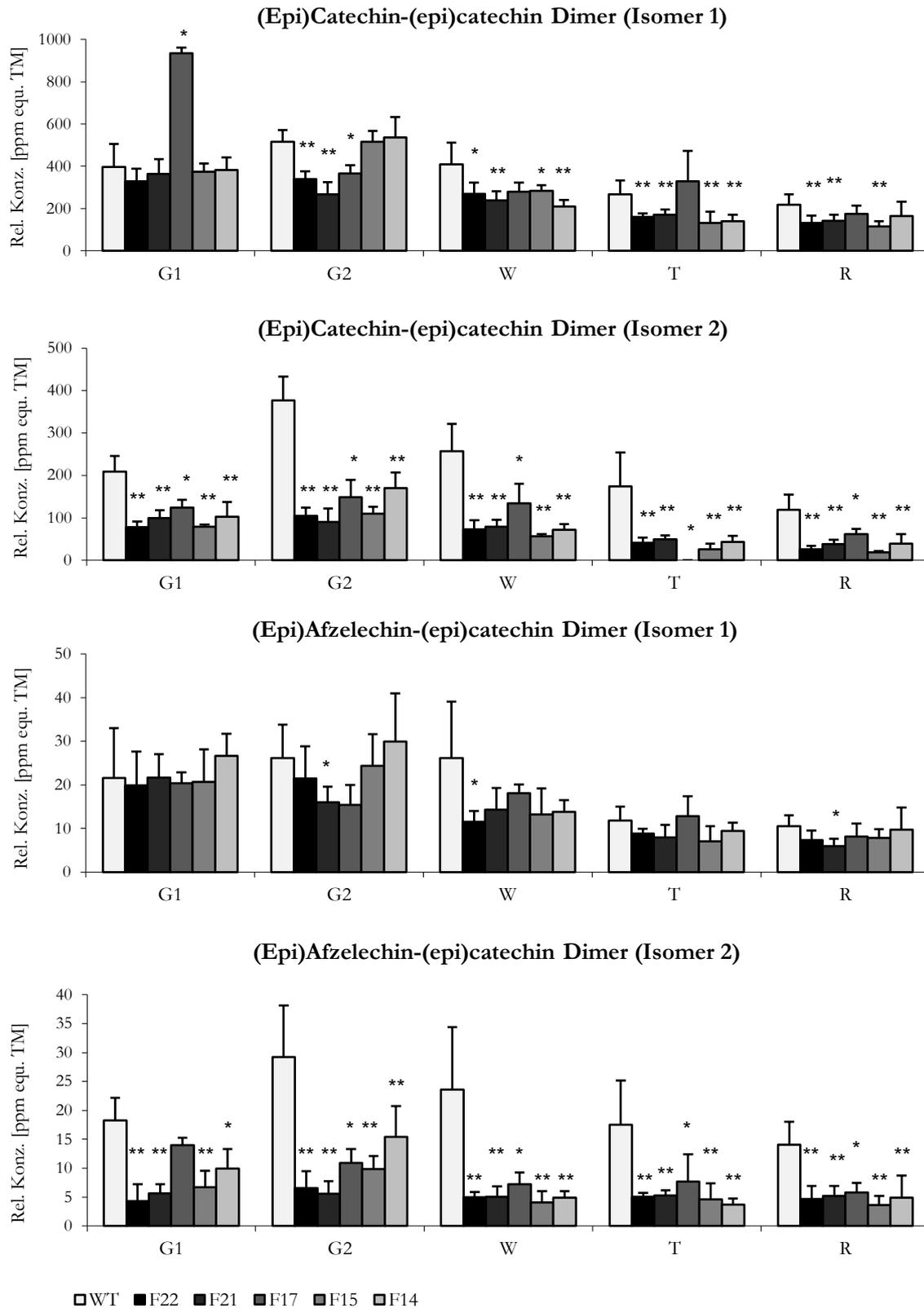


Abb. 17: Relative Konzentrationen (+ SA) der Proanthocyanidine in verschiedenen Reifestadien der Erdbeerfrüchte der *si-ANR*-Linien (F14-22). Unterschiede zum Wildtyp (**WT**) sind für folgende Signifikanzniveaus gekennzeichnet: * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$.

Für Quercetin-glucuronid ergaben sich für die *si-ANR*-Früchte in allen Reifestadien deutlich erhöhte Gehalte im Vergleich zum Wildtyp (**Abb. 18**). Bei Kaempferol-glucosid zeigte sich eine genau entgegengesetzte Akkumulation. Die Früchte der *si-ANR*-Linien besaßen durchweg niedrigere relative Konzentrationen als der Wildtyp. Die Produktion von Kaempferol-cumarylglucosid verhielt sich ähnlich wie die von Kaempferol-glucosid.

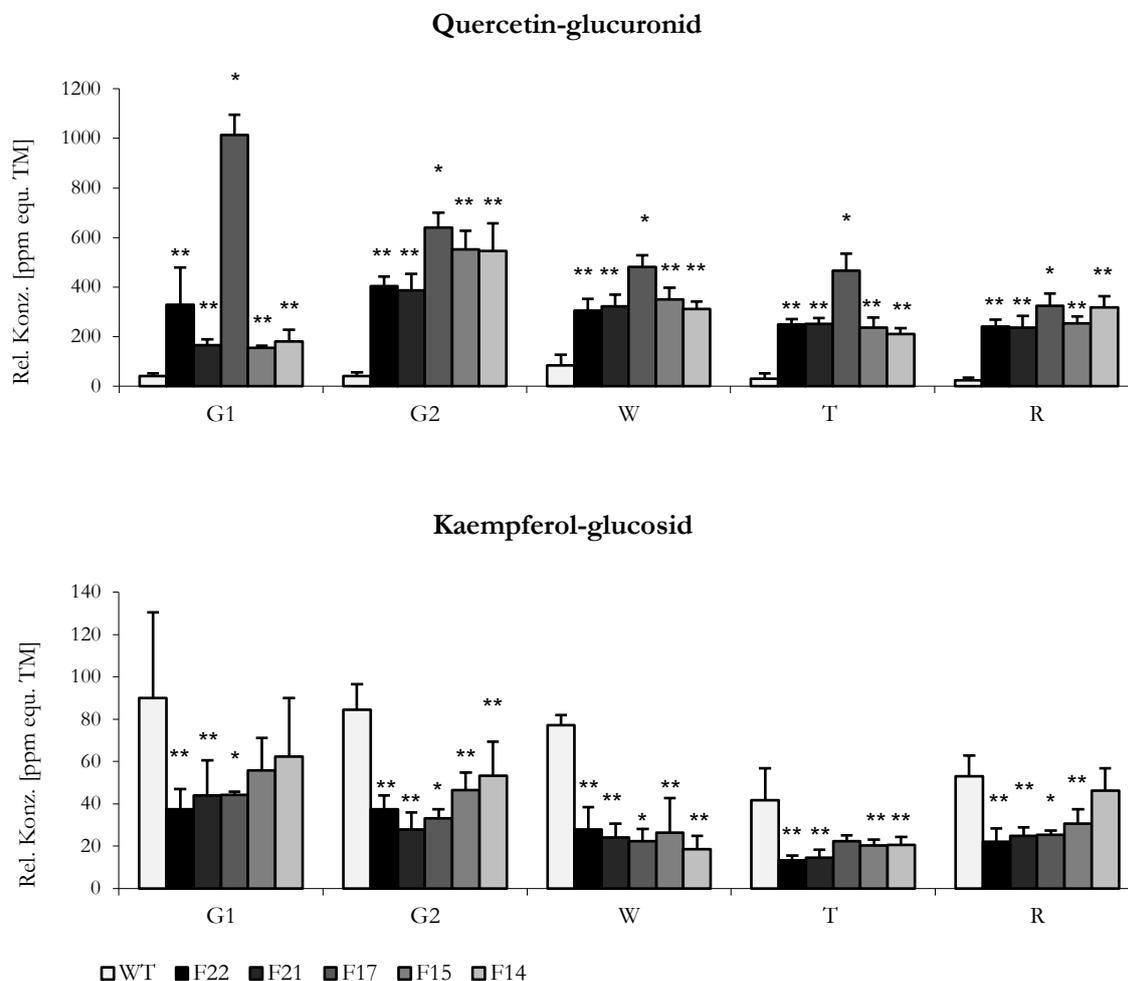


Abb. 18: Relative Konzentrationen (+ SA) an Quercetin-glucuronid und Kaempferol-glucosid in verschiedenen Reifestadien der Erdbeerfrüchte der *si-ANR*-Linien (F14-22). Unterschiede zum Wildtyp (**WT**) sind für folgende Signifikanzniveaus gekennzeichnet: * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$.

Für DMHF-glucosid, Zitronensäure und Ascorbinsäure zeigte sich im Vergleich zu den anderen erfassten Metaboliten eine höhere biologische Variabilität zwischen den *si-ANR*-Linien. Im roten, reifen Zustand enthielten die Früchte der *si-ANR*-Pflanzen signifikant geringere Gehalte an allen drei Substanzen (**Abb. 19**). Die Produktion von DMHF-Glucosid verlief erwartungsgemäß stark reifekorreliert.

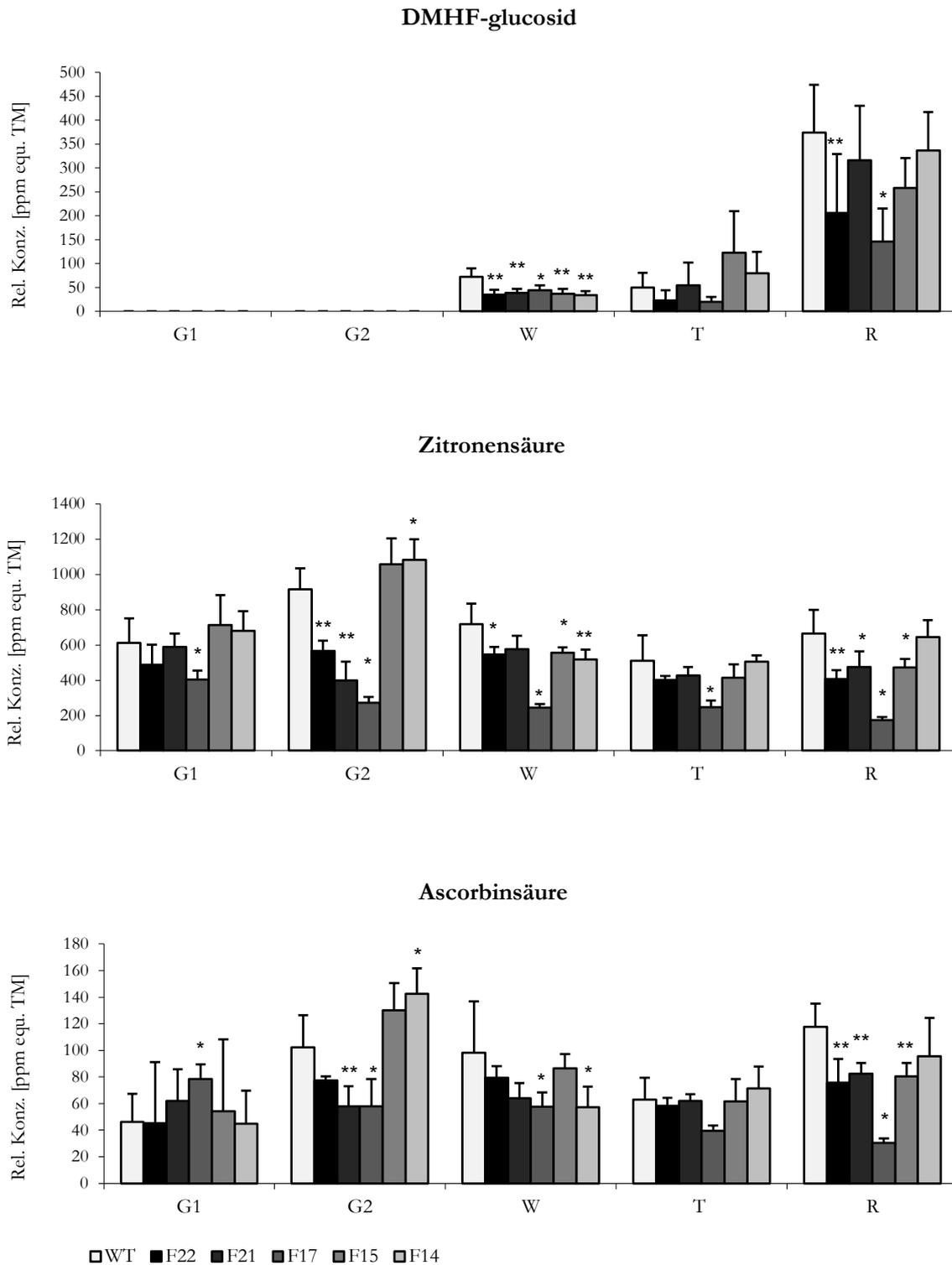


Abb. 19: Relative Konzentrationen (+ SA) an DMHF-glucosid, Zitronensäure und Ascorbinsäure in verschiedenen Reifestadien der Erdbeerfrüchte der *si-ANR*-Linien F14-22. Unterschiede zum Wildtyp (**WT**) sind für folgende Signifikanzniveaus gekennzeichnet: * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$.

Bei den Gehalten der restlichen Metabolite, wie Zimtsäure-glucoseester, Kaffeesäure-glucoseester, *p*-Hydroxybenzoesäure-glucoseester, Pelargonidin-rutinosid oder Pelargonidin-

malonylglucosid, ergaben sich keine entscheidenden Unterschiede zwischen Wildtyp und si-*ANR*.

3.4.1.4. Thiolytische Spaltung der Proanthocyanidine in si-*ANR* Früchten

Die Bestimmung der Proanthocyanidine ist für die Beobachtung der Enzymfunktion der Anthocyanidinreduktase (ANR) von Bedeutung, da bei einer Herabregulation die Bildung von *cis*-Flavan-3-olen, wie Epicatechin, verringert wird. Da Epicatechin jedoch selbst im Wildtyp von *F. × ananassa* Senga Sengana mit der bisherigen Methode nicht nachgewiesen werden konnte, war ein Vergleich der gebildeten Mengen von Catechin und Epicatechin nicht möglich. Zum Beleg der Enzymfunktion wurde daher der nachfolgende Reaktionsschritt, die Polymerisierung der Flavan-3-ole zu den Proanthocyanidinen, betrachtet, um die Anteile von Catechin und Epicatechin in den Polymeren überprüfen zu können.

Mittels LC-MSⁿ wurde bereits festgestellt, dass nur eines der beiden erfassten Konfigurationsisomere des Dimers (Epi)catechin-(epi)catechin eine deutliche, unterschiedliche Akkumulation in Früchten von Wildtyp und si-*ANR*-Pflanzen während der Reifung zeigte, ebenso nur eine der beiden isomeren Formen von (Epi)Afzelechin-(epi)catechin (**Abb. 17**, S. 82). Da für eine Bestimmung der Konfiguration der jeweiligen Isomere die geeigneten Referenzsubstanzen fehlten, wurden sie in saurem Milieu thiolytisch gespalten und anschließend als Thioether mittels HPLC/UV bestimmt (**Abb. 20**).

Die erhöhte Verwendung von Catechin zum Aufbau der Proanthocyanidine in si-*ANR*-Früchten entsprach der Akkumulation von *upstream*-Produkten. Folglich ist der Anteil von Epicatechin als Verlängerungseinheit (gemessen als 3,4-*trans*-Epicatechinbenzylthioether) in den si-*ANR*-Früchten im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert. Es werden vermehrt Catechin-Einheiten (gemessen als Benzylthioether) zur Kettenverlängerung verwendet.

Der durchschnittliche Polymerisierungsgrad fiel bei den si-*ANR*-Linien (F15: $3,5 \pm 0,5$; F21: $4,0 \pm 0,3$; F22: $3,8 \pm 0,3$) ebenfalls geringer aus als beim Wildtyp ($5,8 \pm 0,1$), was durch den steigenden Gehalt an Catechin-Startereinheiten in si-*ANR*-Früchten bestätigt wird.

Die höheren Gehalte von Epicatechin in Form des Benzylthioethers verglichen zur endständigen Einheit zeigten auch die Präferenz des Wildtyps zur Verwendung von Epicatechin als Verlängerungseinheit. Während Catechin in Reinform akkumuliert wurde, wurde Epicatechin hauptsächlich zur Ausbildung der Proanthocyanidine genutzt und konnte daher mit der bisherigen Methode mittels LC-MSⁿ nicht detektiert werden.

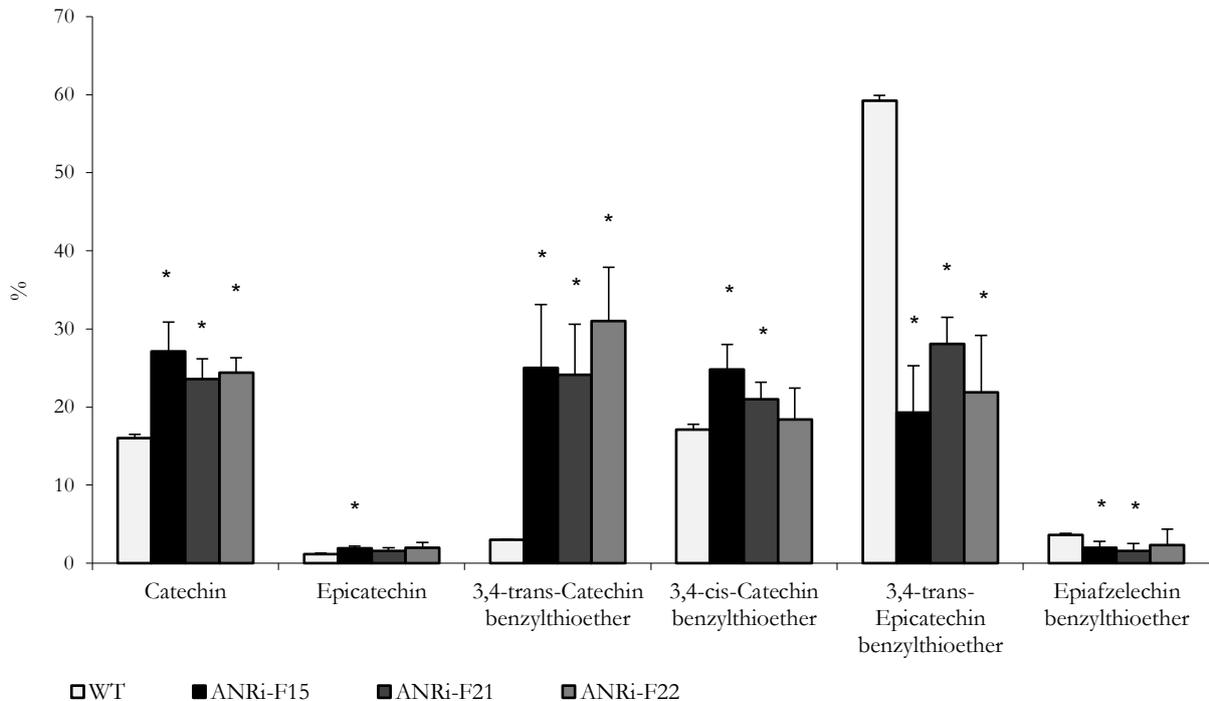


Abb. 20: Zusammensetzung der Proanthocyanidine nach thiolytischer Spaltung. Catechin und Epicatechin beschreiben terminale Einheiten, die verschiedenen Benzylthioether Verlängerungseinheiten. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen si-*ANR*-Linien und Wildtyp (**WT**) sind markiert (*).

3.4.1.5. LC-MSⁿ von si-*ANR*-Blättern

In Blättern der si-*ANR*-Proben ergaben sich im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Gehalte von Quercetin-glucuronid und Kaempferol-glucosid. Catechin und die Proanthocyanidine wiesen teils höhere (F17 und 21) relative Konzentrationen als der Wildtyp, aber auch geringere (F14, 15 und 22) auf. Das gleiche Muster zeigte sich auch bei anderen Metaboliten, wie Cumaryl-glucoseester, Kaffeesäure-glucoseester und Ascorbinsäure. Für Ellagsäure und Zitronensäure ergaben sich keine Unterschiede zum Wildtyp. Anthocyane konnten erwartungsgemäß in Blättern nicht nachgewiesen werden.

3.4.1.6. LC-MSⁿ von si-*ANR*-Wurzeln

Mittels LC-MSⁿ konnten Cyanidin-glucosid und Quercetin-glucuronid in den Wurzeln der si-*ANR*-Pflanzen identifiziert werden (**Abb. 21**), während der Wildtyp diese beiden Metabolite nicht bildete (Nachweisgrenzen s. **Tab. 16**, S. 74).

Die Beobachtung, dass nur eines der beiden Proanthocyanidin-Isomere in geringeren Konzentrationen als im Wildtyp vorliegt, ließ sich auch hier in Tendenzen nachvollziehen. Zwar

lagen die beiden isomeren Formen von (Epi)Catechin-(epi)catechin auf etwa gleichem Niveau mit dem Wildtyp, zwischen den beiden Isomeren von (Epi)Afzelechin-(epi)catechin zeigte sich der Unterschied jedoch deutlicher. Isomer 1 zeigte keine signifikant niedrigeren Gehalte in den *si-ANR*-Linien, während Isomer 2 in den *si-ANR*-Linien F14, 17, 21 und 22 geringere relative Konzentrationen aufwies als der Wildtyp.

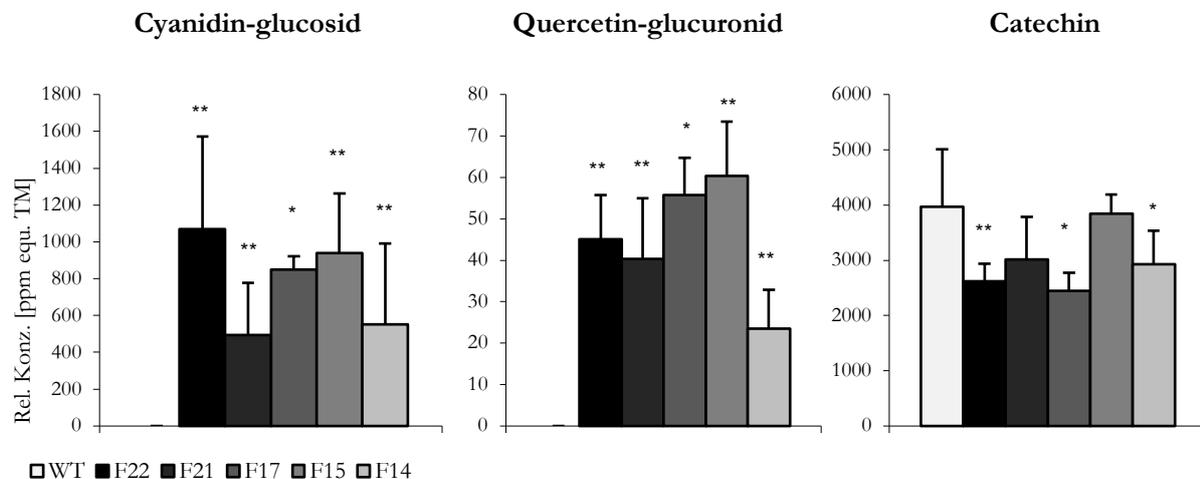


Abb. 21: Relative Konzentrationen (+ SA) verschiedener Metabolite in Wurzeln von *si-ANR*-Linien (F14-22) und Wildtyp (**WT**). Signifikante Unterschiede zwischen *si-ANR*-Proben und WT sind markiert (* $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$).

Gehalte an Catechin waren in drei der fünf *si-ANR*-Linien signifikant erniedrigt, was womöglich dazu beitrug, dass sich die Akkumulation der Proanthocyanidin-Isomere nicht so deutlich unterschied, wie beispielsweise in den Früchten.

Ellagsäure konnte in den *si-ANR*-Wurzeln in höheren Konzentrationen nachgewiesen werden als im Wildtyp.

3.4.1.7. LC-MSⁿ von *si-ANR*-Nebenblättern der Wurzeln und Ausläufer

Anhand der LC-MSⁿ-Analyse konnte die Bildung von Cyanidin-glucosid in den Nebenblättern des Rhizoms und der Ausläufer von *si-ANR*-Pflanzen nachgewiesen werden, nicht aber in den Proben des Wildtyps. Dieses Ergebnis bestätigte die sichtbare Rotfärbung der Nebenblätter der *si-ANR*-Linien. Im Einklang mit den bisherigen Beobachtungen lag die Produktion von Quercetin-glucuronid ebenfalls um ein Vielfaches (x100 in Ausläufern, x50 in Rhizom) über den Werten des Wildtyps.

Aufgrund der geringen Probenzahl der Nebenblätter (jeweils Doppelbestimmung) wurden keine weiteren Vergleiche zwischen *si-ANR*-Proben und Wildtyp angestellt.

3.4.2. Analyse der si-*FLS*-Pflanzen

3.4.2.1. Phänotyp

Visuell ließen sich zwischen Wildtyp und si-*FLS*-Pflanzen im Laufe der Reifung keine Unterschiede erkennen.

3.4.2.2. LC-MSⁿ von si-*FLS*-Blüten

Zwölf Blüten der Wildtyp-Pflanze und insgesamt zwölf Blüten von vier si-*FLS*-Linien wurden unter dem Mikroskop in Narben, Griffel und Kronblätter aufgetrennt und separat analysiert. Aufgrund der geringen Einwaage wurden für Narben und Griffel jeweils drei Blüten zu einem Pool zusammengefügt. Die Unterschiede zwischen Wildtyp und si-*FLS*-Linien wurden mittels Wilcoxon-Mann-Whitney U-Test (Hart *et al.*, 2001) auf statistische Signifikanz hin überprüft.

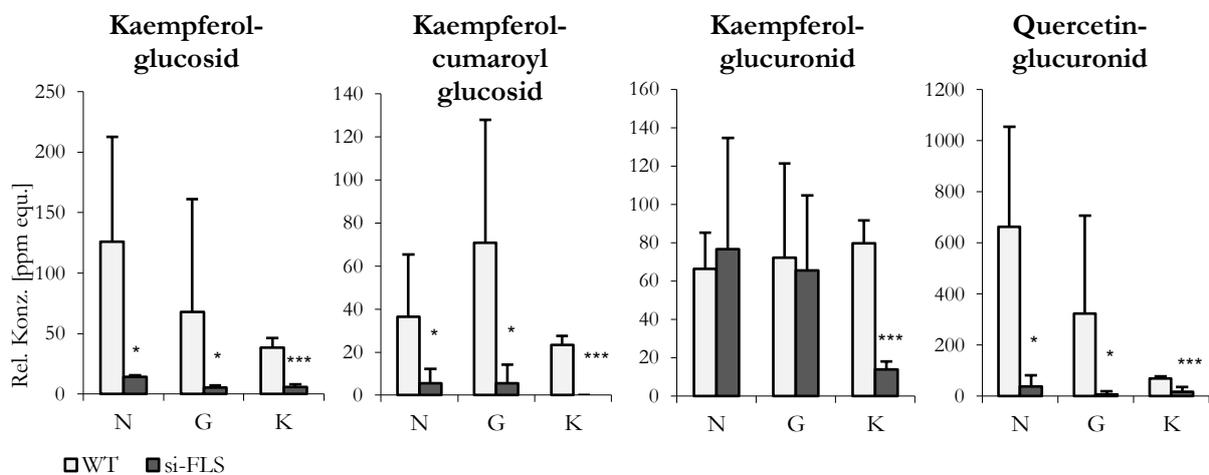


Abb. 22: Relative Konzentrationen (+ SA) verschiedener Metabolite in den Blütenbestandteilen (**N** Narben, **G** Griffel, **K** Kronblätter) des Wildtyps (**WT**) und der si-*FLS*-Linien F25, 26 und 29. Signifikante Unterschiede zwischen WT und si-*FLS* wurden auf folgenden Niveaus markiert: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$.

Verglichen mit dem Wildtyp zeigten alle si-*FLS*-Linien in allen Blütenbestandteilen signifikant niedrigere Gehalte an Quercetin-glucuronid und Kaempferol-Derivaten, mit Ausnahme von Kaempferol-glucuronid in Narben und Griffeln (**Abb. 22**). Durch die Herabregulation konnte die Funktion der Flavonol-Synthase (FLS) somit deutlich bestätigt werden. Weitere Unterschiede zwischen Wildtyp und si-*FLS*-Proben ergaben sich für verschiedene Phenylpropanoide. Die Glucoseester von *p*-Cumarsäure, Ferulasäure und Kaffeesäure wurden in Kronblättern der si-*FLS*-Blüten in geringeren Mengen gebildet als im Wildtyp. Im Gegensatz dazu fand eine erhöhte Produktion von *p*-Hydroxybenzoesäure-glucoseester und Naringenin-glucosid in

Kronblättern von *si-FLS* statt. Letzteres entsprach einer vermehrten Akkumulation von *upstream*-Produkten.

Ascorbinsäure konnte weder in Blüten des Wildtyps noch der *si-FLS*-Pflanzen detektiert werden. Analog zur Analyse der *si-ANR*-Blüten kam es aufgrund der geringen Einwaagen zu hohen Standardabweichungen bei Narben und Griffel (s. 3.4.1.2, S. 79).

3.4.2.3. LC-MSⁿ von *si-FLS*-Früchten verschiedener Reifestadien

Die verminderte Produktion von Flavonolderivaten war ebenfalls in den Früchten der *si-FLS*-Pflanzen zu beobachten (**Abb. 23**).

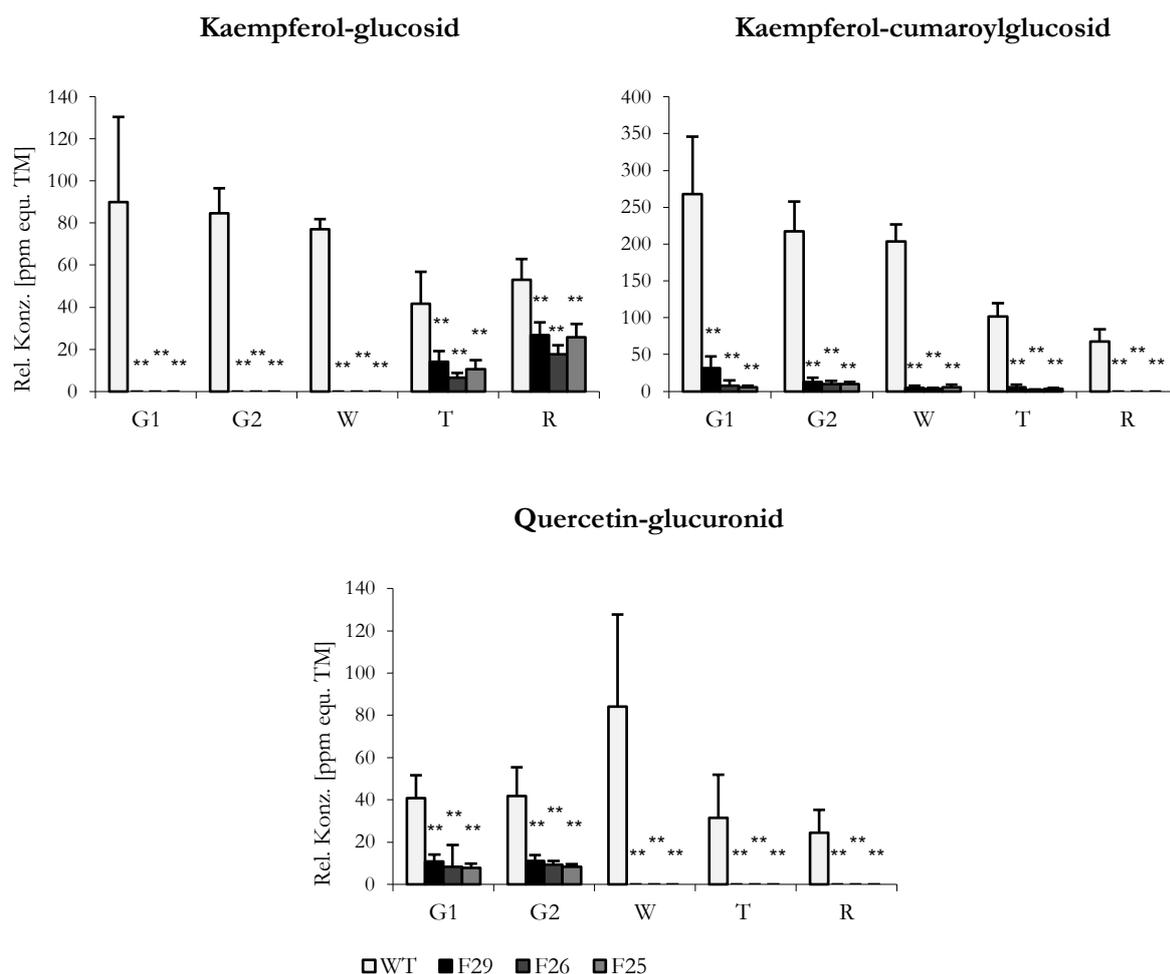


Abb. 23: Relative Konzentrationen (+ SA) der Flavonolderivate in verschiedenen Reifestadien der Früchte der *si-FLS*-Pflanzen (F25, 26 und 29). Signifikante ($p < 0,01$) Unterschiede zum Wildtyp (**WT**) sind gekennzeichnet (**).

In allen Reifestadien kamen Kaempferol-glucosid, Kaempferol-cumaroylglucosid und Quercetin-glucuronid in signifikant geringeren Mengen als im Wildtyp vor. Die Gehalte an Kaempferol-glucuronid lagen auch beim Wildtyp unterhalb der Nachweisgrenze (**Tab. 16**, S. 74).

Bei der Bestimmung der Proanthocyanidine ergaben sich keine Unterschiede zwischen Wildtyp und *si-FLS*. Die Bildung von DMHF-glucosid korrelierte wie erwartet stark mit der Reifung, wohingegen die Anteile an Ellagsäure im Laufe des Reifeprozesses abnahmen (**Abb. 24**). Beide Metabolite waren in reifen Früchten der *si-FLS*-Pflanzen in leicht geringeren Mengen als im Wildtyp vorhanden. Die Bildung von Ascorbinsäure war in reifen *si-FLS*-Früchten im Vergleich zum Wildtyp signifikant reduziert, ebenso die Produktion von Zitronensäure.

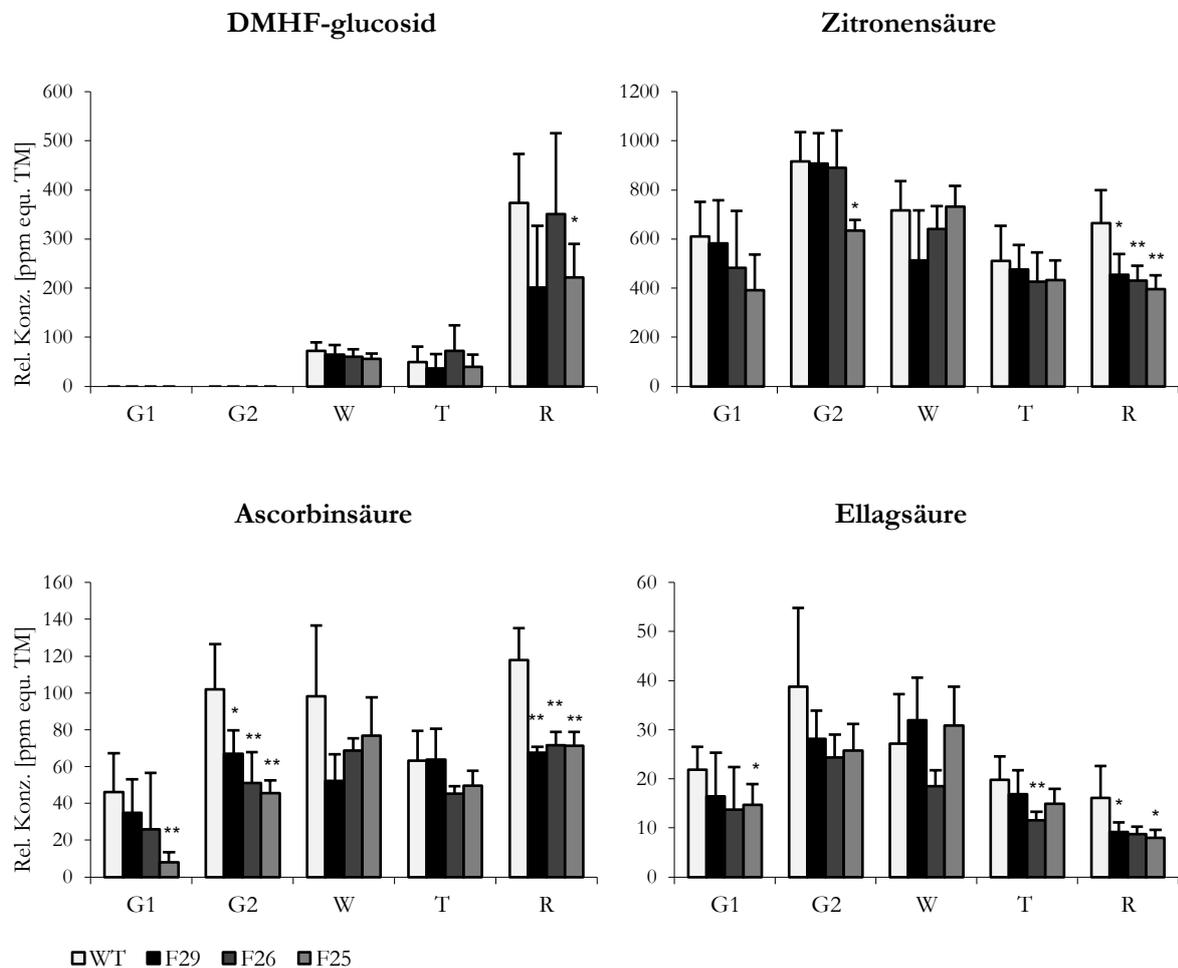


Abb. 24: Relative Konzentrationen (+ SA) verschiedener Metabolite in den einzelnen Reifestadien der Früchte der *si-FLS*-Pflanzen (F25, 26 und 29). Signifikante Unterschiede zum Wildtyp (**WT**) sind auf folgenden Niveaus gekennzeichnet: * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$.

Vereinzelt ergaben sich Differenzen in der Anthocyan-Produktion. Während die *si-FLS*-Linie F26 durchgehend niedrigere Gehalte als der Wildtyp aufwies, zeigten sich für die Linie F29 keine Unterschiede zum Wildtyp.

Die Produktion von Phenylpropanoiden erfolgte in allen *si-FLS*-Linien auf gleichem Niveau wie beim Wildtyp.

3.4.2.4. LC-MSⁿ von si-*FLS*-Blättern

Die Akkumulation der Flavonolderivate war in Blättern der si-*FLS*-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp signifikant reduziert, während Ascorbinsäure vermehrt produziert wurde (**Abb. 25**).

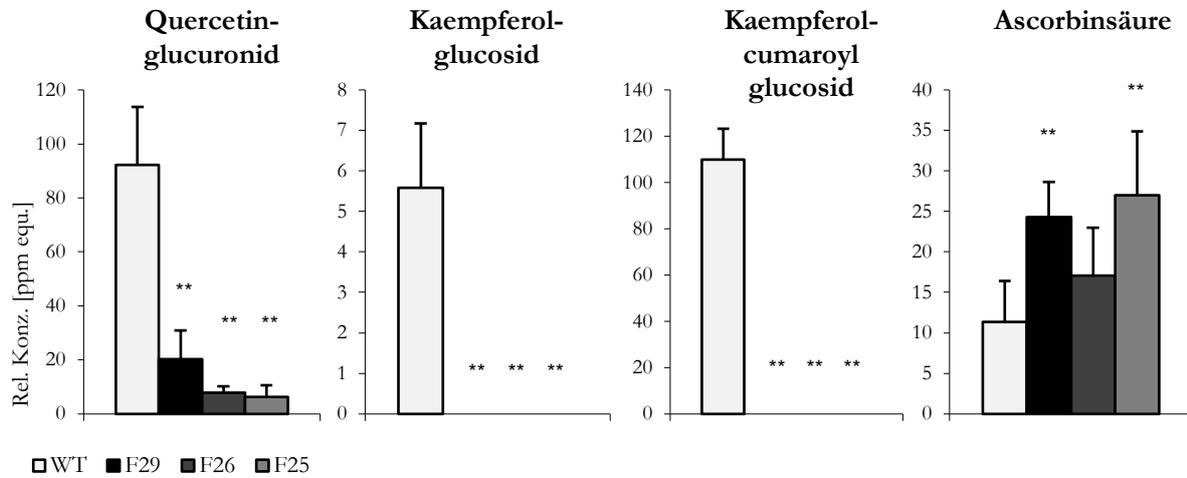


Abb. 25: Relative Konzentrationen (+ SA) von Flavonolderivaten und Ascorbinsäure in Blättern der si-*FLS*-Pflanzen (F25, 26 und 29). Signifikante ($p < 0,01$) Unterschiede zum Wildtyp (WT) sind gekennzeichnet (*).

Die Gehalte an Phenylpropanoiden zeigten keine Unterschiede zwischen si-*FLS* und Wildtyp. Anthocyane waren erwartungsgemäß in keiner Probe nachweisbar.

3.4.2.5. LC-MSⁿ von si-*FLS*-Wurzeln

In den Wurzeln der si-*FLS*-Pflanzen zeigten sich nur wenige Unterschiede zum Wildtyp. Eine leicht verminderte Produktion ergab sich für Kaempferol-glucosid. Andere Flavonolderivate konnten weder in si-*FLS*-Proben noch im Wildtyp detektiert werden. Des Weiteren wiesen si-*FLS*-Wurzeln geringere Gehalte an Catechin und erhöhte relative Konzentrationen an Ellagsäure auf. Die Bestimmung der Proanthocyanidine ergab keine Unterschiede zwischen Wildtyp und si-*FLS*.

Aus der Liste bekannter Metabolite (**Tab. 7**, S. 38) konnten keine weiteren Verbindungen nachgewiesen werden.

3.4.2.6. LC-MSⁿ von si-*FLS*-Nebenblättern der Wurzeln und Ausläufer

Im Gegensatz zum Wildtyp konnten Kaempferol-glucosid und Kaempferol-cumaroylglucosid in Nebenblättern der si-*FLS*-Pflanzen nicht nachgewiesen werden. Quercetin-glucuronid war in si-*FLS*-Proben zwar enthalten, jedoch in wesentlich geringeren Mengen als im Wildtyp.

Die Analyse der Nebenblätter erfolgte lediglich als Doppelbestimmung, weshalb keine weiteren Vergleiche zwischen *si-FLS* und Wildtyp angestellt wurden.

3.5. LC-MSⁿ-Analyse der *FaMYB10*-RNAi-Früchte

Die Rolle des Transkriptionsfaktors *FaMYB10* wurde durch transiente Herabregulation der *FaMYB10*-Expression untersucht. Kontrollfrüchten wurden nicht transformierte Agrobakterien injiziert. Wie bereits am Phänotyp ersichtlich wurden die relativen Gehalte an Anthocyanen und somit Gesamtpolyphenolen reifer Erdbeerfrüchte durch die Herabregulation von *FaMYB10* deutlich reduziert (**Abb. 26**).

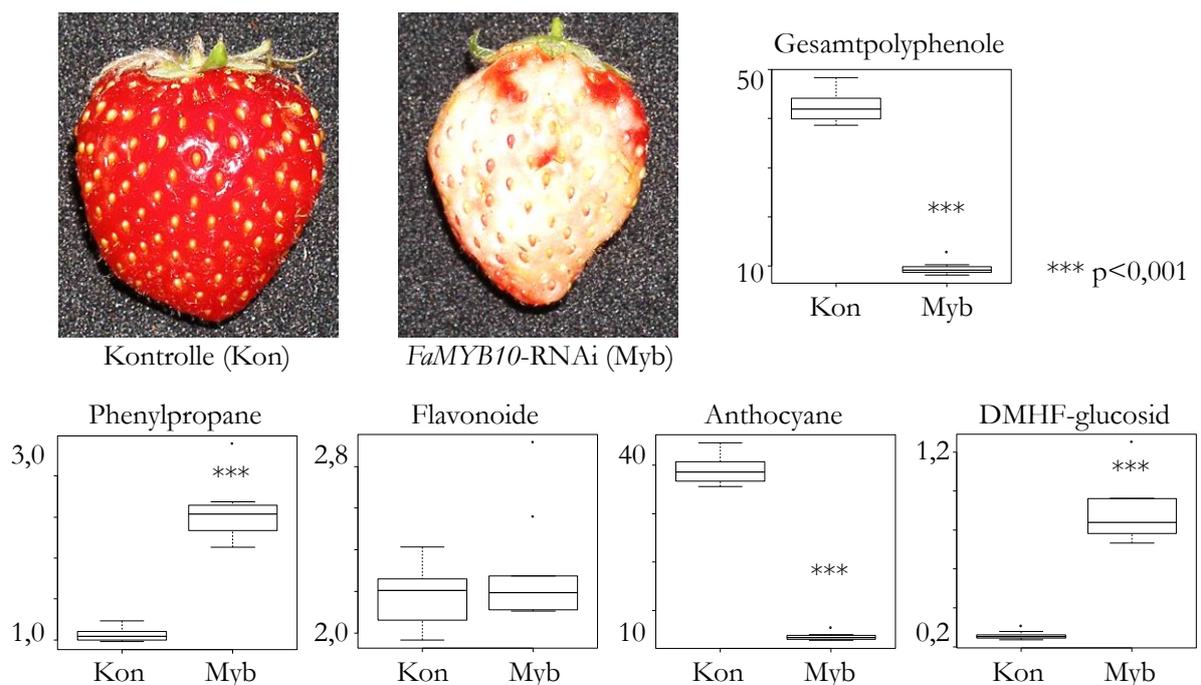


Abb. 26: Phänotyp der Kontroll- und *FaMYB10*-RNAi-Früchte. Die Boxplots zeigen die relativen Konzentrationen [mg equ./g TM] diverser Metabolite bzw. -gruppen.

Aufgrund der eingeschränkten Anthocyanbiosynthese akkumulierten *FaMYB10*-Mutanten erhöhte Mengen an Phenylpropanen im Vergleich zu den Kontrollfrüchten. Für die Gehalte an Flavonoiden ergaben sich keine Unterschiede zwischen *FaMYB10*-RNAi- und Kontrollfrüchten. Interessanterweise enthielten *FaMYB10*-RNAi-Früchte erhöhte relative Konzentrationen an DMHF-glucosid, was eine Substratkonkurrenz zwischen Sekundärstoffwechselwegen andeutet.

3.6. Transkriptom-Analyse

Um die genetische Kontrolle der Polyphenolbiosynthese zu untersuchen, führte der Kooperationspartner Prof. Dr. Juan Muñoz-Blanco (Universität Córdoba, Spanien) RNA-

Analysen mittels Microarray durch. Auf Grundlage der LC-MS-Analyse der spanischen Sortenkollektion von 2009 (s. **3.1.1**, S. 63f) wurden dazu Proben ausgewählt, die sich hinsichtlich ihrer Produktion an löslichen Polyphenolen am deutlichsten unterschieden.

Tab. 18: Für die komparativen Microarray-Analysen ausgewählte Sorten der spanischen Kollektion von 2009. Pro Metabolit bzw. –gruppe wurden die Varietät mit der höchsten und die mit der niedrigsten relativen Konzentration ausgewählt.

Metabolit bzw. –gruppe	Ausgewählte Sorten (höchste/niedrigste relative Konz.)
Gesamtpolyphenole/Pelargonidin-glucosid	5/21
Anthocyane	38/21
Flavonoide/Kaffeensäure-glucoseester	25/42
Phenylpropanoide/Zimtsäure-glucoseester	3/32
<i>p</i> -Cumarsäure-glucoseester	3/6
<i>p</i> -Cumarsäure-glucosid	25/6
Pelargonidin-rutinosid	38/42
Pelargonidin-malonylglucosid	42/6
Epiafzelechin-pelargonidin-glucosid	5/25
Cyanidin-glucosid	6/49
Kaempferol-glucosid	3/49
Kaempferol-glucuronid	4/42
Quercetin-glucuronid	1/38
Catechin	25/21
(Epi)Catechin Dimere	25/3
(Epi)Afzelechin-(epi)catechin Dimere	29/21
Ellagsäure	21/32

Für jeden Metabolit bzw. für jede Metabolitgruppe (wie Gesamtpolyphenole) wurde ein komparativer Ansatz durchgeführt, bei der jeweils die Varietät mit der höchsten relativen Konzentration gegen die Sorte mit dem niedrigsten Gehalt getestet wurde. Aufgrund der Korrelation der Rangabfolgen der Proben bei manchen Metaboliten und Metabolitgruppen (z.B. Gesamtpolyphenole und Pelargonidin-glucosid) ergaben sich auf diese Weise 17 komparative Microarray-Analysen (**Tab. 18**).

Die 17 paarweisen Vergleiche der Transkriptlevel ergaben für insgesamt 26416 ESTs (*expressed sequence tags*, exprimierte cDNA-Teilsequenzen) Expressionsunterschiede oberhalb eines

Schwellenwertes einer 4-fachen Änderung ($p < 0,01$). Während die RNA-Expression in den meisten Fällen um einen Faktor von unter 50 variierte, zeigten manche ESTs Unterschiede einer 200 bis 925-fachen Änderung (**Abb. 27A**). Letztere wurden als Kandidatengene ausgewählt (**Abb. 27B**).

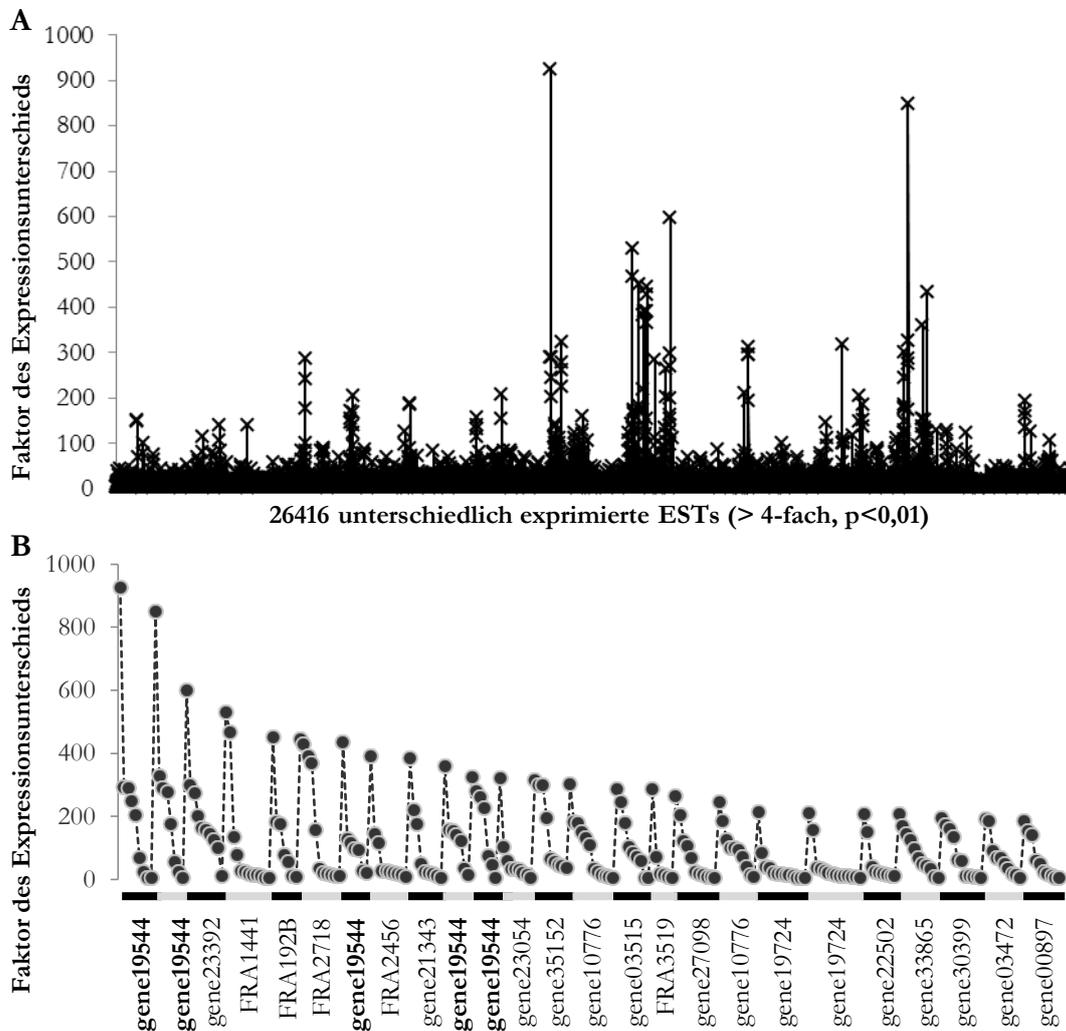


Abb. 27: Ermittlung der Kandidatengene. **A)** 26416 ESTs zeigten unterschiedliche Expressionslevel (> 4-fach, $p < 0,01$) in den Microarray-Analysen. **B)** Gene, die einen Expressionsunterschied oberhalb eines Faktors von 200 zeigten, wurden als Kandidatengene ausgewählt. Jedes Kreuz (**A**) bzw. jeder Spot (**B**) steht für den Expressionsunterschied eines ESTs einer vergleichenden Microarray-Analyse.

Wie an der Anzahl der Spots in **Abb. 27B** ersichtlich ist, zeigten die Kandidatengene jeweils in mehreren der 17 komparativen Microarray-Analysen deutliche Expressionsunterschiede. Manche ESTs waren aufgrund ihrer Redundanz mehrmals auf den Microarrays vertreten. So tauchte gene19544 fünfmal unter den in ihrer Expression am meisten variierenden Genen auf, gene10776 und gene19724 erschienen jeweils zweimal. Dies bewies die gute Reproduzierbarkeit des Tests.

Mit Ausnahme von FRA1441, FRA192B, FRA2718, FRA2456 und FRA3519 konnten anhand der Genomdatenbank von *F. vesca* (Shulaev *et al.*, 2011) Protein codierende Sequenzen für die ermittelten Kandidatengene gefunden werden (**Tab. 19**).

Tab. 19: Putative Annotationen der Kandidatengene.

Gen	Putative Annotation
gene19544	Peroxidase27 ähnlich
gene23392	Cucumisin ähnlich
FRA1411	lokalisiert auf scf0513150
FRA192B	keine Homologie
FRA2718	keine Homologie
FRA2456	keine Homologie
gene21343	Expansin-A8 ähnlich
gene23054	<i>hothead</i> ähnlich
gene35152	Spidroin-1 ähnlich
gene10776	SRG1 ähnlich
gene03515	Tasselseed-2 ähnlich
FRA3519	keine Homologie
gene27098	GDSL Esterase/Lipase ähnlich
gene19724	<i>class I small heat shock protein</i> (sHsp) ähnlich
gene22502	Acyl-CoA-bindendes Protein 4 ähnlich
gene33865	Ephrin-A1 (LERK-1) ähnlich
gene30399	<i>homeobox-leucine zipper ATTB-15</i> ähnlich
gene03472	Ubiquitin Carboxyl-terminale Hydrolase 12 ähnlich
gene00897	Defensin ähnlich

Der Beitrag von gene19544 zur Polyphenolbiosynthese wurde im weiteren Verlauf näher untersucht.

3.7. Die Rolle von gene19544 (*FaPRX27*) in der Ligninbiosynthese

3.7.1. Genexpression von *FaPRX27*

Gene19544, welches im Rahmen der Microarray-Untersuchungen in seiner Expression am meisten variierte, codiert vermutlich eine Peroxidase 27 (*FaPRX27*). Das Genom von *F. vesca* enthält 84 Domänen, die putative Häm-abhängige Peroxidasen codieren (www.supfam.org). Um

die physiologische Rolle von *FaPRX27* aufzuklären, wurde zunächst die Expression des *FaPRX27* Gens in vegetativem Gewebe, den Blüten und Früchten in unterschiedlichen Reifestadien mittels qPCR untersucht. Entscheidende Mengen an mRNA konnten nur in Wurzeln und in roten, reifen Früchten detektiert werden (**Abb. 28**). Die qPCR-Analyse wurde von Su-Ying Yeh durchgeführt.

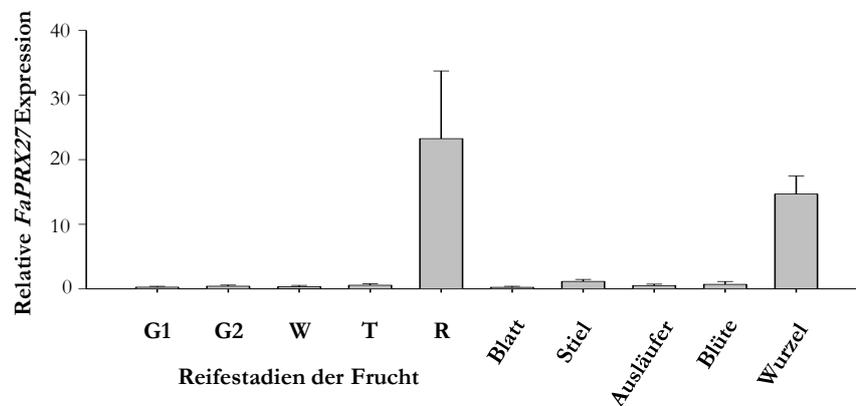


Abb. 28: Relative Genexpression von *FaPRX27* in verschiedenen Reifestadien der Früchte und unterschiedlichem Gewebe von *F. x ananassa* cv. Elsanta. Bei der qPCR-Analyse wurde das Interspacer-Gen als interne Kontrolle zur Normalisierung verwendet und die Genexpression in der weißen Frucht als Referenz auf den Wert 1 festgesetzt. Gezeigt sind Mittelwerte (+ SA) von 5-6 biologischen Replikaten mit zwei Ansätzen an cDNA.

3.7.2. Klonierung von *FaPRX27* und Expression des rekombinanten Proteins

Die Klonierung und Expression von *FaPRX27* wurde von Dr. Stephanie Hücherig durchgeführt. Die fünf ESTs der Microarray-Plattform deckten große Teile von gene19544 ab, der Vergleich mit bekannten Peroxidasesequenzen sowie der Abgleich mittels BLAST in NCBI und EMBL ergaben jedoch eine andere Intron-Exon-Struktur als in der *F. vesca* Genomdatenbank (Shulaev *et al.*, 2011) vorgeschlagen wurde. Der detaillierten Analyse zufolge besteht gene19544 aus zwei offenen Leserahmen (*open reading frame*, ORF), die aufgrund eines Fehlers bei der Annotation eines Introns fälschlicherweise miteinander verbunden worden sind. Dieses Intron entfernte ein Stopcodon, woraufhin der Sequenz der Peroxidase ein zweites Gen, welches für ein hydroxyprolinreiches Glykoprotein codiert, angeheftet wurde (s. Anhang **Abb. 60** und **Abb. 61**). Die nicht translatierten Regionen des ESTs bestätigten diese Annahme.

Demzufolge wurden Primer entworfen, die entsprechend der Sequenz von *FaPRX27* eine Nukleotidsequenz mit 990 bp Länge amplifizierten, welche in einem Protein bestehend aus

329 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 35,1 kDa und einem berechneten pI von 8,47 resultierte (**Abb. 29** und Anhang **Abb. 59**).

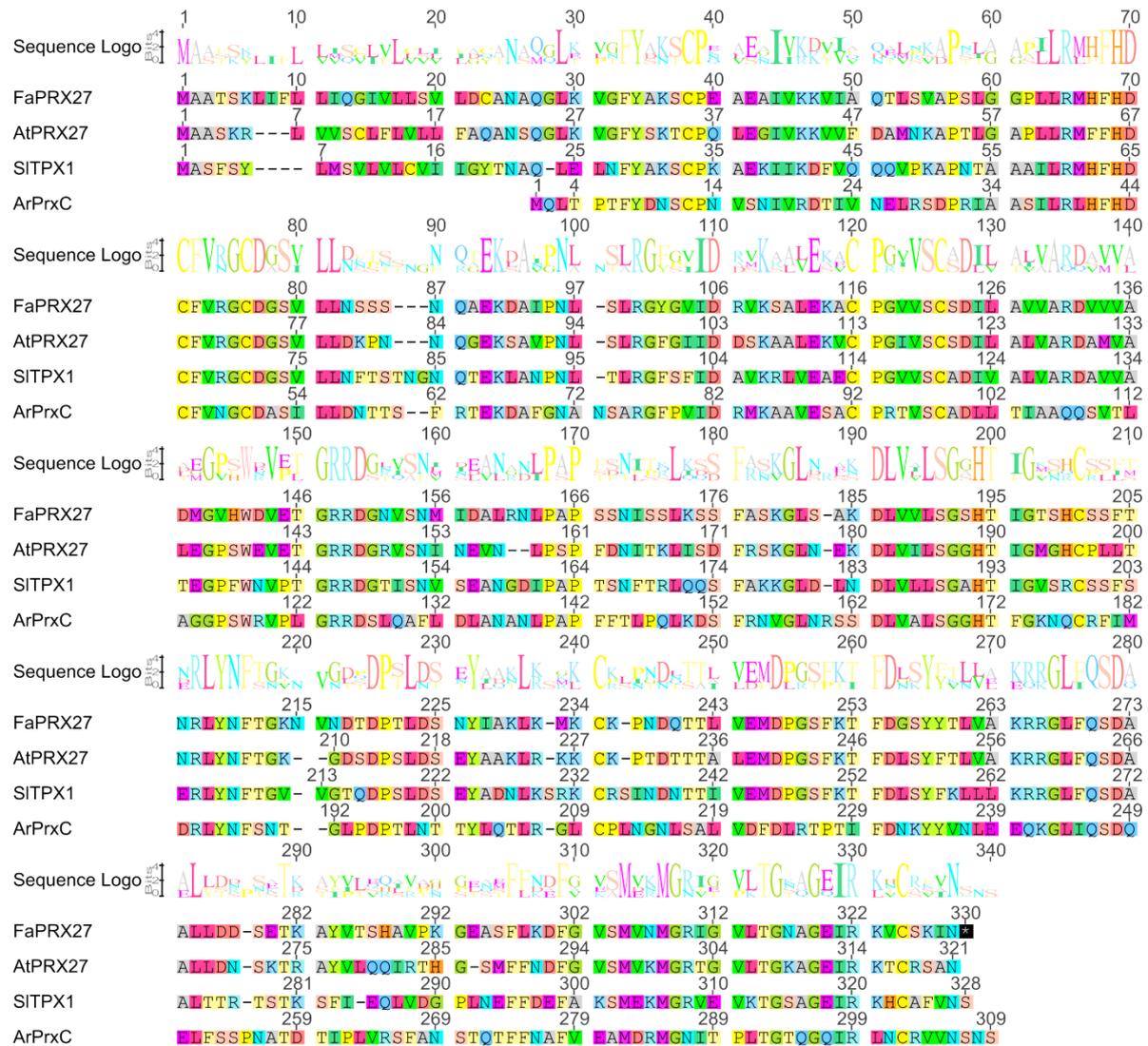


Abb. 29: Abgleich der Aminosäuresequenz verschiedener Klasse III Peroxidasen. *F. × ananassa* Peroxidase 27 (**FaPRX27**), *Arabidopsis thaliana* Peroxidase 27 (**AtPRX27**, gi|15232058|ref|NP_186768.1), *Solanum lycopersicum* Peroxidase 1 (**SITPX1**, gi|678547|gb|AAA65637.1), Meerrettich (*Armoracia rusticana*) Peroxidase C (**ArPrxC**, gi|14603|emb|CAA00083.1).

Die Motivsuche mittels ELM (*eukaryotic linear motif*, www.elm.eu.org, Dinkel *et al.*, 2012) deutete für den Bereich der ersten 27 Aminosäuren eine Rolle als Signalpeptid im Sekretionssystem an sowie eine transmembrane Region, die sich von Aminosäure 7 bis 29 erstreckt.

Die Volllänge der cDNA wurde zwischen den Schnittstellen von *Sma*I und *Xho*I in den pGEX Vektor kloniert und anschließend in Rosetta(DE3)pLysS Zellen transformiert. Nach Induktion der Bakterienzellen enthielt der Zellextrakt ein zusätzliches Fusionsprotein aus FaPRX27 mit GST-Tag von 61 kDa Größe (**Abb. 30**). Der Großteil des rekombinanten Proteins war unlöslich

und befand sich demzufolge womöglich in Einschlusskörpern (*inclusion bodies*) (Hoffmann *et al.*, 2004).

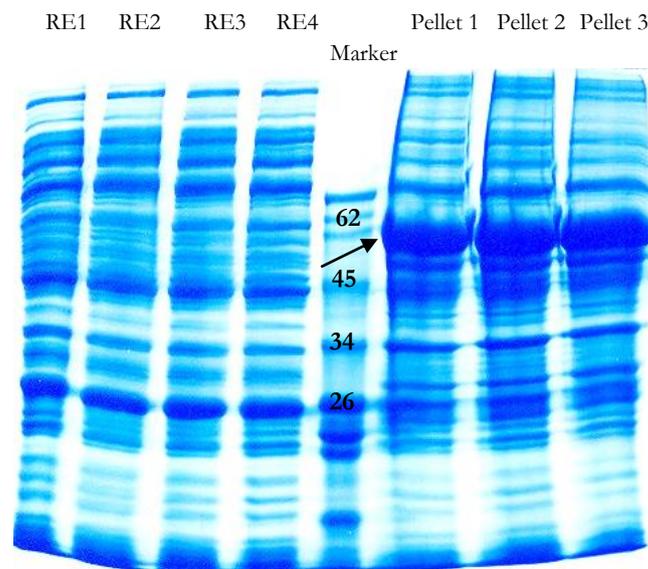


Abb. 30: SDS-PAGE-Analyse von *FaPRX27* exprimierenden *Escherichia coli* Rosetta(DE3)pLysS Zellen anhand vier verschiedener Rohextrakte (**RE**) und drei unterschiedlicher Pellets. Die markierte Bande bei 61 kDa entspricht der Summe aus *FaPRX27* (35,1 kDa) und GST-Tag (26 kDa).

3.7.3. Enzymassay mittels UV/Vis und LC-MSⁿ

Mit den löslichen Fraktionen des produzierten, rekombinanten Proteins führte Dr. Stephanie Hücherig einen Enzymassay durch. Als potentielle Substrate wurden Ferulasäure, Kaffeesäure und Coniferylalkohol unter Anwesenheit von Wasserstoffperoxid eingesetzt. Nach Zugabe der Substrate konnte photometrisch eine deutliche und schnelle Abnahme der Absorption erfasst werden, was einen Verbrauch der phenylpropanoiden Edukte nahe legte (**Abb. 31**).

Zudem verfärbten sich die Lösungen, in denen *FaPRX27* eingesetzt wurde, gelb. Nach Zugabe von *FaPRX27* konnte in einer Guajacol-Lösung eine zügige Violett-Färbung beobachtet werden, während der Ansatz mit der Leervektorkontrolle farblos blieb. Mit Guajacol als Substrat ließ sich eine enzymatische Aktivität von 0,02 $\mu\text{mol}/\text{min}$ pro mg Protein berechnen, wohingegen sich die Absorption unter Verwendung von Zimtsäure, *p*-Cumarsäure, Vanillin, Zimtaldehyd, *p*-Hydroxybenzaldehyd oder 3,4-Dihydroxybenzaldehyd nicht änderte. Eine mögliche Eigenabsorption des Proteinextrakts oder ähnliche Absorptionskoeffizienten von Edukten und Produkten könnten die photometrische Bestimmung der Enzymaktivität stören.

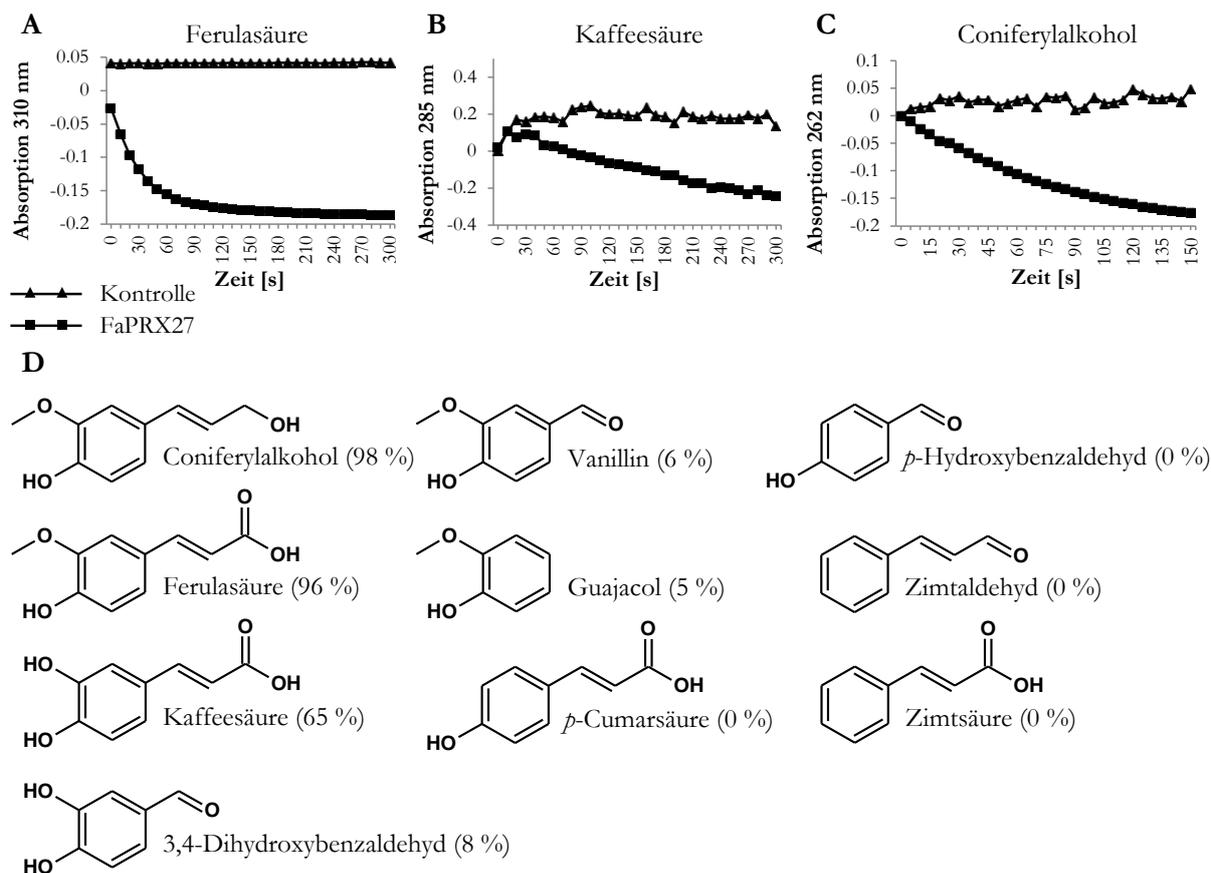


Abb. 31: Funktionale Charakterisierung der *F. × ananassa* Peroxidase 27 (FaPRX27). Zellextrakte von *Escherichia coli*, die FaPRX27 exprimierten, wurden mit 140 mM H₂O₂ und je 18 mM Substrat (Ferulasäure (A), Kaffeesäure (B) und Coniferylalkohol (C)) versetzt. Die Absorption bei 310, 285 bzw. 262 nm wurde am UV-Spektrometer verfolgt. Eine Abnahme der Absorption deutet auf einen Verbrauch der Substrate hin. Als Kontrolle diente der Leervektor pGEX 4T1. Die Ansätze wurden zusätzlich mittels LC-MSⁿ ausgewertet. Die eingesetzten Substrate und Anteile des Umsatzes (in Klammern) nach 5 min Inkubation sind dargestellt (D).

Die Enzymassays wurden daher nach abgeschlossener Reaktion zusätzlich mittels LC-MSⁿ analysiert, um potentielle Produkte nachweisen zu können. Während die Edukte Ferulasäure und Coniferylalkohol fast vollständig umgesetzt wurden, enthielten die Ansätze mit Kaffeesäure, Guajacol, Vanillin und 3,4-Dihydroxybenzaldehyd neben den Produkten noch einen Großteil ihrer Ausgangsverbindungen. Aufgrund des Mangels an Referenzsubstanzen konnte eine exakte Identifizierung der Produkte des Enzymassays zwar nicht erreicht werden, die Interpretation der Massenspektren ließ jedoch die Ausbildung dimerer Strukturen erkennen (Abb. 32).

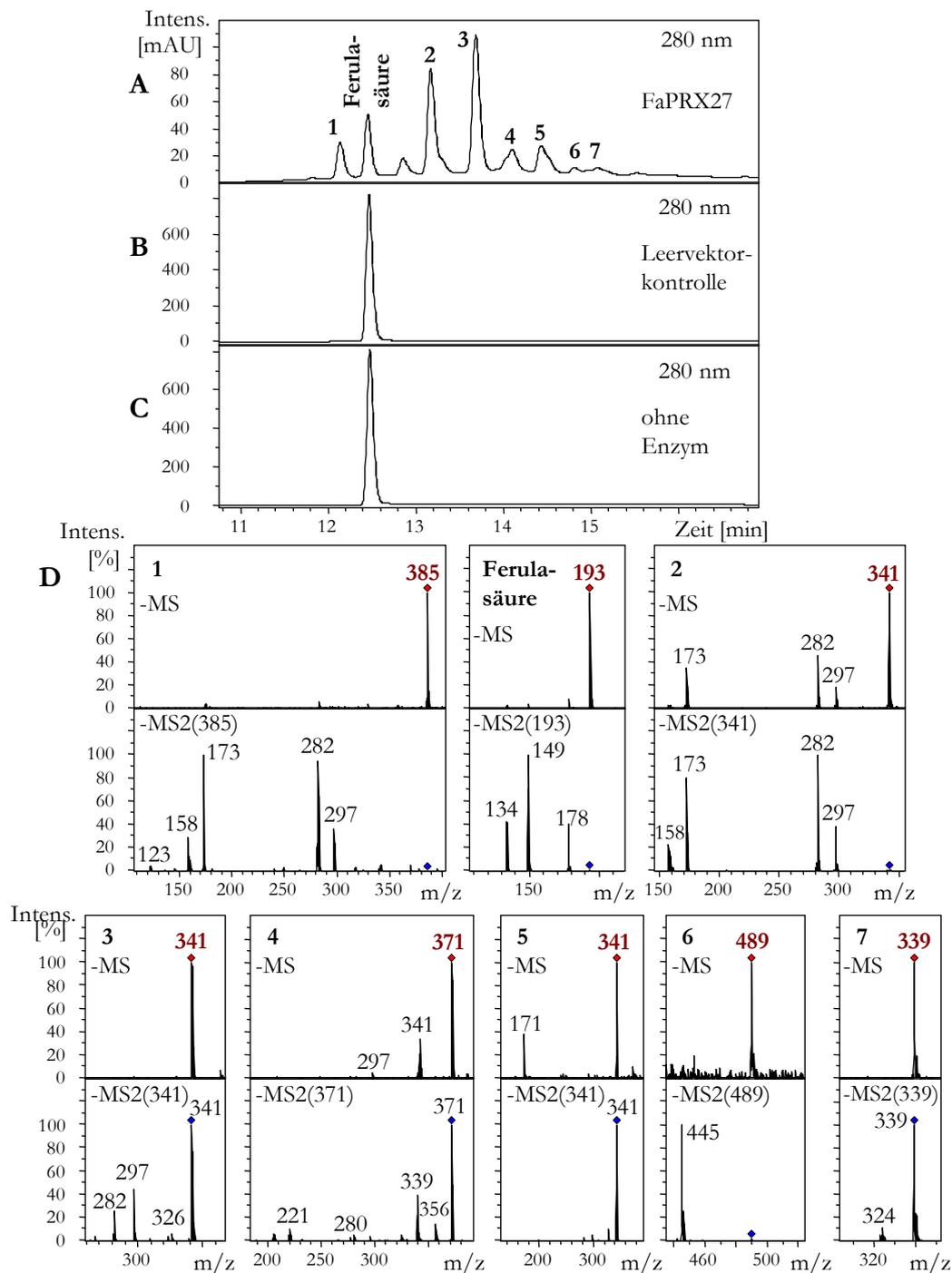


Abb. 32: LC-MSⁿ-Analyse des Enzymassays von FaPRX27 mit Ferulasäure als Substrat. Die UV-Spur bei 280 nm zeigt die Bildung neuer Produkte (A). Als Kontrolle dienen der Leervektor pGEX 4T1 (B) und ein Ansatz ohne Enzym (C). Die Massenspektren (-MS und -MS2 des angegebenen Ions) der Produkte 1-7 aus A lassen die Bildung dimerer Strukturen erkennen (D).

Verbindung 1 (MG = 386 g/mol) scheint ein Dehydrodimer von Ferulasäure zu sein, während die Strukturen der Verbindungen 2, 3, 4 und 5 (MG = 342 g/mol) vermutlich durch Decarboxylierung einer dehydrodimeren Vorstufe entstanden sind (Ward *et al.*, 2001). Diese Daten deuten auf eine Rolle von FaPRX27 in der Ligninbiosynthese hin.

3.7.4. Bestimmung des Ligningehalts

Aufgrund der angedeuteten Funktion von *FaPRX27* in der Ligninbiosynthese wurde in einigen Genotypen der Ligningehalt bestimmt. Hierzu wurden die zwei Sorten (#3 und 5) mit den höchsten relativen Konzentrationen an löslichen Polyphenolen und zwei Varietäten (#21 und 25) mit den niedrigsten Gehalten eingesetzt (s. **Abb. 9**, S. 64). Die Messung des Gesamtligningehalts ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den ausgewählten Genotypen (**Abb. 33**).

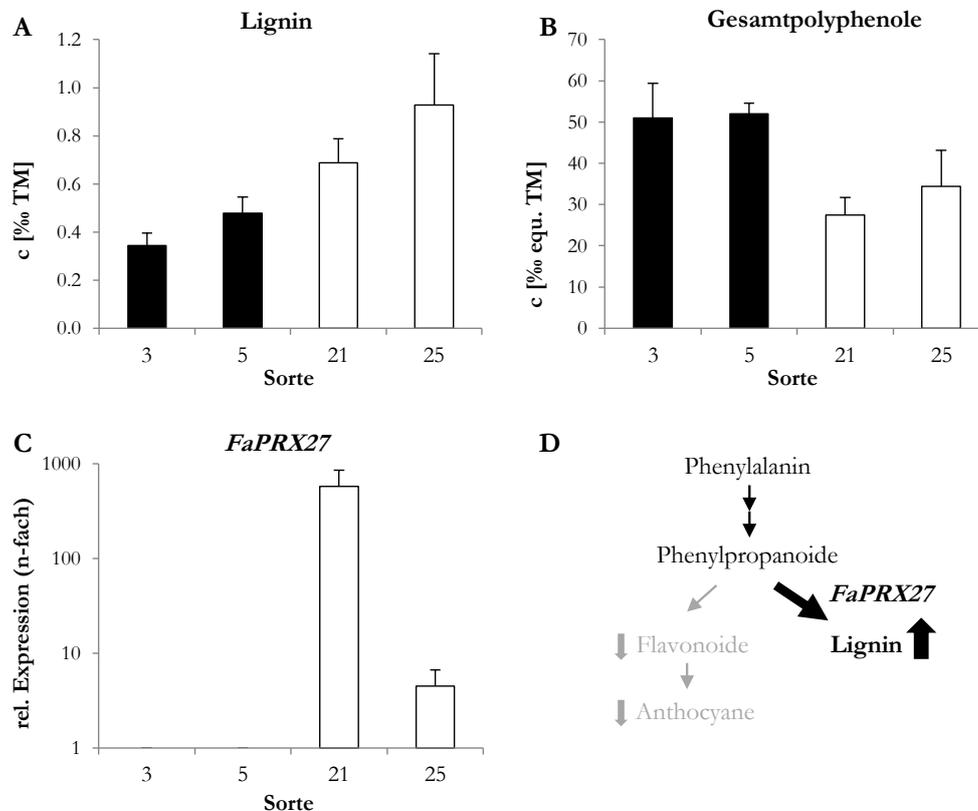


Abb. 33: Ligningehalt verschiedener *F. × ananassa* Sorten mit hohen (schwarze Balken) und niedrigen (weiße Balken) Gehalten an löslichen Polyphenolen (**A**). Gesamtgehalt an löslichen Polyphenolen (**B**). Relative Expression von *FaPRX27*, berechnet aus den komparativen Microarray-Analysen #5/#21 und #5/#25 (**C**). Die Transkriptmengen in #3 und #5 unterschieden sich nicht und wurden auf 1 gesetzt. Vereinfachtes Schema der putativen Rolle von *FaPRX27* in der Polyphenolbiosynthese (**D**).

Früchte mit einem hohen Anteil an löslichen Polyphenolen besaßen eine geringere Ligninkonzentration als Früchte mit einem niedrigen Anteil an löslichen Polyphenolen. In den Microarray-Untersuchungen zeigte sich bei der Analyse der Sorten #3 und 21, dass in Sorte #21 die mRNA-Expression von *FaPRX27* um das 925-fache im Vergleich zu #3 erhöht war. Somit ergab sich ein direkt proportionaler Zusammenhang zwischen der Expression von *FaPRX27* und einem hohen Ligningehalt. Die Peroxidase schien die gemeinsamen Vorstufen von Lignin und

Flavonoiden zugunsten der Ligninbiosynthese zu nutzen, was eine Abnahme des Gehalts an löslichen Polyphenolen zur Folge hatte.

Die Resultate zeigten, dass *FaPRX27* für eine funktionale Peroxidase codiert, die an der Produktion des Zellwandpolymers Lignin in Wurzeln und reifen Erdbeerfrüchten beteiligt ist.

3.8. QTL-Analyse

Um Zusammenhänge zwischen bestimmten Genomregionen und der Ausbildung agronomisch entscheidender Merkmale, wie Fruchtfarbe, weiter zu untersuchen, wurden von den Kooperationspartnern Dr. Béatrice Denoyes-Rothan (INRA, Bordeaux, Frankreich) und Dr. Amparo Monfort (IRTA, Barcelona, Spanien) anhand zweier Segregationspopulationen der Kulturerdbeere *F. × ananassa* QTL (*quantitative trait loci*)-Analysen durchgeführt.

3.8.1. QTL für Fruchtfarbe in der Region von *FaPRX27*

Das Gen *FaPRX27* befindet sich in der oberen Region des *linkage group* 3 (LG3, Kopplungsgruppe) Chromosoms von *F. vesca* (Shulaev *et al.*, 2011). Aufgrund der Syntänie und Kolinearität zwischen diploiden und octoploiden *Fragaria* Genomen wurde die Information des diploiden Genoms von *F. vesca* auf die kultivierte Gartenerdbeere *F. × ananassa* angewandt (Rousseau-Gueutin *et al.*, 2008). Folglich wurde angenommen, dass die vier Kopplungsgruppen, welche als LG3a, LG3b, LG3c und LG3d bezeichnet wurden, das *FaPRX27* Gen aufwiesen. Diese vier Kopplungsgruppen sind der Homoeologie-Gruppe 3 (HG3), die der LG3 der diploiden *F. vesca* homolog ist, zugeordnet. Um das Gen in den beiden Segregationspopulationen zu lokalisieren, wurden polymorphe Marker entwickelt. Als Sequenzen dienten Mikrosatelliten (SSR, *simple sequence repeats*), die sich nahe dem Peroxidasegen befanden. Die Marker wurden als „SSRCL317CGfB2“ für die spanische F2-Segregationspopulation Dover × Camarosa bzw. „SSR-PER“ für die französische F1-Segregationspopulation Capitola × CF1116 bezeichnet. Detektierte Polymorphismen wurden in den Populationen verzeichnet, wobei die Marker jeweils am oberen Ende einer der vier homoeologen Kopplungsgruppen lokalisiert wurden, LG3-D für die spanische bzw. LG3-A für die französische Population (Rousseau-Gueutin *et al.*, 2008).

Nur QTLs, die signifikant oberhalb der Bestimmungsgrenze von 3,0 für die spanische bzw. 3,1 für die französische Segregationspopulation lagen und co-lokalisiert zu *FaPRX27* und somit zu den entwickelten Markern auftraten, wurden berücksichtigt. In der französischen Segregationspopulation konnten in der Nähe des Peroxidasegens QTLs, die mit dem Gehalt an

Gesamtpolyphenolen sowie an Flavonoiden verknüpft sind, identifiziert werden. In der spanischen Population ergaben sich QTLs für Epiafzelechin-glucosid und den Flavonoidgehalt in der Region von *FaPRX27*. In beiden Populationen befand sich co-lokalisiert zu *FaPRX27* ein QTL, welches mit der sichtbaren Intensitätszunahme der Fruchtfarbe gekoppelt ist (**Abb. 34**).

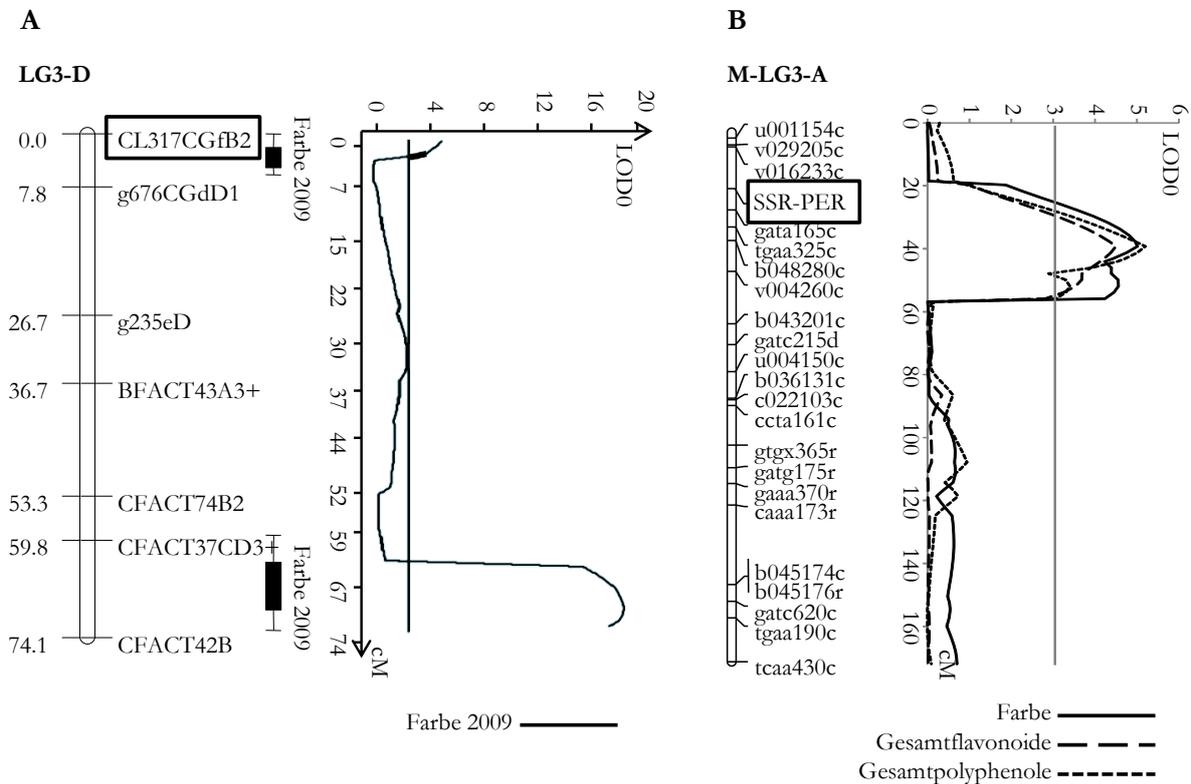


Abb. 34: QTL-Analysen der spanischen und französischen Segregationspopulationen von *F. × ananassa*. Die Kopplungsgruppe (**LG**) 3-D aus der Genkarte der spanischen Population und QTL-Detektion für Fruchtfarbe (**A**). Die männliche LG3-A der französischen Population und QTLs für Farbe (visuell beurteilt), Gesamtflavonoid- und Gesamtpolyphenolgehalt (**B**). Die entwickelten Marker zur Lokalisierung des *FaPRX27*-Gens sind umrahmt. **LOD0** *limit of determination* (Bestimmungsgrenze).

3.8.2. QTL für DMHF-glucosid

In der französischen Segregationspopulation Capitola × CF1116 von 2010 konnte ein QTL, der mit der Produktion von DMHF-glucosid verknüpft ist, gefunden werden (**Abb. 35**). Er befindet sich auf *scaffold* 0513165 in der Nähe des Gens der Chinonreduktase aus *F. × ananassa* (*FaQR*), welches an der Biosynthese von DMHF in Erdbeeren beteiligt ist (Raab *et al.*, 2006).

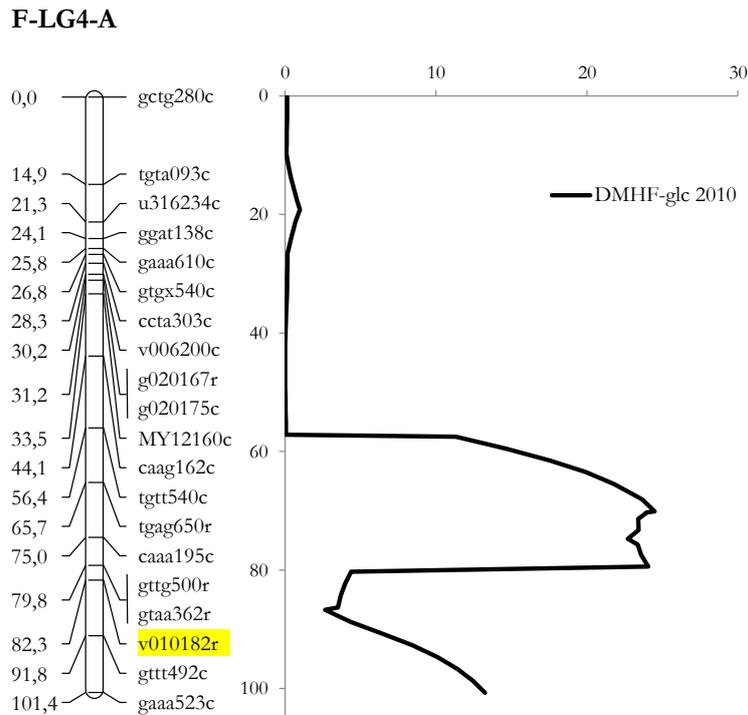


Abb. 35: QTL-Analyse der französischen Segregationspopulation von 2010. Die weibliche Kopplungsgruppe (**LG**) 4-A weist im Bereich von *scaffold* 0513165 ein QTL für DMHF-glucosid auf. Der Marker v010182r (gelb hinterlegt) ist dem *FaQR* (*F.* × *ananassa* Chinonreduktase)-Gen aus dem diploiden Genom von *F. vesca* am nächsten.

Ein weiterer QTL konnte für das Jahr 2010 in der weiblichen Kopplungsgruppe (LG) 1-B auf *scaffold* 0513095 identifiziert werden. Signifikante Resultate für die beiden QTLs ergaben sich allerdings nur für die Mittelwerte der Population von 2010. Wurden die Werte der drei LC-MS-Bestimmungen separat zur QTL-Analyse eingesetzt, befanden sich die QTLs etwas weiter von der Lokalisation von *FaQR* entfernt. Zudem konnten die Positionen der QTLs in der Population von 2009 nicht bestätigt werden.

Zur Bestätigung der QTLs sind daher weitere Wiederholungen, u.a. mit der Population von 2011, nötig.

3.9. Bioinformatische Auswertung (*untargeted analysis*)

Bei einer zielgerichteten Analyse können aufgrund des Umfangs der Quantifizierungen nur wenige Substanzen betrachtet werden. Um aber viele Proben anhand von allen in den LC-MS-Läufen vorkommenden Peaks miteinander vergleichen zu können, waren bioinformatische Untersuchungen nötig.

Grundlage für eine bioinformatische Auswertung ist die Erstellung einer Peakliste aus den LC-MSⁿ-Chromatogrammen. Dazu wurden die Läufe zunächst in einheitlich positive oder negative MS¹-Daten konvertiert, woraus anschließend mittels XCMS in R Peaklisten erstellt wurden. Durch Subtraktion der Leerläufe wurden alle Störsignale, wie z.B. Verunreinigungen durch das Lösungsmittel, das Gerät etc., entfernt. Durchschnittlich wurden Peaklisten von etwa 200 – 500 Peaks gebildet.

3.9.1. Hauptkomponentenanalyse (PCA) und *loadings*

Die erste Probenlieferung der spanischen Kooperationspartner bestand aus 16 verschiedenen Sorten (**Tab. 4**, S. 17). Parallel zur manuellen relativen Quantifizierung bekannter Metabolite (*Metabolite Profiling*), wurde die Kollektion bioinformatisch auf Unterschiede jenseits der bekannten Substanzen hin untersucht (*untargeted analysis*). Eine Methode zur Visualisierung von Unterschieden zwischen vielen verschiedenen Proben ist die Hauptkomponentenanalyse (*principle component analysis*, PCA). Hierbei wurden alle in einem LC-MS-Lauf vorkommenden Verbindungen miteinbezogen, was den entscheidenden Vorteil gegenüber der manuellen Auswertung birgt. Die Darstellung erfolgte im Koordinatensystem mit den beiden ersten Hauptkomponenten (PC1 und PC2) als x- und y-Achse. Je unterschiedlicher die Proben waren, desto größer erschien ihr Abstand im Diagramm.

Die drei Bestimmungen lagen in der PCA jeweils nah beieinander, was deren große Ähnlichkeit zum Ausdruck brachte (**Abb. 36**). Da die drei Aufarbeitungen unabhängig stattfanden, stand dies für die gute Reproduzierbarkeit der gesamten Methodik.

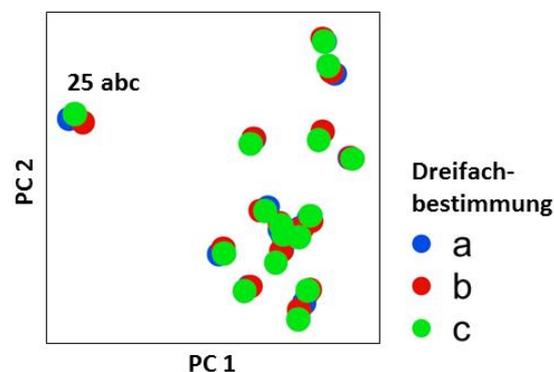


Abb. 36: Hauptkomponentenanalyse (PCA) 16 verschiedener Erdbeersorten von 2009 aus Spanien.

Varietät 25 (*F.* × *anamassa* cv. Selva AF) sonderte sich von den restlichen Proben ab. Da auch hier die Dreifachbestimmung nah beisammen lag, kann man davon ausgehen, dass Selva AF kein

zufälliger Ausreißer war, sondern sich tatsächlich besonders gegenüber den anderen Sorten verhielt.

Da parallel die Ergebnisse der zielgerichteten Auswertung (s. 3.1, S. 63) vorlagen, wurde eine weitere PCA durchgeführt, in der zwei Sorten (#21 „Sweet Charlie“ und #25 „Selva AF“) mit niedrigem und drei (#3 „Ventana“, #5 „Carmela“ und #38 „Camarosa“) mit hohem Gesamtpolyphenolgehalt miteinander verglichen wurden (**Abb. 37**). Hier sind zusätzlich die für die Aufspaltung verantwortlichen Peaks (*loadings*) abgebildet.

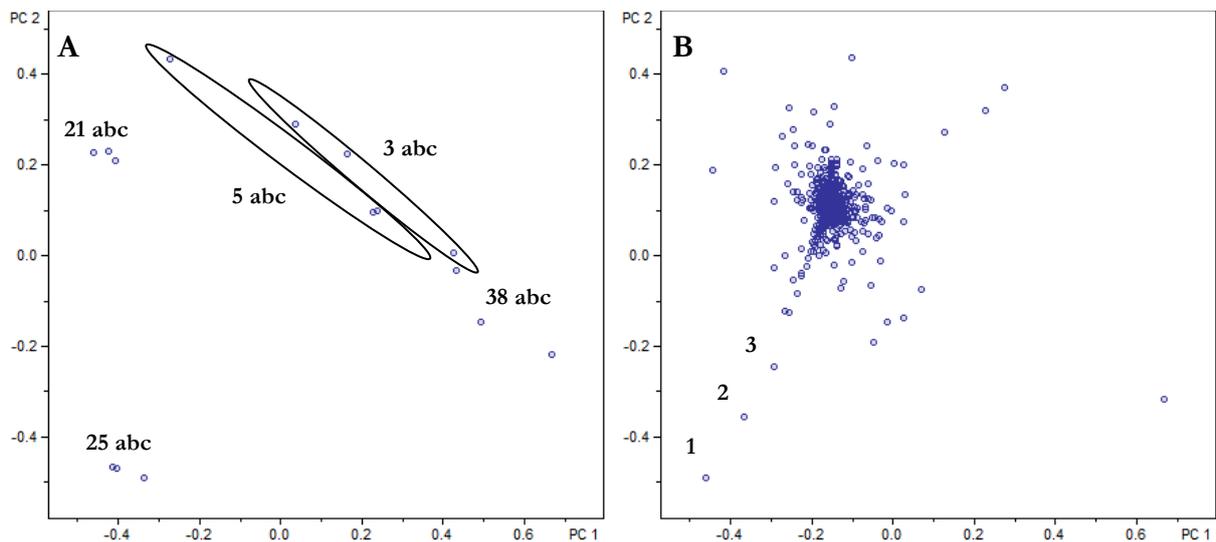


Abb. 37: PCA verschiedener Sorten in Dreifachbestimmung (a, b und c) (A). Dazugehörige *loadings* (B): Für die Separation von Var. 25 verantwortliche Peaks sind mit 1, 2 und 3 indiziert.

Anhand der *loadings* konnte herausgefunden werden, aufgrund welcher Metabolite sich Varietät 25 von den anderen Proben absonderte. Während *loading* 3 für eine bekannte Substanz, das Catechin Dimer (Proanthocyanidin) stand, waren *loadings* 1 und 2 unbekannt. Die relative Quantifizierung dieser Verbindungen zeigte, dass sich Varietät 25 durch besonders hohe Gehalte hervorhob (**Abb. 38**).

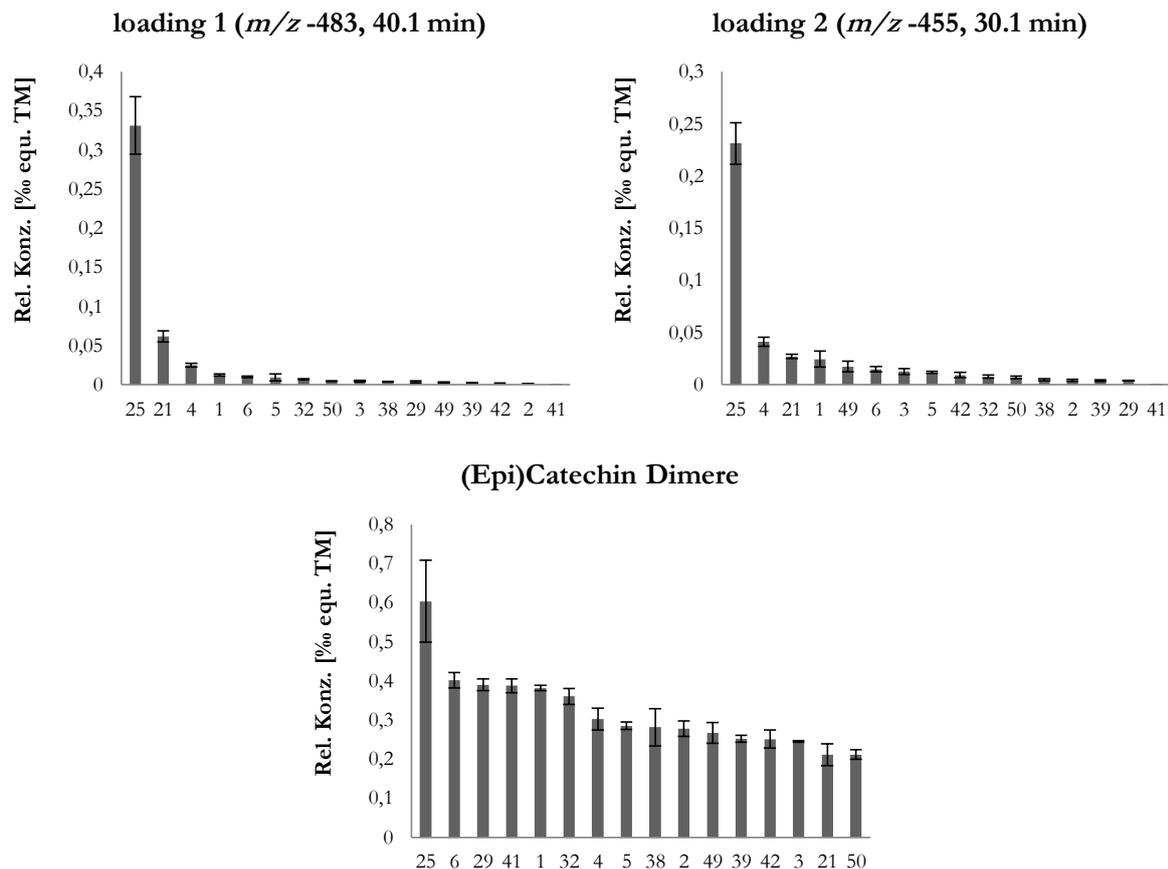


Abb. 38: Relative Gehalte \pm SA der Metabolite, aufgrund derer sich *F. × ananassa* Selva AF (Varietät 25) von den anderen untersuchten Sorten unterscheidet.

Auf die beiden unbekannt Metaboliten wird in der Diskussion (s. 4.1.3.2, S. 128ff) näher eingegangen.

3.9.2. PCA mit t-Test und HCA

Die französischen Sortenkollektionen und Segregationspopulationen wurden mit PCA und HCA (*hierarchical cluster analysis*) ausgewertet. Der Vorteil einer HCA gegenüber *loadings*-Diagrammen ist die Einberechnung eines Signifikanzniveaus. Verschiedene Gruppen einer PCA wurden mittels t-Test oder ANOVA unter einem bestimmten Signifikanzniveau verglichen. Somit wurden nur Peaks, die signifikant zur Separation der Gruppen beitrugen, ermittelt. Die Darstellung erfolgte jeweils in einer *Heat Map*.

Die Berechnung der Unterschiede zwischen den Jahrgängen war nicht möglich, da die Proben nicht gleichzeitig zur Verfügung standen. Um externe Fehlerquellen zu vermeiden, hauptsächlich die der LC-MS-Analyse, wie z.B. die Messung nach einem Säulenwechsel, ist eine zeitnahe Messung aller zu vergleichenden Proben notwendig.

3.9.2.1. Differenzierung der Proben in einer PCA aufgrund verschiedener Messzeitpunkte

In **Abb. 39** ist eine PCA der französischen Sortenkollektionen von 2010 und 2011 dargestellt.

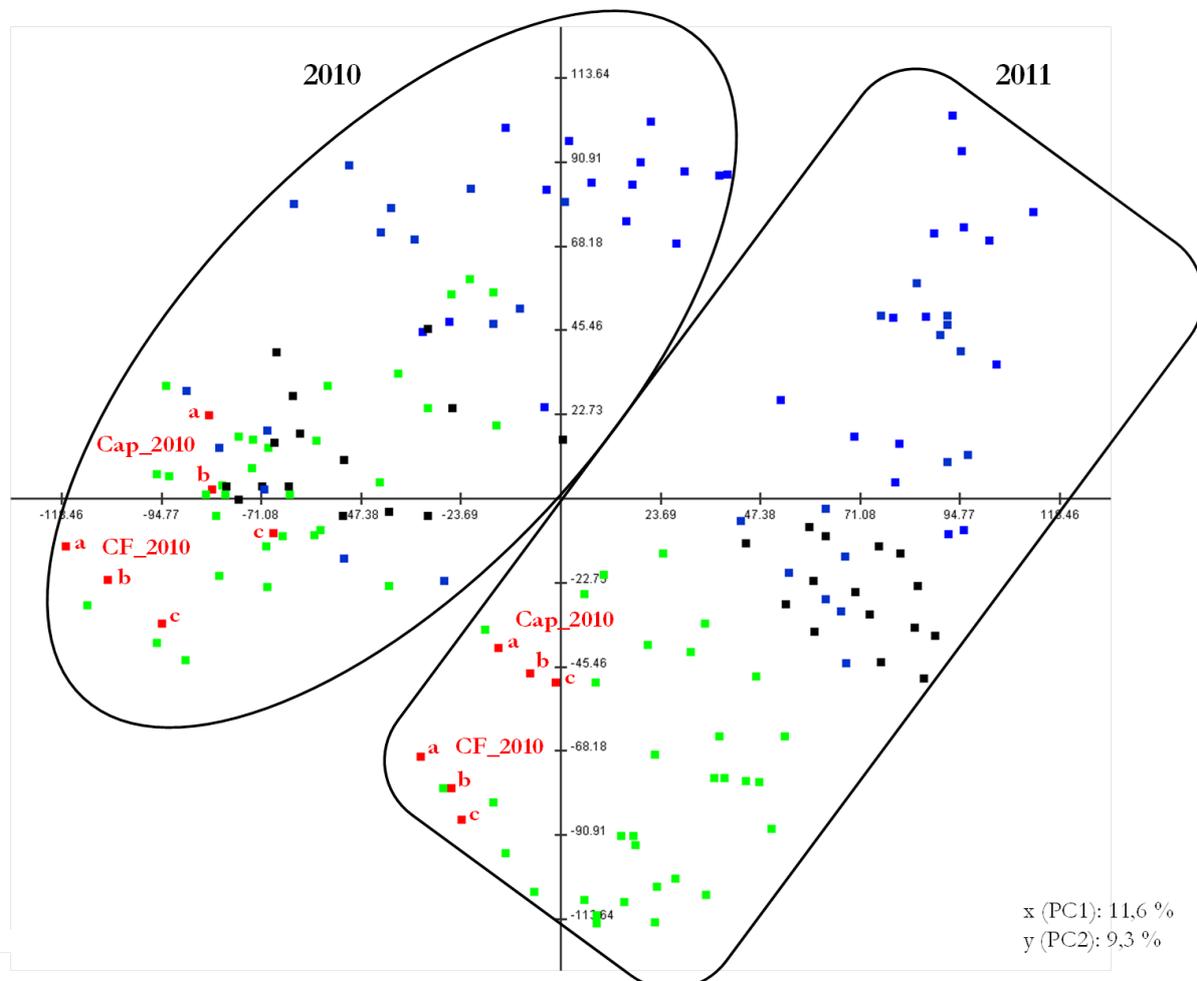


Abb. 39: PCA der französischen Sortenkollektionen von 2010 (**linker Rahmen**) und 2011 (**rechter Rahmen**) in Dreifachbestimmung (a, b und c). Die rote Markierung identifiziert die beiden Sorten aus dem Jahr 2010 (**Cap** Capitola und **CF** CF1116), die gemeinsam mit der Kollektion von 2011 erneut aufgearbeitet wurden, um den Beitrag des unterschiedlichen Messzeitpunktes zu untersuchen. Die Gruppen, die sich innerhalb des Jahrgangs 2011 gegensätzlich verhielten, sind grün und blau markiert. Die Färbung wurde für den Jahrgang 2010 übernommen, sodass gleiche Sorten in beiden Jahren gleich gefärbt sind, um zu zeigen, dass sich der Großteil der Proben in beiden Jahrgängen annähernd konstant verhielt.

Die drei Werte der drei Aufarbeitungen lagen jeweils nah beisammen, was für die gute Reproduzierbarkeit der Methodik sprach.

Zudem war eine auffällige Gruppierung der Proben in zwei Blöcke ersichtlich, die allerdings nicht den unterschiedlichen Umwelteinflüssen von 2010 und 2011 zuzuordnen war, sondern den verschiedenen Messzeitpunkten. Dies war durch die rot markierten Proben ersichtlich. CF_2010

im linken Block war dieselbe Probe wie CF_2010 im rechten, ebenso Cap_2010. Diese Proben stammten aus der Ernte 2010 und wurden zum Vergleich mit den Proben aus dem Jahr 2011 erneut aufgearbeitet und vermessen. Die Lagerung fand im lyophilisierten Zustand bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter Stickstoffatmosphäre statt, sodass von einer Änderung der Beschaffenheit der Probe nicht auszugehen war. Die Verschiebung zwischen CF_2010 (gemessen in 2010) und CF_2010 (gemessen in 2011) entsprach der Distanz zwischen den beiden gesamten Messreihen. Die Aufspaltung der Proben in die zwei Gruppen (2010 und 2011) war somit auf schwankende Messeinheiten der Gerätschaften zurückzuführen.

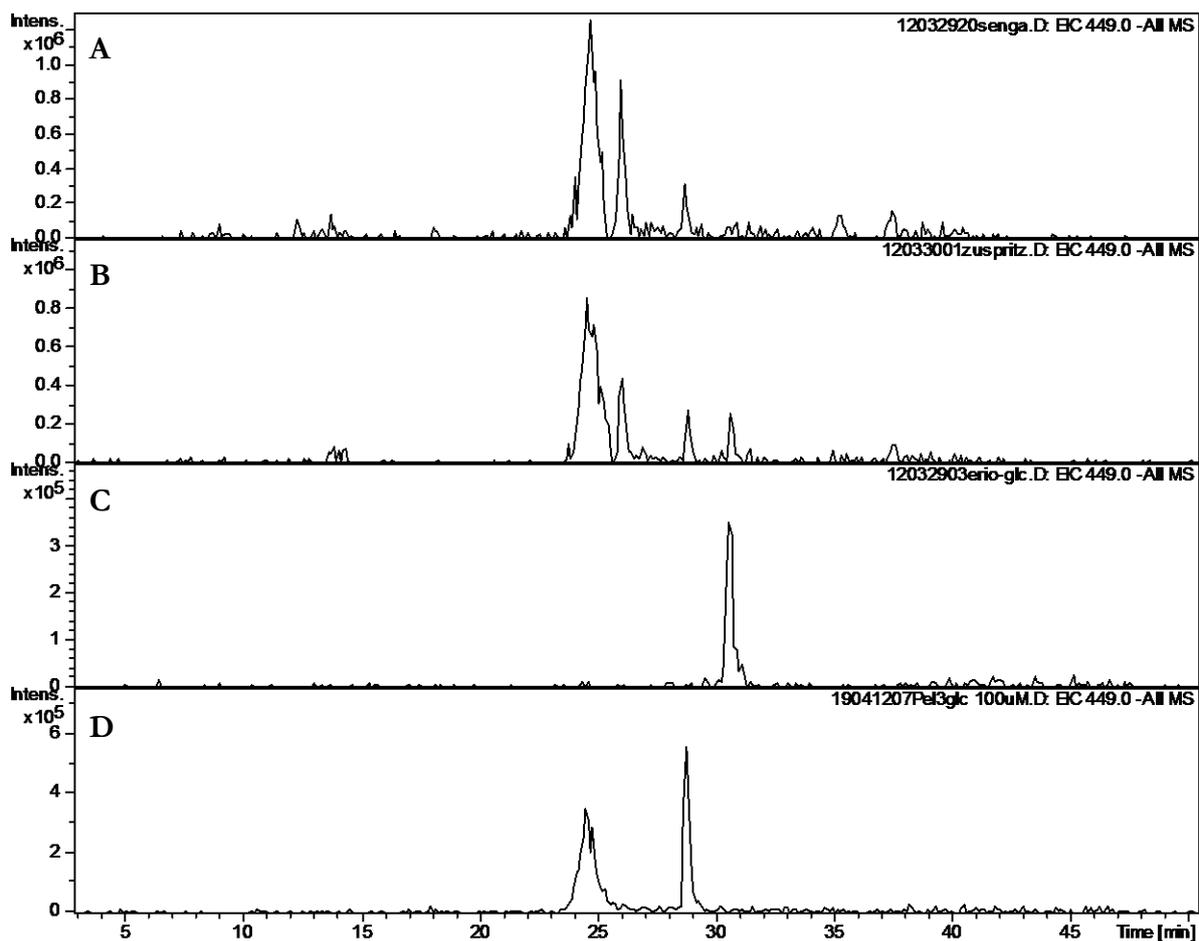


Abb. 40: LC-MS-Untersuchung. Ionenspuren von m/z 449 (negativer Modus) eines Extraktes aus Erdbeerfrüchten (*F. × ananassa* cv. Senga Sengana) (A), Zuspritzversuch (Extrakt + Eriodictyol-glucosid) (B), Eriodictyol-glucosid (C) und Pelargonidin-3-glucosid (D).

Einem t-Test zwischen den beiden Blöcken 2010 und 2011 zufolge war für die Aufteilung der Proben aufgrund verschiedener Messzeitpunkte u.a. ein Peak mit m/z 449 im negativen Modus verantwortlich, der bei 24,5 min eluierte. Aufgrund des m/z -Wertes wurde in dem Peak zunächst das $[\text{M}-\text{H}]^-$ -Ion von Eriodictyol-glucosid ($M = 450\text{ g/mol}$) vermutet. Das Einspritzen der authentischen Vergleichssubstanz zeigte, dass Eriodictyol-glucosid eine Retentionszeit von

30,6 min (**Abb. 40C**) aufwies. Um eine Beeinflussung der Retentionszeit durch etwaige Matrixeffekte ausschließen zu können, wurde ein Zuspritzversuch (**Abb. 40B**) durchgeführt.

Im Vergleich zur Referenz zeigte sich beim Zuspritzversuch ein zusätzlicher Peak bei 30,6 min, der somit anhand der Retentionszeit und auch des MS²-Spektrums Eriodictyol-glucosid zugeordnet werden konnte, da hier lediglich das [M-H]⁻-Ion des Aglykons bei m/z 287 auftrat. Die unbekannte Verbindung bei 24,5 min wies hingegen das in **Abb. 41** dargestellte MS²-Spektrum auf, welches sich gut von einer durch Wasseranlagerung ausgelösten Chalkonform von Pelargonidin-3-glucosid erklären ließ (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009). Da auch Cyanidin-3-glucosid ($[M]^+ = 449 m/z$) einen derartigen Peak ($[M-H+H_2O]^- = 465 m/z$) aufwies, schien die Bildung von Chalkonen durch Wasseranlagerung unter den Bedingungen in einer Elektrosprayionisationskammer möglich. **Abb. 40D** zeigt, dass die Standardsubstanz Pelargonidin-3-glucosid ($[M]^+ = 433 m/z$) das negative Ion bei $449 m/z$ ebenfalls aufwies und dessen Retentionszeit und MS²-Spektrum exakt mit den Werten der unbekanntes Verbindung übereinstimmte.

Das gleiche MS²-Spektrum wurde von einem weiteren Peak in der Ionenspur von m/z 449 im negativen Modus bei 28 min aufgezeigt, der sowohl im Chromatogramm von *F. × ananassa* cv. Senga Sengana, als auch in dem der authentischen Referenz Pelargonidin-3-glucosid vorkam (**Abb. 40**). Da sich die beiden Peaks auf der HPLC-Säule trennten, musste die Chalkonbildung zu unterschiedlichen Zeitpunkten stattfinden. Die Verbindung bei 24,5 min eluierte zeitgleich mit der Anthocyan-Form von Pelargonidin-3-glucosid und wurde demnach erst in der Ionenquelle (ESI) generiert, während das Chalkon bei 28 min bereits in Lösung gebildet wurde.

Dies deckte sich mit den Ergebnissen des t-Tests der beiden an verschiedenen Zeitpunkten gemessenen Gruppen aus der PCA (**Abb. 39**, S. 108), wonach nur das in der Ionenquelle gebildete Chalkon zur Differenzierung der Proben aufgrund schwankender Messeigenheiten der Gerätschaften beitrug.

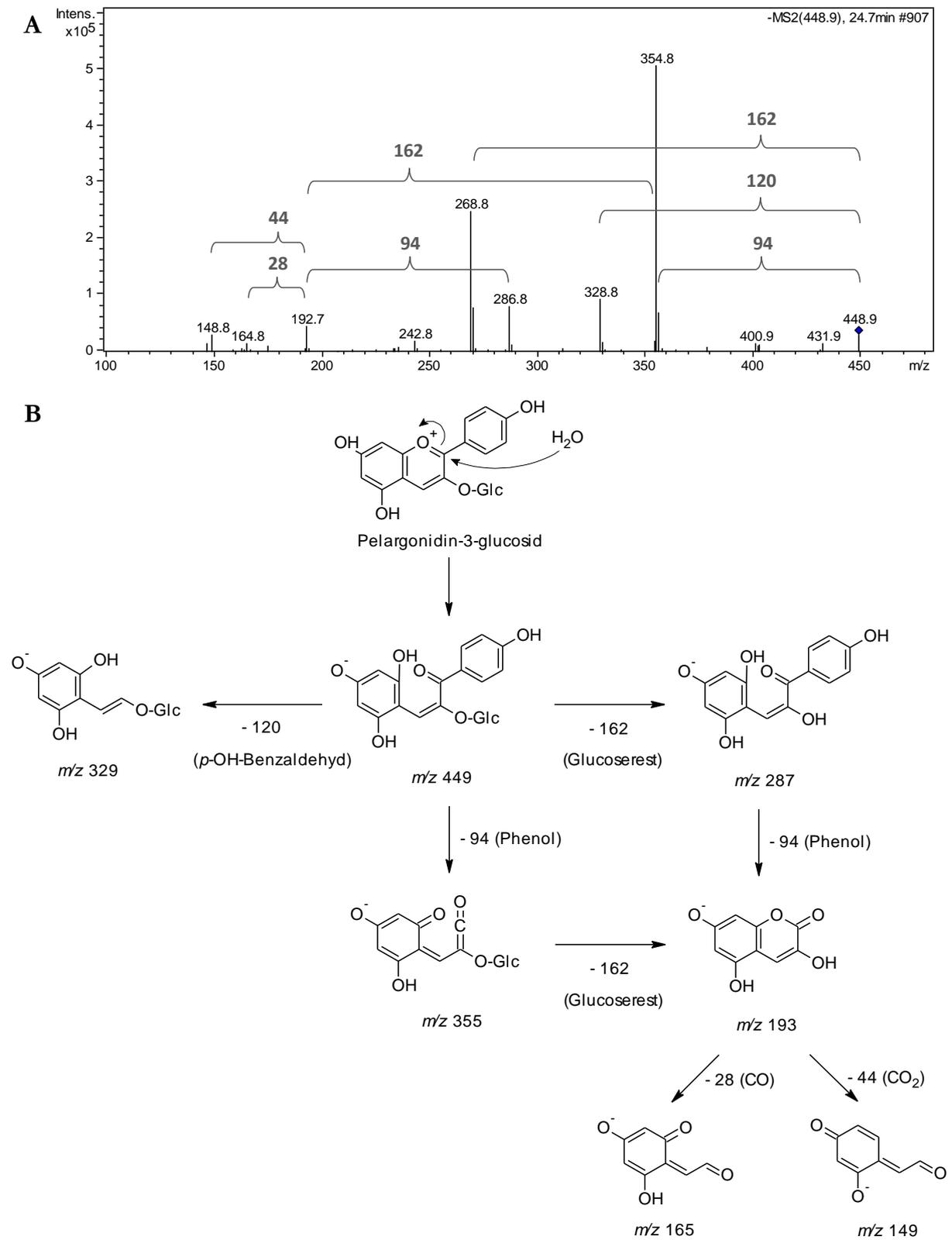


Abb. 41: MS²-Spektrum der Verbindung mit m/z 449 (im negativen Modus) bei 24,5 bzw. 28 min (A) mit putativer Fragmentierung (B).

3.9.2.2. Für die Charakterisierung der Proben verantwortliche Metabolite

Ein statistischer Vergleich zwischen den Jahrgängen der Sortenkollektion, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessen wurden, war aufgrund der Messschwankungen nicht möglich. Bei der Betrachtung jedes einzelnen Jahrgangs für sich (**Abb. 39**, S. 108), ließ sich aber eine Konstanz erkennen. Die gleichen Proben, die sich im Jahr 2010 an der linken Extreme der Kollektion befanden, erschienen in 2011 ebenfalls dort (in **Abb. 39** grün). Gleiches galt für die Proben auf der rechten Seite des jeweiligen Jahrgangs (in **Abb. 39** blau).

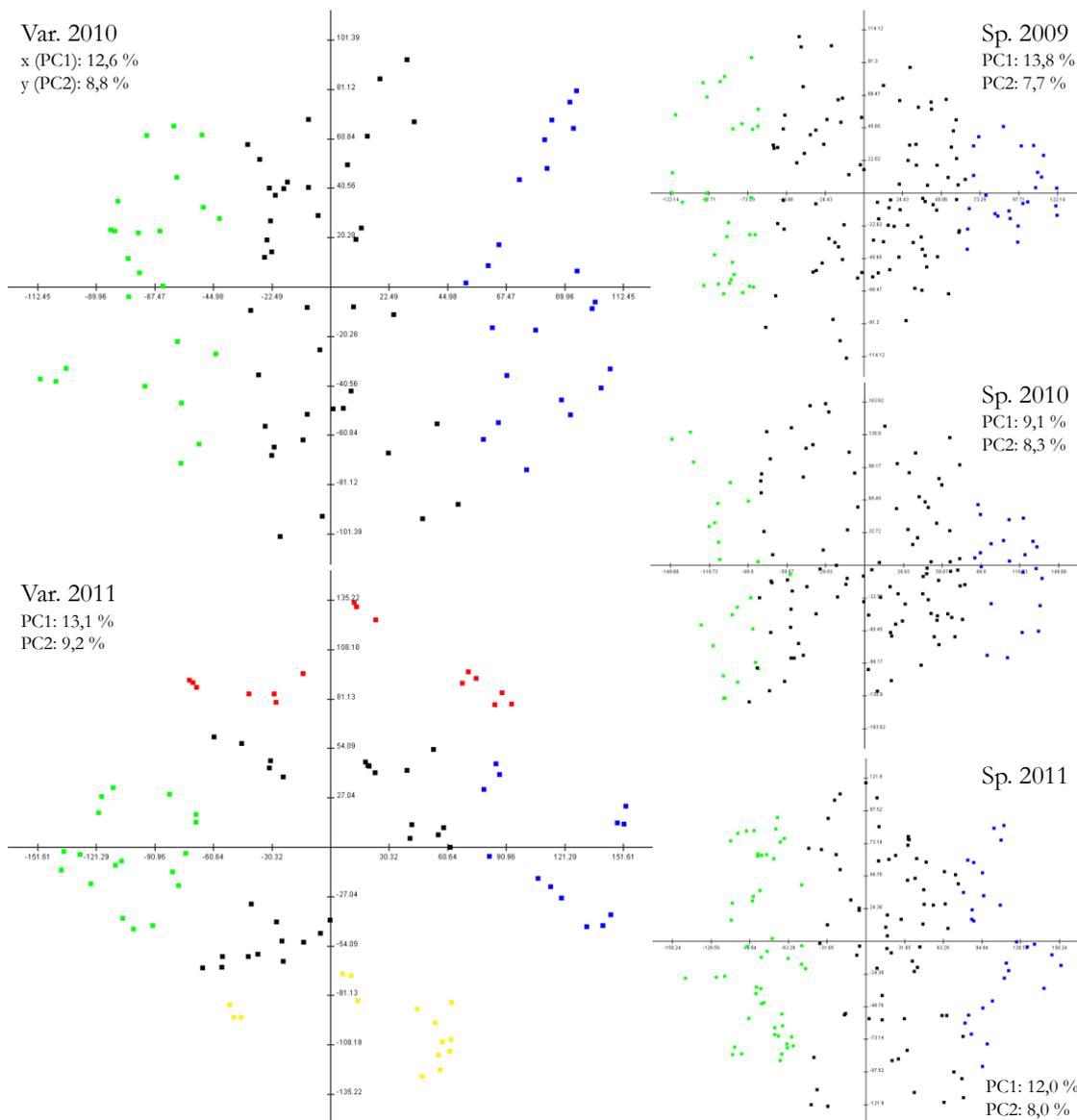


Abb. 42: PCAs aus positiven MS¹-Daten der französischen Sortenkollektionen 2010 und 2011 (**Var.**) und Segregationspopulationen 2009, 2010 und 2011 (**Sp.**). Farbige markiert sind die Gruppen, die jeweils miteinander verglichen wurden (grün, blau: t-Test; grün, blau, rot, gelb: ANOVA). **PC** Hauptkomponenten.

Daher wurde für jeden Jahrgang einzeln eine PCA durchgeführt und anschließend jeweils die beiden am weitesten voneinander entfernten Gruppen der PCA mittels t-Test (bzw. ANOVA bei mehr als zwei Gruppen) miteinander verglichen, um herauszufinden, welche Metabolite für die Charakterisierung der Proben verantwortlich waren (**Abb. 42**).

Die Hauptkomponenten lagen mit durchschnittlich 11,6 % und 8,0 % bei der Segregationspopulation sehr niedrig, was die Ähnlichkeit der einzelnen Individuen erwartungsgemäß zum Ausdruck brachte. Doch auch die mittleren Werte der Sortenkollektion lagen mit 12,9 % und 9,0 % nicht entscheidend höher. Die nahe Lage der Dreifachbestimmungen zueinander zeigte, dass die Analysen dennoch sensitiv genug waren, um zwischen den Proben zu unterscheiden. Um eindeutige und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, wurden für die anschließenden statistischen Vergleiche mittels t-Test nur die beiden am weitesten voneinander entfernten Gruppen herangezogen (in **Abb. 42** farblich markiert). Die Ausgabe des Tests erfolgte in einer hierarchisch gegliederten *Heat Map*, um Zusammenhänge zwischen den Proben aufzuzeigen. Beispielhaft ist in **Abb. 43** die *Heat Map* der französischen Varietätenkollektion von 2010 aufgeführt.

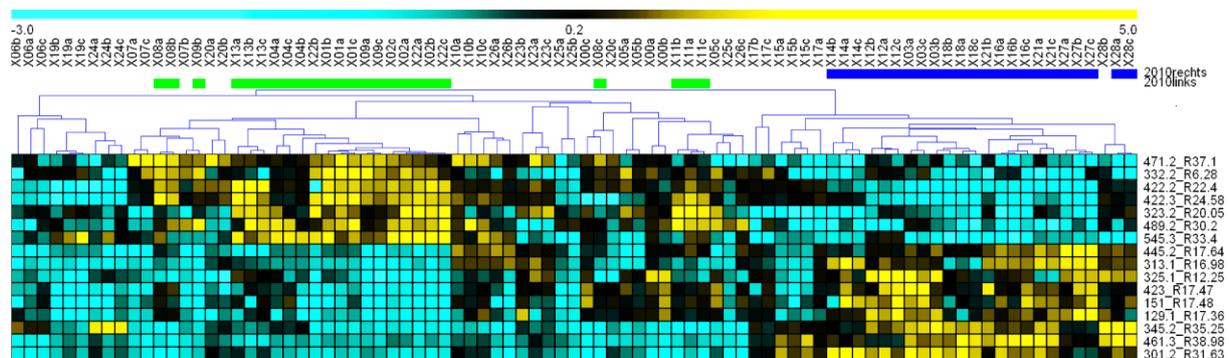


Abb. 43: *Heat Map* der französischen Varietätenkollektion von 2010 nach t-Test ($p < 0,0001$). **Senkrecht:** Proben. **Waagrecht:** Metabolite, mit m/z -Wert (positiver Modus) und Retentionszeit (**R**). Proben, die in **Abb. 42** zu einer der beiden gegensätzlichen Gruppen der PCA zugeordnet waren, sind **grün** (2010 links) bzw. **blau** (2010 rechts) unterstrichen. Als Näherungswert für den Gehalt eines Metaboliten, gibt die Farbskala an, ob die Peakfläche des jeweiligen Metaboliten in der jeweiligen Probe größer (gelb) oder kleiner (türkis) als der Mittelwert aller Proben ist.

Die hierarchische Gliederung der Proben in der *Heat Map* folgte der Gruppenbildung in der PCA. Blau unterstrichene Proben befanden sich am rechten Rand der PCA (**Abb. 42**), grün unterstrichene am linken. Ebenso ersichtlich waren die Metabolite, die durch ihre unterschiedlichen Gehalte für die Separierung der Proben verantwortlich waren. Auf diese Weise konnten alle Metabolite, die zu einer Differenzierung der Proben anhand des Genotyps und somit zur biologischen Variation beitragen, ermittelt werden.

Anschließend wurden die Metabolite, die in mindestens zwei der fünf Analysen (Var. 2010 und 2011; Sp. 2009, 2010 und 2011) vorkamen, zusammengetragen. Die gleiche Vorgehensweise wurde mit den Daten aus dem negativen Ionisationsmodus der LC-MS wiederholt. Neben vielen unbekanntem Verbindungen traten nahezu alle strukturell identifizierten Metabolite auf (**Tab. 20**).

Tab. 20: Bekannte Metabolite, die zur Differenzierung der Proben anhand ihres Genotyps (**Sp.** Segregationspopulation bzw. **Var.** Varietätenkollektion) beitragen, und ihr Vorkommen in den jeweiligen Jahrgängen.

Substanz	Sp.	Var.
(Epi)Afzelechin-(epi)catechin Dimere	2009	2011
(Epi)Afzelechin-pelargonidin-glucosid	2010	2011
Ascorbinsäure		2010, 2011
Catechin	2009, 2011	2011
<i>p</i> -Cumarsäure-glucoseester/-glucosid	2010	2010, 2011
Cyanidin-glucosid	2009, 2011	
DMHF-glucosid	2009, 2010, 2011	2010, 2011
(Epi)Catechin-(epi)catechin Dimere	2009, 2011	
Kaempferol-cumaroyl-glucosid		2010, 2011
Kaempferol-glucuronid	2009, 2010, 2011	
Kaffeensäure-glucoseester	2009, 2010	2010
Pelargonidin-glucosid	2010	2010
Pelargonidin-rutinosid	2010, 2011	2011
Quercetin-glucuronid	2009, 2011	
Zimtsäure-glucoseester	2009, 2010, 2011	2010, 2011
Zitronensäure		2010, 2011

Je öfter ein Metabolit bei den statistischen Untersuchungen auftauchte, desto entscheidender schien er zur Charakterisierung der Proben beizutragen. Unbekannte Metabolite wurden ebenfalls zu einer Liste zusammengetragen (**Tab. 21**).

Tab. 21: Unbekannte Metabolite, die zur Differenzierung der Proben anhand ihres Genotyps beitragen und ihr Vorkommen in den jeweiligen Jahrgängen (**09** = 2009; **10** = 2010; **11** = 2011) der Segregationspopulation (**Sp.**) und der Varietätenkollektion (**Var.**). Ergab ein Metabolit mehrere Signale (z.B. $[M+H]^+$ und $[M+Na]^+$), wurden diese unter der gleichen Nummer zusammengefasst. t_R Retentionszeit, **P** Polarität des MS-Modus, I_{Senga} Peakintensität der jeweiligen Ionenspur in *F. × ananassa* cv. Senga Sengana.

Nr.	t_R	P	m/z	MS^2	Sp.	Var.	I_{Senga}
1	09,9	+	171	157, 115	09, 10		10^5
2	10,9	+	268	136	09, 11	10	10^7
3	12,2	+	325	199	11	10, 11	10^6
4	12,9	-	147	145, 129, 115	09, 11	11	10^5
5	17,6	+	445	317, 417, 185	10, 11	10, 11	10^6
6	18,4	+	438	359, 329	11	11	10^5
7	20,5	-	633	301, 463		10, 11	10^6
8	21,4	-	589	299 (-> 137)	09, 11		10^5
9	21,4	+	323	185, 203, 161	09, 11	10, 11	10^7
10	21,6	+	317	203, 185, 155	10	10, 11	10^5
11	22,3	+	422	331, 207, 313, 287, 161, 189	09, 11	10, 11	10^7
12	22,5	-	373	175 (-> 115, 157)	09, 11	11	--
	22,6	-	175	115, 157, 129	09, 11	11	10^5
	22,6	+	199	137	09, 11	11	10^5
13	23,3	+	143	111, 129	09, 10, 11		10^5
14	24,0	-	417	417, 241, 285, 153	09, 11		10^6
15	24,1	+	422	331, 207, 313	09	10	10^6
16	26,6	-	157	113	09, 11		--
17	27,6	+	299	185		10, 11	10^{5-6}
18	27,6	-	461	415	11	11	10^6
19	28,2	-	433	271		10, 11	-
	28,3	+	473	455, 311, 185	11	10, 11	10^{5-6}
20	29,0	+	439	307	09, 11	11	10^6
21	29,7	-	287	165, 201, 243	10	10, 11	10^5
22	30,3	+	465	317	09, 10, 11	11	10^7
23	30,3	-	477	329, 441	11	10	-
24*	30,3	-	455	409, 293, 339		09	--
25	30,5	-	487	441, 293, 339	09, 11	10	10^6
	30,6	+	489	327	11	10, 11	10^7
26	30,8	+	377	317, 185, 155, 133, 245	09, 10		--

Nr.	t _R	P	m/z	MS ²	Sp.	Var.	I _{Senga}
27	31,1	+	475	271	10	10, 11	10 ⁵
28	31,2	+	501	339	09,10	11	10 ⁶
29	31,6	-	313	244, 197, 266		10,11	10 ⁵
30	31,6	-	323	207, 277, 161		10,11	10 ⁵
31	31,7	+	301	579 (-> 301 -> 185)	09,10	10,11	10 ⁶
32	33,0	+	345	203, 183, 143	09	10,11	--
33	33,4	+	545	545		10,11	--
34	33,7	-	357	195, 237	09	10	10 ⁵⁻⁶
	33,9	-	393	357, 195, 325	09	10,11	10 ⁵
35	34,0	-	287	259, 243, 269	10	10,11	10 ⁵
36	34,3	-	447	301, 285	09,11	10	10 ⁶
	34,6	-	483	285, 447	09	10,11	10 ⁶
37	35,2	-	321	179, 161, 119		10,11	10 ⁵
38	35,7	-	407	371, 209		10,11	10 ⁶
	35,8	-	371	209		10,11	10 ⁶
39	37,1	-	371	251, 209		10,11	10 ⁶
40	37,1	+	471	309, 185	11	10	10 ⁶
41	38,3	+	513	227, 309	09,10,11		10 ⁶
	38,4	-	489	285	10	10,11	10 ⁶
42	38,5	+	574	335	10,11		10 ⁶
43	39,4	-	385	223, 265, 295	09,11	11	10 ⁶
44	39,9	-	695	487, 649	10,11		--
45*	40,2	-	483	437, 293, 339		09	--
46	41,4	-	561	515, 383		10,11	--

* aus spanischer Varietätenkollektion von 2009

Die Peakintensität der jeweiligen Ionenspur wurde als Näherungswert für den Gehalt angegeben, um für etwaige Isolierungsversuche eine Vorstellung der benötigten Einwaage zu bekommen. Da zur Zeit der vorliegenden Arbeit die Sorte Senga Sengana sehr gut verfügbar war, wurde sie als Referenz eingesetzt. Ausgehend von einer Einwaage um 1 kg frischen Fruchthomogenats gelten erfahrungsgemäß Peakintensitäten ab 10⁶ im negativen bzw. 10⁷ im positiven Modus als ausreichend für eine Isolierung, eine aktuelle und korrekte Kalibrierung des Massenspektrometers vorausgesetzt. Mit Ausnahme von Pelargonidin-3-glucosid (10⁸ für die Ionenspur m/z 433 im positiven Modus) ist dies auch der Bereich der bekannten Metaboliten. Verbindungen, deren Intensitäten unterhalb dieser Werte lagen, wurden dennoch aufgelistet, da deren Gehalte in

verschiedenen Sorten stark variierten und somit bei einem Wechsel der verfügbaren Sorte neu bewertet werden müssen. So trat bspw. Metabolit 46 in den Sorten Elsanta, welche oft als Versuchspflanze Verwendung findet, und Capitola in sehr hohen Gehalten auf, während er in Senga Sengana nicht detektierbar war.

Anhand einer Durchsichtung der Leerläufe wurde sichergestellt, dass die unbekanntenen Verbindungen tatsächlich Inhaltsstoffe der Erdbeerfrüchte darstellen. Unter Berücksichtigung möglicher Addukte konnten anhand einer Literaturrecherche für manche Substanzen Anhaltspunkte zur Identifizierung gefunden werden (s. **4.1.3.1**, S. 124).

Isoliert und mittels NMR identifiziert wurden die Metabolite 38 und 39. Sie entsprechen zwei konstitutionsisomeren Phloroglucinyll-glycosiden mit unterschiedlichen Acyl-Seitenketten. Metabolit 38 steht für 2-(3'-Methylbutanoyl)-phloroglucinyll-1- β -D-glucopyranosid, Metabolit 39 für 2-(2'-Methylbutanoyl)-phloroglucinyll-1- β -D-glucopyranosid (s. **3.10**).

3.10. Identifizierung eines unbekanntenen Metaboliten mittels $^1\text{H-NMR}$

Der bioinformatischen Auswertung zufolge war der unbekanntene Metabolit mit $-\text{MS}^1 m/z$ 371 und einer Retentionszeit von 35,8 min maßgeblich an der Charakterisierung verschiedener Erdbeersorten beteiligt. Nach der Aufreinigung mittels LC- MS^n und HPLC/UV (s. **2.3.1.5**, S. 41) wurde ein $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum aufgenommen (s. Anhang **Abb. 58**). Für ^{13}C - oder zweidimensionale (COSY, HSQC, HMBC) Experimente war die isolierte Menge nicht ausreichend. Durch Zuhilfenahme der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von 2-(3'-Methylbutanoyl)-phloroglucinyll-1- β -D-glucopyranosid (**Abb. 44**) aus Tsukamoto *et al.* (2004) und Bohr *et al.* (2005) konnten alle Signale zugewiesen werden, wenn auch die schwache Intensität und Verunreinigungen die Aufklärung erschwerten.

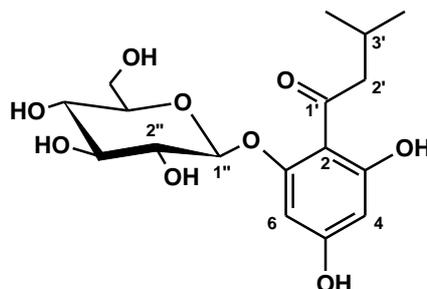


Abb. 44: Struktur von 2-(3'-Methylbutanoyl)-phloroglucinyll-1- β -D-glucopyranosid.

Trotz mehrfacher Trocknung am Rotationsvakuumkonzentrator und im Lyophilisator, ist als intensivstes ^1H -Signal Wasser (δ 4,8 ppm, s) zu erkennen, welches mit 0,1 % Ameisensäure

(δ 8,6 ppm, s) versetzt als Fließmittel zur LC-MSⁿ eingesetzt wurde. Restprotonensignale des deuterierten Lösungsmittels Methanol-d₄ (δ 4,7 ppm, s und δ 3,3 ppm, quint) sind ebenfalls vorhanden. Die Signale der isolierten Verbindung sind in **Tab. 22** zusammengefasst.

Tab. 22: ¹H-NMR-Signale des unbekanntes Metaboliten mit -MS¹ *m/z* 371 in Methanol-d₄.

C-Atom	Verschiebung δ [ppm]	Aufspaltung	Intensität	Literatur (δ , m, Int.)*
4	6,2	d	1	6,2 d 1H
6	6,0	d	1	5,9 d 1H
2'	3,1	2x d	1; 1	2,9 dd 1H; 3,2 dd 1H
3'	1,8	sept	1	2,2 sept 1H
4' u. 5'	0,9	dd	6	0,9 d 3H; 1,0 d 3H
1''	5,0	d	1	5,0 d 1H
2''-6''	3,5-4,0	m	-	3,4-3,9 m --

* Tsukamoto *et al.* (2004), Bohr *et al.* (2005)

Die beiden Dupletts bei 6 ppm lassen sich direkt den aromatischen Protonen an C4 und C6 zuordnen. Ebenso stimmt das Septett des Protons an C3' bei etwa 2 ppm mit den Literaturdaten überein. Erwartungsgemäß sollten die beiden diastereotopen H-Atome an C2' aufgrund der Kopplung untereinander und mit dem benachbarten singulären Proton an C3' jeweils ein Duplett vom Duplett zeigen. Dass im vorliegenden Spektrum nur die zwei Dupletts der Kopplung zum benachbarten H-Atom sichtbar sind, könnte an mangelnder Auflösung liegen. Die beiden Dupletts überlagern sich ohnehin beinahe, so dass die weitere Duplett-Aufspaltung aufgrund der breiten Signale nicht erkennbar ist. Die Verschiebung von 3,1 ppm stimmt mit den Daten von Tsukamoto *et al.* (2004) und Bohr *et al.* (2005) überein. Die beiden endständigen CH₃-Gruppen (C4' und 5') zeigen jeweils ein Duplett bei einer Verschiebung von 0,9 ppm. Da sich die Signale überlagern, erscheint ein Duplett vom Duplett. Das Proton am anomeren C-Atom (C1'') zeigt eine Verschiebung von 5,0 ppm. Die restlichen Protonen des Zuckergerüsts können nicht näher zugewiesen werden.

Das ¹H-NMR-Spektrum weist auf das Vorhandensein eines weiteren Glykosids hin. Neben der starken Ausprägung des Multipletts der Zuckerprotonen zwischen 3,5 und 4 ppm erscheint ein weiteres Duplett bei 5,1 ppm, welches typischerweise von ¹H-Kernen anomerer C-Atome gebildet wird. Zudem ist dieses Signal intensiver als das des Metaboliten mit -MS¹ *m/z* 371 und könnte daher auch die höhere Intensität der Zuckerprotonen erklären.

Die Identifizierung des zweiten Konstitutionsisomers mit $-MS^1 m/z 371$ und einer Retentionszeit von 37,1 min wurde von Chuankui Song (TU München) durchgeführt. Das 1H -NMR-Spektrum unterschied sich lediglich durch die Signale der Acylseitenkette (**Abb. 45**).

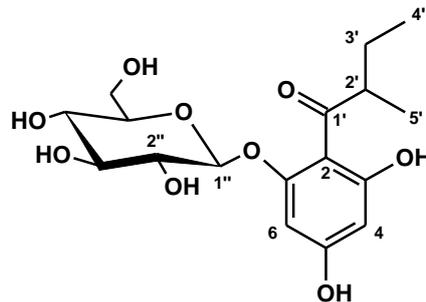


Abb. 45: Struktur von 2-(2'-Methylbutanoyl)-phloroglucinyl-1-β-D-glucopyranosid.

3.11. 2D-Gelelektrophorese

Vier Individuen der französischen F1-Segregationspopulation Capitola × CF1116 wurden mittels 2D-Gelelektrophorese analysiert: #64 mit einer geringen relativen Konzentration an Anthocyanen und dementsprechend niedrigem Gesamtpolyphenolgehalt und #7, 111 und 187 mit hohen Gehalten an Anthocyanen und Gesamtpolyphenolen. Während die Genotypen #64 und 111 größere Mengen an Phenylpropanoiden, insbesondere an Zimtsäureglucoseester, akkumulierten, wiesen #7 und 187 hier nur geringe Gehalte auf. #7 zeigte indes durchweg hohe Gehalte an flavonoiden Komponenten und zusammen mit #64 die höchsten relativen Konzentrationen an Ellagsäure. Hinsichtlich DMHF-glucosid produzierten alle vier Genotypen nur relativ geringe Mengen im Vergleich zur restlichen Population (s. Anhang **Tab. 26**).

Mittels 2D-Gelelektrophorese wurden pro Genotyp drei Replikate erstellt. Da bei der dritten Bestimmung aber Probleme mit der ersten Dimension auftauchten, die zu unscharfen Spots und einer schlechteren Auftrennung führten, wurden nur zwei Gele pro Genotyp zur Software gestützten Auswertung herangezogen. Die beiden Replikate des jeweiligen Individuums wurden gemittelt und anschließend mit den gemittelten Gelen der anderen Individuen verglichen. Pro Gel wurden etwa 110 Spots erfasst, die zum Vergleich herangezogen werden konnten.

Da eine unterschiedliche Spotintensität in allen vier Proben erwartungsgemäß auftritt, war es nicht das Ziel der Auswertung, die Proben pro Spot nach ihrer Intensität zu ordnen, sondern gezielt Muster zu erkennen, in denen sich die vier Proben wie zwei 2er-Gruppen verhalten oder eine Probe vom Verhalten der anderen drei abweicht. Aufgrund dieser zielgerichteten Analyse wurden sieben Spots ausgeschnitten und vom Proteomics-Servicezentrum der Universität

Córdoba (servicio central de apoyo a la investigación, unidad de proteómica, Universidad de Córdoba) sequenziert (**Abb. 46**).

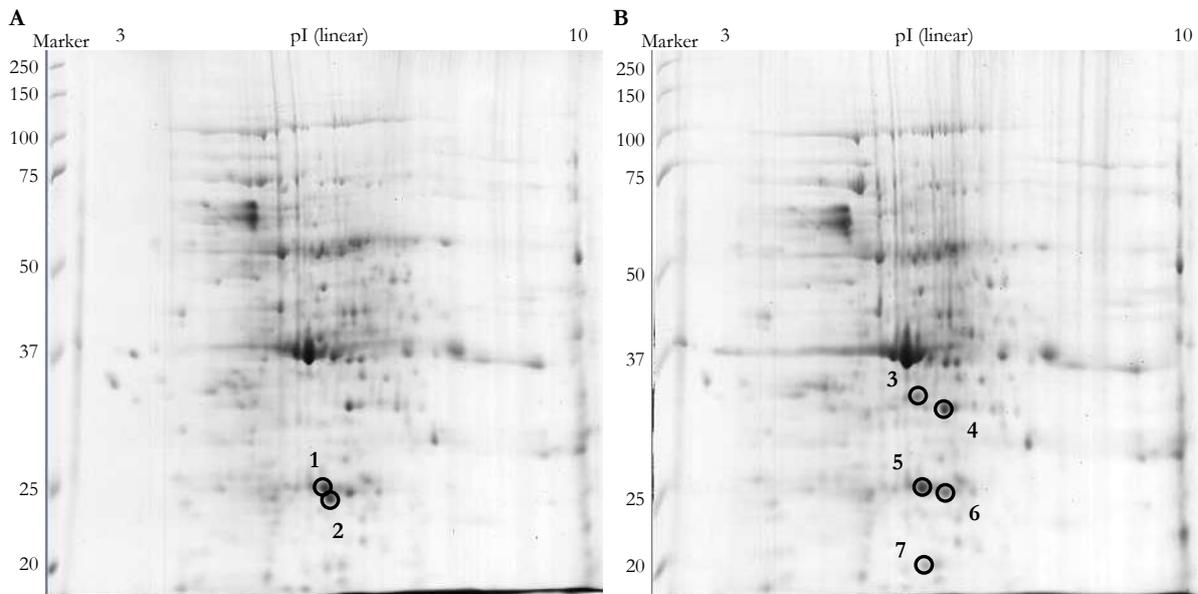


Abb. 46: Densitometrische Scans der 2D-Gele der Individuen #64 (**A**) und #187 (**B**) der Segregationspopulation Capitola × CF1116 aus dem Jahr 2009. Markiert und mit laufenden Nummern versehen sind die zur Sequenzanalyse ausgewählten Spots.

Zur Identifizierung der Proteine wurden die sequenzierten Peptidfragmente mit der Transkriptdatenbank von *F. × ananassa* (s. **2.3.2.23**, S. 60) und der Genomdatenbank von *F. vesca* (Shulaev *et al.*, 2011) abgeglichen (**Tab. 23**). Da Molekulargewichte und isoelektrische Punkte anhand der hinterlegten Sequenz berechnet werden, können fehlerhafte Annotationen, wie bereits für *FaPRX27* gezeigt (s. **3.7.2**, S. 96), dazu führen, dass die Werte nicht mit den Beobachtungen auf den 2D-Gelen übereinstimmen.

Spot 2 fiel direkt auf, da er in allen Replikaten der phenylpropanoid-reicheren Genotypen #64 und 111 enthalten war, jedoch in keinem der Gele von #7 und 187. Die Sequenzierung ergab eine hohe Übereinstimmung mit einem putativen Abscisinsäure-Stress Reifeprotein 2.

Die Intensitäten der Spots 1 und 5 ergaben keine entscheidenden Schwankungen zwischen den einzelnen Proben, sie wurden aufgrund ihrer Nähe zu Spot 2 ausgewählt und dienten als Kontrolle für eine funktionierende Auftrennung der Spots auf den 2D-Gelen. Anhand der übereinstimmenden Identifizierungen der Spots 1 und 5 konnte eine mögliche Überlagerung des putativen Abscisinsäure-Stress-Reifeproteins 2 in den Genotypen #7 und 187 ausgeschlossen werden.

Spot 3, eine putative NAD(P)H-abhängige 6'-Deoxychalkon-Synthase, konnte nur in den phenylpropanoid-ärmeren Genotypen #7 und 187 nachgewiesen werden.

Tab. 23: Putative Identifizierungen der ausgewählten Proteinspots. **MG** Molekulargewicht, **pI** Isoelektrischer Punkt, **C.I.** Konfidenz Intervall. Der Protein Score C.I. gibt die Wahrscheinlichkeit einer korrekten Zuweisung in [%] an.

Spot	Protein	MG [kDa]	pI	Annotation	Protein Score C.I. [%]
1/5	Peroxisomale L-Ascorbat Peroxidase 3 (AtAPx03) (ähnlich)	39,9	6,8	gene07647	100
2	Abscisinsäure-Stress-Reifeprotein (ASR) 2 (ähnlich)	21,0	6,0	gene08120	100
3	NAD(P)H-abhängige 6'-Deoxychalkon-Synthase (putativ)	36,3	5,9	gene22147	100
4	Isoflavon-Reduktase Homolog P3 (putativ)	33,6	6,0	gene15165	100
6	Cytosolische Triosephosphat-Isomerase (ähnlich)	35,3	9,3	gene26597	100
7	Glycin-reiches Protein 2 (ähnlich)	27,7	8,7	gene07618	99,999

Spot 4 entspricht einer putativen Isoflavon-Reduktase und erschien auf den Gelen von #7, 64 und 187 relativ intensiv ausgeprägt, wohingegen er auf keinem der drei Replikate von #111 enthalten war.

Hinsichtlich der Spotintensität variierte Spot 6 kaum zwischen den untersuchten Proben. Er wurde als putative cytosolische Triosephosphat-Isomerase (TPI) identifiziert. Drei der ersten zehn Hits des Datenbankabgleichs von Spot 6 erschienen ebenfalls bei der Zuweisung von Spot 2: gene26597 (TPI), gene05893 (Vakuolenprotein 8) und gene24663 (Hypothetisches Protein). Aufgrund der benachbarten Position der beiden Spots ist eine Verunreinigung bei der Analyse von Spot 2 möglich. Da Spot 2 auf dem Gel, aus dem Spot 6 ausgeschnitten wurde, nicht vorhanden war, entstand diese einseitige Überschneidung.

Spot 7 war v.a. in den Gelen von #187 ausgeprägt und wurde putativ als Glycin-reiches Protein 2 identifiziert.

4. Diskussion

4.1. *Metabolite Profiling*

4.1.1. Konkurrenz um Substrate bei der Bildung von Sekundärmetaboliten

Da die wissenschaftlichen Belege für die gesundheitsfördernde Wirkung einer polyphenolreichen Ernährung stetig zunehmen, wächst auch die Notwendigkeit nach dem Verständnis über die Akkumulation dieser Substanzen in unseren Nahrungsmitteln. Um Regulationsmechanismen und genetische Kontrolle der Polyphenolbiosynthese zu untersuchen, wurden die Daten aus Metabolit-, Transkriptions- und QTL-Analysen verschiedener Sorten und Kreuzungspopulationen der Kulturerdbeere *Fragaria × ananassa* in Korrelation gesetzt, um die Ausprägung bestimmter Merkmale mit genomischen Regionen in Verbindung bringen zu können.

Die relativen Konzentrationen strukturell identifizierter Metabolite wurden mittels LC-MSⁿ bestimmt und zu einem „Gesamtpolyphenolgehalt“ aufsummiert. Zwischen den verschiedenen Genotypen variierten die Gesamtpolyphenolgehalte durchschnittlich um einen Faktor von 2,5. Weitaus größere Differenzen (Faktor 4 – 35) ergaben sich für die Phenylpropane und speziell für einzelne Komponenten, wie z.B. Pelargonidin-3-O-(6"-malonyl)-glucosid, welches in einigen Individuen relative Konzentration über 10 mg equ./g TM aufwies, jedoch in mehr als der Hälfte aller Proben unterhalb der Nachweisgrenze (0,05 mg equ./g TM) lag (s. **Abb. 9** und **Abb. 10**, S. 64ff). Folglich könnte eine Modifizierung der Gehalte einzelner Substanzen durch Züchtung einfacher realisiert werden als eine Beeinflussung des Gesamtpolyphenolgehalts. Dies zeigte sich auch daran, dass nur wenige Individuen konsequent hohe bzw. niedrige Gehalte an allen untersuchten Metaboliten aufwiesen, sondern die meisten Genotypen Präferenzen für die Akkumulation bestimmter Komponenten erkennen ließen, z.B. Flavonole und Flavanole (hier als Flavonoide bezeichnet) anreicherten, dafür jedoch weniger Anthocyane produzierten. Ebenso ergab sich eine gegensätzliche Korrelation zwischen den Gehalten an Aromakomponenten, wie DMHF, und Gesamtpolyphenolen (s. **3.2**, **3.3**, S. 75ff und **Tab. 15**, S. 73). Demzufolge scheint eine Verteilung der Ressourcen zwischen verschiedenen Biosynthesewegen für die Pflanze einfacher umzusetzen zu sein als eine Erhöhung der gesamten Biomasse.

Eine Umlenkung des Substratflusses von der Ligninbiosynthese hin zur Produktion von Polysacchariden konnte in Espen (*Populus tremuloides*) durch die Herabregulation der 4-Cumarsäure-CoA-Ligase erreicht werden, was in einer Abnahme der Ligninkonzentration um

45 % und einer gleichzeitigen Zunahme des Cellulosegehalts um 15 % resultierte (Hu *et al.*, 1999). Eine Verstärkung des Effektes zu einer Reduktion der Ligninkonzentration um 52 % und einem Zuwachs des Cellulosegehalts um 30 % konnte durch zusätzliche Herabregulation der Coniferaldehyd-5-Hydroxylase erzielt werden (Li *et al.*, 2003). Die Herabregulation der Zimtsäure-CoA-Reduktase in Tabak (*Nicotiana tabacum*) führte zu einer Abnahme des Ligningehalts und einer simultanen Zunahme an Zellwand-assoziiertes Xylose und Glucose (Chabannes *et al.*, 2001). Auf ähnliche Weise sollte eine Umlenkung verschiedener Kohlenstoffressourcen zur Bildung von löslichen Polyphenolen in Erdbeerfrüchten realisiert werden können (Grießer *et al.*, 2008a). Zu beachten ist jedoch, dass Qualitätskriterien der Früchte, wie Aroma, Geschmack und Festigkeit, sowie Schutzmechanismen gegenüber Pathogen- und Insektenbefall, durch eine Manipulation der Biosynthesewege nicht beeinträchtigt werden dürfen.

4.1.2. Polyphenolbiosynthese wird entscheidend durch Genotyp beeinflusst

Trotz der genetischen Ähnlichkeit innerhalb der Kreuzungspopulation herrschte zwischen den Nachkommen hinsichtlich der Polyphenolbiosynthese eine ähnlich große Varianz wie zwischen verschiedenen Sorten. Während die Summe aller quantifizierten Polyphenole lediglich um Faktor 2,5 schwankte, zeigten sich bei einzelnen Komponenten Unterschiede um das 5- bis 10-fache. Pelargonidin-malonylglucosid konnte nur in 50 % der Nachkommen detektiert werden (**Abb. 10**, S. 67).

Die Variation des Gesamtpolyphenolgehalts um Faktor 2,5 innerhalb eines Jahrgangs veranschaulicht insbesondere den Beitrag des einzelnen Genotyps, da man von annähernd gleichen Umweltbedingungen für alle Individuen ausgehen kann, abgesehen von der exakten Position der jeweiligen Pflanze (z.B. am Rand oder in der Mitte der Anbaufläche). Die schwankenden Gesamtpolyphenolgehalte eines jeden Genotyps in den verschiedenen Jahrgängen spiegeln hingegen hauptsächlich den Einfluss äußerer Faktoren wider. Hierfür ergab sich sowohl für die Sortenkollektion, als auch für die Nachkommen der Segregationspopulation ein durchschnittlicher Faktor von lediglich 1,2 (**Tab. 13**, S. 70), wodurch die Bedeutung der genetischen Grundlage für die Polyphenolproduktion gestärkt wurde.

Zum weiterführenden Vergleich der verschiedenen Jahrgänge der Kreuzungspopulation wurden Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman berechnet. Für den Gesamtpolyphenolgehalt ergab sich mit etwa 60 % ($p < 0,001$) eine signifikante, jedoch nicht komplette Korrelation. Einzelne Komponenten zeigten weitaus geringere Werte. Zusätzlich zu den Individuen, die dreijährig konstant höhere bzw. konstant niedrigere Gehalte als andere Nachkommen bildeten, erschienen

andere Genotypen mit schwankender Polyphenolproduktion. Gleiches galt für den Vergleich der zweijährigen Sortenkollektion ($r_s = 55\%$, $p < 0,01$). Im Durchschnitt verhielt sich demnach die Mehrheit der Individuen in den verschiedenen Jahrgängen ähnlich. Dennoch scheinen abgesehen von dem genetischen Hintergrund äußere Faktoren die Produktion von Polyphenolen zu beeinflussen.

Neben verschiedenen Anbaubedingungen übte insbesondere der Erntezeitpunkt zwischen Mai und November den größten Einfluss auf die antioxidative Kapazität verschiedener Erdbeerfrüchte des gleichen Reifestadiums aus, was auf eine zentrale Rolle von Lichtintensität und Temperatur hindeuten ließ (Pincemail *et al.*, 2012). Weitere äußere Faktoren stellen die Nährstoffversorgung, der Wasserhaushalt, etwaiger mikrobieller Befall, sowie die Bedingungen nach der Ernte, wie die Atmosphäre bei Transport und Lagerung dar. Letztlich stehen Studien noch aus, in denen eine große Anzahl an Genotypen gezielt unter verschiedenen Umweltbedingungen kultiviert wurde.

Zahlreiche Untersuchungen bekräftigen jedoch den entscheidenden Einfluss des Genotyps auf die Produktion von Polyphenolen (Hernanz *et al.*, 2007; Rekika *et al.*; 2005; Tulipani *et al.*, 2008; Capocasa *et al.*, 2008; Crespo *et al.*, 2010). Letztlich verdeutlicht dies die Möglichkeit, durch gezielte Züchtung erhöhte Gehalte an gesundheitsfördernden Inhaltsstoffen erzielen zu können.

4.1.3. Bioinformatische Auswertung (*untargeted analysis*)

4.1.3.1. Kandidatenmetabolite für biologische Variation

Da mit den gezielten Metabolitanalysen nur ca. 20 strukturell identifizierte Verbindungen erfasst werden konnten, wurde zusätzlich ein nicht-zielgerichteter Ansatz (*untargeted analysis*) verfolgt. Dabei konnten die Proben der Sortenkollektionen und die Nachkommen der Segregationspopulationen anhand von 200 – 400 Komponenten verglichen werden. Abzüglich der bekannten Verbindungen ergab sich daraus eine Liste von 46 unbekanntem Metaboliten (inkl. Retentionszeit, MS¹- und MS²-Daten), die entscheidend zur biologischen Variation beitrugen (**Tab. 21**, S. 115).

Zwei Substanzen konnten bereits mittels Fraktionierung aufgereinigt und via NMR als die beiden Konstitutionsisomere 2-(3'-Methylbutanoyl)-phloroglucinyll-1-β-D-glucopyranosid (Verbindung 1; **Abb. 44**, S. 117) und 2-(2'-Methylbutanoyl)-phloroglucinyll-1-β-D-glucopyranosid (Verbindung 2; **Abb. 45**, S. 119) identifiziert werden. Beide Substanzen wurden bereits in Hopfen (*Humulus lupulus*) dokumentiert (Bohr *et al.*, 2005), Verbindung 1 zusätzlich in *F. × ananassa* (Tsukamoto *et*

al., 2004). Verbindung 2 konnte somit zum ersten Mal in Erdbeeren nachgewiesen werden. Während die Polymerisationsprodukte der Phloroglucinole, die Phlorotannine, fast ausschließlich in marinen Organismen, wie in der Klasse der Braunalgen (Phaeophyceae), gefunden werden, kommen Phloroglucinole in vielen Pflanzen vor (Quideau *et al.*, 2011; Salminen und Karonen, 2011). Das Grundgerüst der Phloroglucinole geht ähnlich wie das der Flavonoide aus drei Molekülen Malonyl-CoA hervor, wobei je nach Seitenkette noch verschiedene aliphatische CoA-Ester eingesetzt werden (Dao *et al.*, 2011). Die Biosynthese geschieht unter Katalyse der Phlorisovalerophenon-Synthase (VPS), zu geringeren Teilen jedoch auch durch die Chalkon-Synthase (CHS) (Zuurbier *et al.*, 1998). Beide Enzyme gehören der Superfamilie der Polyketid-Synthasen an (Paniego *et al.*, 1999). In Hopfen stellen Phloroglucinole die Vorstufen der α - und β -Säuren Humulon und Lupulon dar, welche ein wichtiges Qualitätsmerkmal für die Bitterkeit von Bieren bedeuten (Zuurbier *et al.*, 1995). Die dafür erforderliche Prenylierungsreaktion des Aromaten, so wie sie auch zum gesundheitsfördernden Xanthohumol aus Naringenin-Chalkon führt (Stevens und Page, 2004), konnte in Erdbeeren bisher nicht gezeigt werden. Dennoch konnten mit Hilfe der CHS2 aus *F. × ananassa* die Aglyka der Verbindungen 1 und 2 aus den Substraten Isovaleryl-CoA und 2-Methylbutyryl-CoA *in vitro* gebildet werden (Song, unveröffentlichte Daten). Eine Funktion der Substanzen als Cytochrom-P450-Inhibitoren wird diskutiert (Tsukamoto *et al.*, 2004).

Für manche der 46 unbekanntes Verbindungen, die entscheidend zur Charakterisierung der verschiedenen Varietäten und Individuen der Kreuzungspopulationen beitrugen (Tab. 21, S. 115), ergaben sich aus anderen Veröffentlichungen bereits Anhaltspunkte für eine Identifizierung. So deckte sich das Fragmentierungsmuster von Metabolit 7 mit Literaturdaten von Hexahydroxydiphenoyl-galloyl-glucoseester (-MS¹ *m/z* 633; -MS² *m/z* 301, 463; Aaby *et al.*, 2007; Hanhineva *et al.*, 2009a), einem mit den beiden Carboxylgruppen der Hexahydroxydiphensäure und der Carboxylgruppe der Gallussäure dreifach veresterten Glucosemolekül. Metabolit 7 ist somit ein niedermolekularer Vertreter der Ellagtannine.

Für Verbindung 41 ergab sich ein korrespondierendes Massenspektrum zu Kaempferol-(6"-acetyl)-glucosid (-MS¹ *m/z* 489; -MS² *m/z* 285; Fait *et al.*, 2008). Neben Malon- und Cumarsäure dient Essigsäure häufig zur Derivatisierung der Glucoside. Zudem eluiert Metabolit 41 mit 38,4 min zu einer ähnlichen Retentionszeit wie die bekannten Kaempferol-glycoside auf dem vorliegenden System.

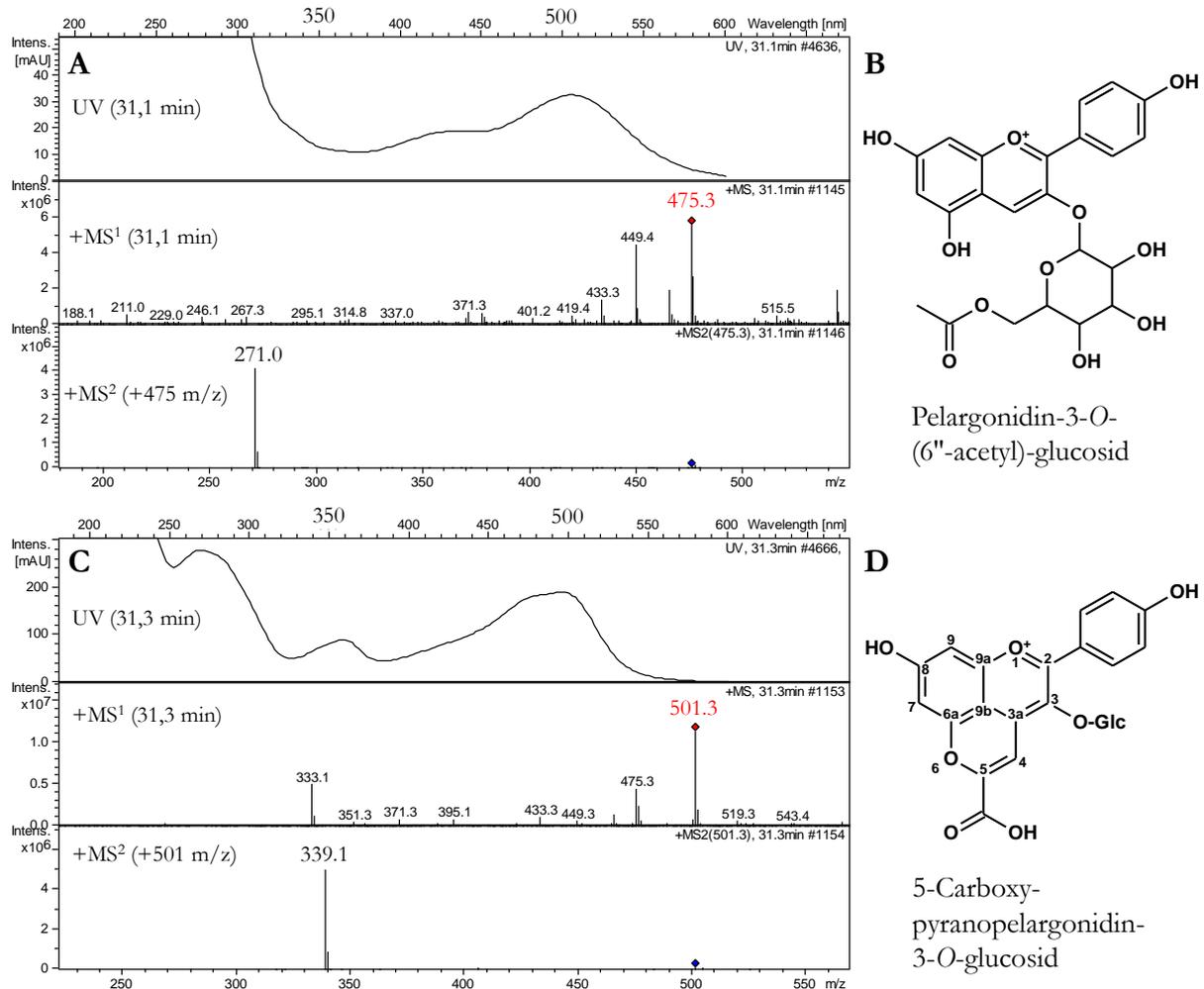


Abb. 47: Absorptionsmaxima, Massenspektren und vermutliche Strukturen der Metaboliten 27 (**A, B**) und 28 (**C, D**) aus dem DAD-LC-MSⁿ-Chromatogramm von Individuum #199 der Segregationspopulation von 2010. **Glc** Glucoserest.

Sowohl die MS-Daten als auch die Absorptionsmaxima der Metaboliten 27 und 28 (**Abb. 47**) stimmen mit den Literaturwerten von Pelargonidin-3-O-(6''-acetyl)-glucosid (+MS¹ m/z 475; +MS² m/z 271; Δ_{\max} : 504 nm; Lopes-da-Silva, 2002) und 5-Carboxy-pyranopelargonidin-3-O-glucosid (+MS¹ m/z 501; +MS² m/z 339; Δ_{\max} : 493, 358 nm) überein (Andersen *et al.*, 2004 (NMR); Aaby *et al.*, 2007; Kajdzanoska *et al.*, 2010). Das Strukturisomer des letzteren mit Malvidin als Anthocyanidinkomponente kommt unter dem Namen „Vitisin A“ in Wein vor. Pyranoanthocyane sind bei diversen pH-Werten stabiler als Anthocyane, weshalb sie von steigendem Interesse sind (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009).

Aufgrund der zeitgleichen Retention mit Zimtsäure-glucoseester könnten die Verbindungen 29, 30 und 31 Fragmente darstellen, die bei der Ionisation von Zimtsäure-glucoseester entstanden sind, da diese Substanz in Erdbeeren zu den Hauptphenolkomponenten zählt und daher in großen Mengen vorhanden ist.

Das Massenspektrum von Metabolit 36 ($-MS^1 m/z 447$; $-MS^2 m/z 301, 285$) deutet aufgrund der Fragmentierung zu $m/z 301$ (im negativen Modus) auf ein Quercetin-Derivat hin. Die neutrale Abspaltung von 146 wird von Deoxyhexosiden hervorgerufen, weshalb Metabolit 36 für Quercetin-rhamnosid stehen könnte. Auch die Retentionszeit von 34,3 min entspricht anderen Quercetin-glycosiden. In anderen *Metabolite-Profiling*-Studien an Erdbeerfrüchten wurde Quercetin-rhamnosid bisher nicht erwähnt (Hanhineva *et al.*, 2011). Aus Extrakten zwei verschiedener Eichen (*Quercus alba* und *Quercus robur*) konnte Quercetin-rhamnosid nachgewiesen werden (Mämmelä *et al.*, 2000), wobei das Tochterionenspektrum lediglich das Aglykon ($-MS^2 m/z 301$) aufwies. Ebenso konnten auf dem System der vorliegenden Arbeit bei der Fragmentierung anderer Quercetin-Derivate nur die Aglyka beobachtet werden. Das MS^2 -Spektrum von Metabolit 36 weist jedoch zusätzlich das Ion bei $m/z 285$ (im negativen Modus) auf, was ebenfalls das intensivste Ion im Tochterionenspektrum des Chloraddukts von Metabolit 36 ist. Metabolit 36 könnte demnach auch ein Kaempferol-Derivat sein.

Metabolit 19 zeigt im negativen Modus das gleiche Zerfallsspektrum wie Naringenin-glucosid ($-MS^1 m/z 433$; $-MS^2 m/z 271$), im positiven Modus jedoch anstelle des Natriumaddukts ein Kaliumaddukt. Da sich die Retentionszeiten der beiden Substanzen unterscheiden, wären Naringenin-glucosid Chalkon oder eine strukturell ähnliche Verbindung, wie Licodion-glucosid (**Abb. 54**, S. 141), mögliche Kandidaten für eine Identifizierung.

Die Metaboliten 24 und 45, die aus der bioinformatischen Auswertung der spanischen Sortenkollektion stammen, werden unter Kapitel **4.1.3.2** ab S. 128 genauer diskutiert.

Ein weitere unbekanntes Verbindung, die in der Literatur als Ferulasäure-hexosid-Derivat beschrieben war (Aaby *et al.*, 2007; Kajdzanoska *et al.*, 2010), konnte in der vorliegenden Arbeit anhand der authentischen Referenz als Pelargonidin-3-O-glucosid Chalkon (**Abb. 40**, **Abb. 41**, S. 109f), welches sich durch Wasseranlagerung in der Ionenquelle bildet, identifiziert werden.

Zusammenfassend konnten die Strukturen der beiden isomeren Phloroglucinyll-glucoside eindeutig mittels NMR aufgeklärt werden. Für die Verbindungen Hexahydroxydiphenoyl-galloyl-glucoseester, Kaempferol-(6"-acetyl)-glucosid, Pelargonidin-3-O-(6"-acetyl)-glucosid und 5-Carboxy-pyranopelargonidin-3-O-glucosid ergaben sich gute Übereinstimmungen mit Daten aus der Literatur, zumal sie ebenfalls aus Erdbeerfrüchten extrahiert, teilweise mittels NMR identifiziert und unter ähnlichen Chromatographiebedingungen untersucht wurden.

Die Strukturaufklärung unbekannter Metabolite ist für die Studien der Biosynthesewege essentiell, da sich anhand der Akkumulation einzelner Komponenten Zusammenhänge und Verknüpfungen verschiedener Stoffwechselwege darlegen lassen. Dass unter den Verbindungen,

die maßgeblich zur Charakterisierung der untersuchten Sortenkollektionen und Nachkommen der Kreuzungspopulationen beitragen, nahezu alle bisher bekannten Phenolkomponenten vorkamen, bekräftigte deren Bedeutung für die Polyphenolbiosynthese (**Tab. 20**, S. 114).

4.1.3.2. Auswertung der spanischen Sortenkollektion von 2009

Die bioinformatische Auswertung der spanischen Sortenkollektion zeigte, dass sich die Sorte *F. × ananassa* cv. Selva AF (Varietät 25) aufgrund der höheren Gehalte an Catechin-Dimeren, Catechin und zweier unbekannter Verbindungen (*loadings* 1 und 2) im Vergleich zu den anderen Proben besonders verhielt (**Abb. 38**, S. 107). Erste Rückschlüsse über die Struktur der beiden unbekannt Substanzen ergeben sich aus deren Massenspektren (**Abb. 48**).

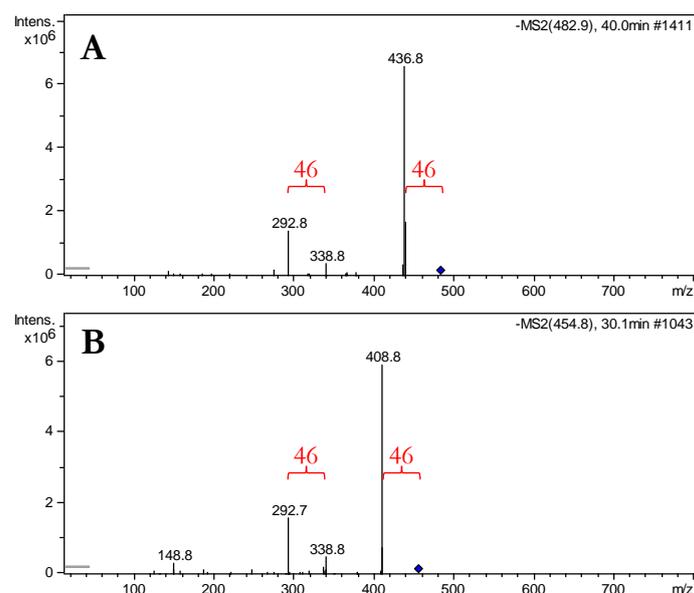


Abb. 48: Tochterionenspektren ($-MS^2$) der *loadings* 1 (m/z 483; **A**) und 2 (m/z 455; **B**) im negativen Modus.

Die Betrachtung der Massenspektren verrät strukturelle Gemeinsamkeiten. Beide Verbindungen enthalten die Fragmente bei m/z 293 und 339, zwischen denen eine Differenz von 46 liegt. Die Differenz zwischen Mutterion und intensivstem Tochterion beträgt ebenfalls jeweils 46.

Da das Fließmittel mit Ameisensäure versetzt ist, können derartige Fragmentierungsmuster im negativen Modus neben Ethylestern/-ethern oder primären Ethylalkoholen auch von Formiataddukten, die sich im Massenspektrometer bilden, stammen. Aufgrund der zweimaligen Abspaltung eines Neutralteilchens mit 46 g/mol könnten sowohl zwei der eben genannten Gruppen vorhanden sein, als auch nur eine, falls sie sich nach Fragmentierung zu m/z 339 noch am restlichen, geladenen Teil des Moleküls befindet.

Formiataddukte liegen nicht kovalent gebunden vor und werden daher sehr leicht abgespalten, was die erhöhte Intensität des ersten Tochterions gegenüber den anderen erklären könnte. Dass das Fragment m/z 339 ein Formiataddukt behält, ist sehr unwahrscheinlich, da dies bereits bei der ersten Fragmentierung abgespalten worden wäre. Allerdings kann sich Formiat während des Fragmentierungsprozesses auch erneut an die entstandenen Teilchen anlagern. Zeitgleich zu m/z 483 erscheint auch m/z 473 (**Abb. 49**), welches ebenfalls zu m/z 437 und m/z 293 fragmentiert, aber anstelle der zweifachen Abspaltung von 46 eine Differenz von 36 aufweist, die typischerweise nur bei Chloraddukten auftritt. Das gleiche Muster ergibt sich auch für *loading* 2 (m/z 455 im negativen Modus).

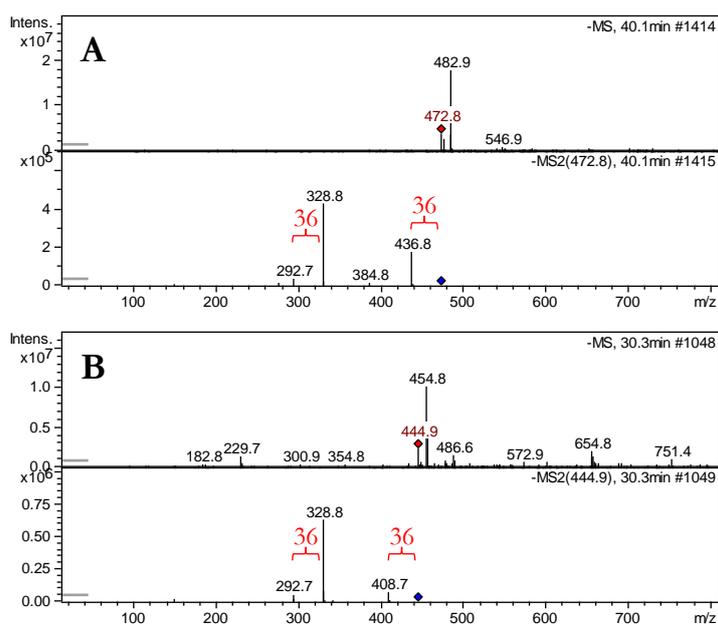


Abb. 49: Massenspektren der potentiellen Chloraddukte der *loadings* 1 (**A**) und 2 (**B**) im negativen Modus.

Dass das gleiche Molekül einmal mit einer Abspaltung eines Neutralteilchens mit 46 g/mol und einmal mit 36 g/mol auftritt, spricht klar dafür, dass es sich jeweils um das Formiat- bzw. Chloraddukt und keine primäre Alkohol- oder Ethergruppe handelt. Gegen das Vorhandensein einer Esterbindung spricht dies jedoch nicht. Eine derartig ausgeprägte Tendenz zur Bildung von negativ geladenen Addukten benötigt einen nucleophilen Anziehungspunkt. Dies können z.B. Carbonyl- oder Esterfunktionen sein.

Die Molekulargewichte der beiden unbekanntem Verbindungen liegen demnach bei 438 g/mol bzw. 410 g/mol, was einem Unterschied von 28 g/mol, also einer Carbonylfunktion oder einer Ethylengruppe (-CH₂-CH₂-) bzw. zwei Methylengruppen, entspricht. Im Gegensatz zu einer Carbonylfunktion bewirken zusätzliche Alkylgruppen eine Erhöhung der Hydrophobie eines Moleküls. Dass Verbindung 1 (438 g/mol) auf der Umkehrphase (unpolar) etwa 10 min später

eluiert, spricht für stärker ausgeprägte hydrophobe Eigenschaften und somit für eine oder zwei zusätzliche Alkylgruppen.

Parallel zu den negativen Ionen erscheinen im positiven Modus die Ionen bei m/z 461 bzw. m/z 433 (**Abb. 50**), welche den Natriumaddukten entsprechen.

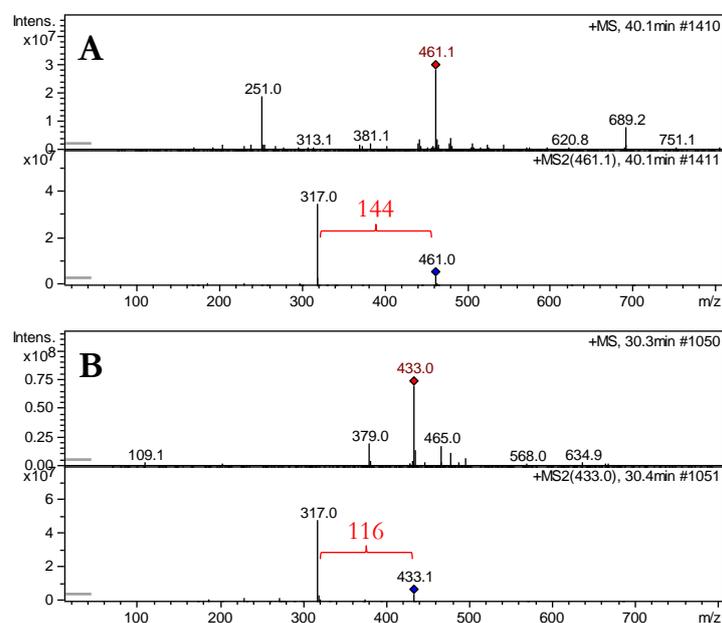


Abb. 50: Massenspektren der Natriumaddukte der *loadings* 1 (**A**) und 2 (**B**) im positiven Modus.

Beide Verbindungen fragmentieren zu m/z 317. Die neutrale Differenz von 116 bei Verbindung 2 (**Abb. 50B**) kommt durch die Abspaltung des positiv geladenen Natriums (23 g/mol) und eines negativ geladenen Phenolrests (93 g/mol) zustande, wobei die Hydroxyfunktion des Phenolrings womöglich zur Bildung des Natriumadduktes dient. Unter Einberechnung des höheren Molekulargewichts von 28 g/mol ergibt sich für Verbindung 1 die gleiche Abspaltung (116 g/mol + 28 g/mol = 144 g/mol, **Abb. 50A**). Das Ion bei m/z 317 ist also bei beiden unbekanntem Verbindungen ein $[M\text{-Phenol}+H]^+$ -Ion. Die zusätzlich enthaltenen Alkylgruppen in Verbindung 1 sitzen dementsprechend am Phenolring, was entweder zu einer Methoxyfunktion und einem zusätzlichen Methylrest oder einer Ethoxyfunktion führen kann.

Im Gegensatz zu Ethyl- sind Methylgruppen in pflanzlichen Systemen weit verbreitet. Die Bildung von Methoxyfunktionen verläuft über *S*-Adenosylmethionin und dient meist der Absenkung der Reaktivität freier Hydroxygruppen. Demzufolge ist es wahrscheinlicher, dass Verbindung 1 am Phenolring statt einer Hydroxy- eine Methoxyfunktion und eine zusätzliche Methylgruppe aufweist. Eine derartige Dreifachsubstitution des Aromaten (Methoxy-, Methylgruppe und restliches Molekül) wäre aus energetischer Sicht in 1,3,5-Stellung am stabilsten, da somit die sterische Behinderung einer direkten Nachbarschaft vermieden würde.

Zusammenfassend konnte die chemische Struktur der beiden unbekanntenen Substanzen ($MG_1 = 438 \text{ g/mol}$ und $MG_2 = 410 \text{ g/mol}$), die besonders in der Sorte Selva AF angereichert wurden, näher beschrieben werden. Sie besitzen beide das gleiche Grundgerüst, welches einen Phenolring und eine Carbonyl- oder Esterfunktion beinhaltet. Verbindung 1 enthält zwei zusätzliche Methylfunktionen am Phenolring und stellt somit die zweifach methylierte Form von Verbindung 2 dar.

4.1.4. Methodik

Für die Analytik phenolischer Komponenten existieren zahlreiche Bestimmungsmethoden, die meist auf colorimetrisch quantifizierbaren Redox-Reaktionen beruhen, wie nach Folin-Ciocalteu oder TEAC (Trolox äquivalente antioxidative Kapazität). Als Referenz dient ein Reaktionsansatz mit Gallussäure oder Trolox, weshalb die Werte semi-quantitativ in Gallussäure- oder Trolox-Äquivalenten angegeben werden. Die Methoden sind sensitiv und schnell, kostengünstig und in großen Ansätzen (z.B. in Titerplatten) durchführbar, jedoch fehlt ihnen die Spezifität, da jegliche Substanzen mit reduzierenden Eigenschaften miteinbezogen werden (Prior *et al.*, 2005). Neben pflanzlichen Phenolen reagieren auch Vitamine (insbesondere Ascorbinsäure), Proteine, Thiole und anorganische Ionen positiv. Die resultierenden Werte beschreiben demnach vielmehr die gesamte antioxidative Kapazität als den Gesamtpolyphenolgehalt (Everette *et al.*, 2010). Eine entsprechende Aufreinigung der Proben wäre aufwendig und birgt das Risiko einer Verfälschung durch externe Fehlerquellen. Letztlich ist die Angabe eines Gesamtpolyphenolgehalts auch aufgrund der Vielfalt pflanzlicher Phenole nicht möglich.

Die semi-quantitative Bestimmung einzelner Komponenten aus Methanolextrakten via LC-MSⁿ mit anschließender Addition der Gehalte konnte in der vorliegenden Arbeit ebenfalls keinen echten Gesamtpolyphenolgehalt liefern, erfasste jedoch die löslichen Hauptphenolkomponenten und verschaffte zusätzlich Einblicke in die einzelnen Schritte der Polyphenolbiosynthese, um Aussagen über die Akkumulation bestimmter Verbindungen treffen zu können. Die Quantifizierung erfolgte bezogen auf den internen Standard Biochanin A, einem in Erdbeeren nicht vorkommenden Isoflavon, weshalb die Werte in Äquivalenten, sog. relativen Konzentrationen, angegeben sind. Dies erlaubte zwar keinen Abgleich mit etwaig vorhandenen Daten aus absoluten Quantifizierungen, ermöglichte jedoch die Gegenüberstellung der vermessenen Proben untereinander, um innerhalb eines kurzen Zeitraums viele Proben (**Tab. 3**, S. 16) anhand verschiedener Metabolite (**Tab. 7**, S. 38) zu vergleichen und in eine Rangfolge einzureihen. Die sehr gute Korrelation der Ergebnisse diverser Aufarbeitungsmethoden bestätigte die Reproduzierbarkeit der verwendeten Methoden (s. **3.2**, **3.3**, S. 75ff).

Durch die einfache und schnelle Aufarbeitung wurde die Artefaktbildung minimiert, sodass die Proben möglichst unverfälscht und in ihrer Individualität zur Messung zur Verfügung standen. Darüber hinaus ermöglichte das Ablesen einer großen Bandbreite mittels MSⁿ (m/z 100 – 800) die simultane Erfassung vieler Komponenten (200 – 400), sodass mit derselben Methode neben einem gezielten (*targeted*) auch ein nicht zielgerichteter (*untargeted*) Ansatz verfolgt werden konnte. Durch die Aufnahme von Leerläufen konnten Störsignale, wie z.B. Verunreinigungen der verwendeten Lösungsmittel oder der Apparatur, herausgefiltert werden. Für zukünftige Arbeiten wäre zusätzlich die regelmäßige Messung eines Erdbeerfrucht-Standardgemisches sinnvoll, um die Reproduzierbarkeit der Analytik überprüfen zu können. Ein derartiger Mix müsste geeignet gelagert werden und sollte aus fünf bis zehn verschiedenen Sorten bestehen, um eine möglichst große Bandbreite an Metaboliten abzudecken.

Ein Vergleich verschiedener Olivenöle ($n = 29$), deren Polyphenolgehalte einerseits mittels LC-MSⁿ (Summe der Gehalte der Hauptphenolkomponenten aus Methanolextrakten) und zum anderen mittels Folin-Ciocalteu bestimmt wurden, erbrachte lediglich eine mäßige Korrelation zwischen den Ergebnissen der beiden Methoden (Andjelkovic *et al.*, 2008). Dies reflektiert nicht nur die mangelnde Spezifität des Folin-Ciocalteu-Reagenzes oder den Beitrag strukturell unbekannter Verbindungen zur antioxidativen Kapazität, sondern vielmehr die unterschiedliche Suszeptibilität der Substanzen hinsichtlich verschiedener Detektions- und Quantifizierungsverfahren.

In den untersuchten Erdbeerfruchtextrakten spiegelte die Summe der einzelnen Verbindungen, der „Gesamtpolyphenolgehalt“, aufgrund seiner mengenmäßigen Dominanz hauptsächlich das 4'-monohydroxylierte Anthocyan Pelargonidin-3-O-glucosid wider. Aufgrund des +M-Effektes von Hydroxygruppen steigt die antioxidative Kapazität der Anthocyane mit zunehmendem Hydroxylierungsgrad des B-Ringes, weshalb Erdbeeren ein niedrigeres antioxidatives Potential (nach Folin-Ciocalteu) aufwiesen, als z.B. Blaubeeren, welche einen höheren Anteil an Flavonoiden mit di- und trihydroxylierten B-Ring-Strukturen besaßen (Wang und Lin, 2000). Dennoch erzielten Erdbeeren in einer Studie zur antikanzerogenen Wirkung verschiedener Fruchtextrikte bessere Effekte als Blau- oder Brombeeren (Seeram *et al.*, 2006). Dies zeigt, dass andere Mechanismen von Bedeutung sind, als das antioxidative Potential, die entschiedener zur Hemmung der Tumorzellproliferation beitragen. Die Frage der ernährungsphysiologischen Wirkungsweise und Effektivität unterschiedlicher Polyphenole ist jedoch längst nicht gelöst. Hinzu kommt der wesentliche Einfluss weiterer ungeklärter Faktoren wie Resorption, Verteilung und Metabolismus, weshalb die Aufnahme eines breiten Spektrums an Phytochemikalien aus aktueller Sicht als am wertvollsten für den Menschen erscheint.

4.2. Analyse der *si-ANR*- und *si-FLS*-Pflanzen

Der Beitrag zweier Enzyme zur Flavonoidbiosynthese wurde anhand stabil transgener Erdbeerpflanzen mit herabregulierter Anthocyanidin-Reduktase (*ANR*) bzw. Flavonol-Synthase (*FLS*) untersucht. Zur Analyse mittels LC-MSⁿ wurden Früchte verschiedener Reifestadien, sowie Blätter, Wurzeln und einzelne Blütenbestandteile eingesetzt.

4.2.1. *si-ANR*-Pflanzen akkumulieren Cyanidin- und Quercetin-Derivate

Die Herabregulation der *ANR* generierte einen starken Phänotyp (**Abb. 51**).



Abb. 51: Blüte (**links**) und Frucht im „grünen“ Reifestadium (**rechts**) einer *si-ANR*-Pflanze von *F. × ananassa* cv. Senga Sengana. Fotos Dr. Ruth Habegger (TU München).

Blüten ließen sich visuell durch rote Narben und rosa gefärbte Kronblätter vom Wildtyp unterscheiden. Früchte der *si-ANR*-Pflanzen wiesen bereits im „grünen“ (G1) Reifestadium eine rote Farbe auf, deren Intensität im Verlauf der Reifung durch vermehrte Wassereinlagerung abnahm. Die erneute Anthocyanproduktion setzte im T-Stadium parallel zum Wildtyp ein und führte zu roten reifen Früchten, die vom Wildtyp nicht mehr differenzierbar waren (**Abb. 14**, S. 79).

Wie die LC-MSⁿ-Analyse ergab, kam der charakteristische *si-ANR*-Phänotyp durch Einlagerungen von Cyanidin-glucosid zustande, welches in Narben, Kronblättern, Früchten (G1, G2, W und T) und Wurzeln in signifikant höheren Mengen als im Wildtyp (WT) vorhanden war (s. **3.4.1**, S. 78ff). Parallel dazu akkumulierten *si-ANR*-Pflanzen erhöhte Gehalte an Quercetin-glucuronid, vermutlich als *upstream*-Produkt, wobei Kaempferol-Derivate signifikant reduziert vorkamen (**Abb. 52**). Während sich die Konzentrationen von Cyanidin-glucosid im Laufe der Fruchtreifung zwischen *si-ANR* und WT angleichen, war Quercetin-glucuronid noch in reifen *si-ANR*-Früchten in höheren Mengen und Kaempferol-glucosid in niedrigeren Gehalten als im

WT nachzuweisen. Da monomeres Epicatechin selbst im WT unterhalb der Nachweisgrenze lag (0,03 mg equ./g TM), konnte eine eingeschränkte Produktion in si-*ANR*-Pflanzen zwar nicht direkt beobachtet werden, in si-*ANR*-Früchten zeigten sich jedoch signifikant niedrigere Gehalte an jeweils einem Konfigurationsisomer der Dimeren (Epi)Catechin-(epi)catechin bzw. (Epi)Afzelechin-(epi)catechin, was für eine Beteiligung der Epi-Formen an dem jeweils betroffenen Isomer sprach (**Abb. 17**, S. 82).

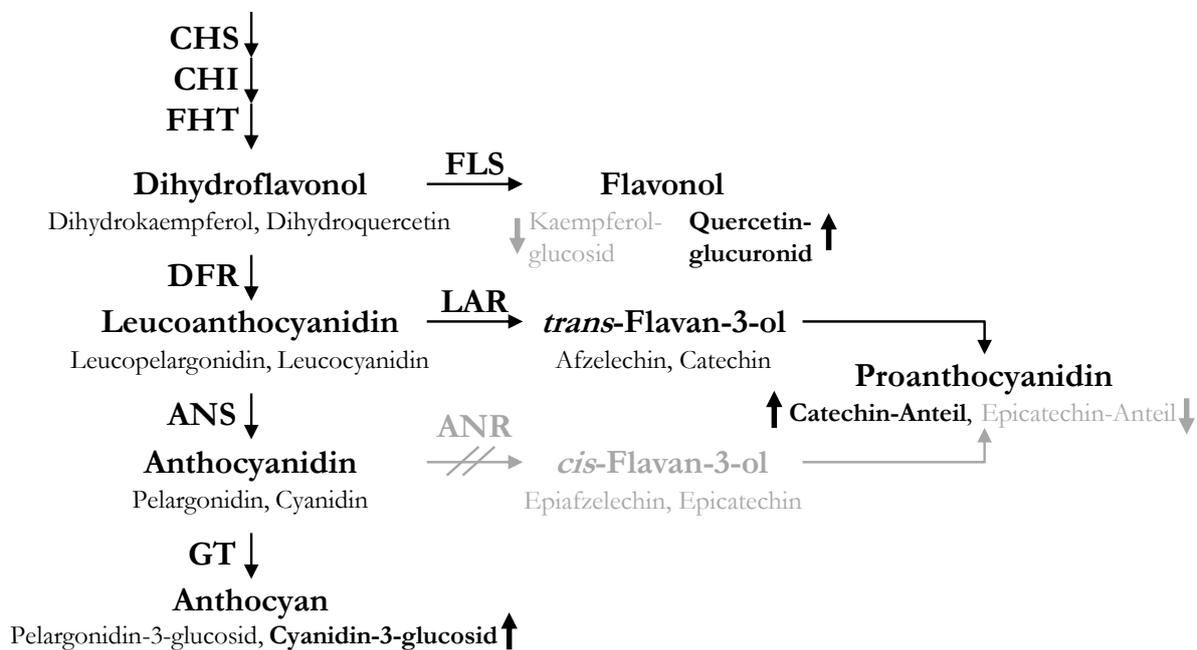


Abb. 52: Schema der Flavonoidbiosynthese in *F. x ananassa* bei herabregulierter *ANR*.

Die thiolytische Spaltung der Proanthocyanidine (PAs) bestätigte zunächst den bevorzugten Einsatz von Epicatechin als Verlängerungs- anstelle der Terminaleinheit sowohl in si-*ANR*- als auch in WT-Früchten (**Abb. 20**, S. 86, Gu *et al.*, 2002). Bei einem durchschnittlichen Polymerisierungsgrad von ca. sechs Einheiten im WT demonstriert dies, warum Epicatechin in Reinform nicht detektierbar war. Ebenso war (Epi)Afzelechin nur in geringem Maße am Aufbau von PAs beteiligt, was mit der strikten Substratspezifität der Leucoanthocyanidin-Reduktase (LAR) zur begünstigten Bildung von Catechin übereinstimmt (Almeida *et al.*, 2007). Die eingeschränkte Verwendung von Epicatechin-Einheiten, sowie der verringerte Polymerisationsgrad (3,8) in si-*ANR*-Früchten sprachen für eine eingeschränkte Verfügbarkeit von Epicatechin. Stattdessen wurde vermehrt Catechin zum Aufbau der PAs in si-*ANR*-Früchten genutzt, was erklärt, dass in der LC-MSⁿ-Analyse ein Isomer, vermutlich das reine Catechin-Dimer, nur eine leicht unterschiedliche Akkumulation zwischen si-*ANR* und WT aufzeigte. Die Funktion der ANR wurde somit anhand der eingeschränkten Produktion von

Epicatechin, sowie der Akkumulation von Cyanidin-glucosid in verschiedenem Gewebe verdeutlicht.

Ein zu den untersuchten Erdbeerblüten ähnlicher Phänotyp konnte durch Überexpression des stark reifekorrelierten *FaMYB10*-Transkriptionsfaktors in *F. × ananassa* beobachtet werden. Neben einer Rotfärbung der Narben, Blätter und Wurzeln ergaben sich erhöhte Anthocyangehalte in reifen Früchten (Lin-Wang *et al.*, 2010). In *F. vesca* führte Lichtstress (24 Stunden Belichtung pro Tag, im Gegensatz zu 16 Stunden beim WT) zu einer Pigmentierung der Kronblätter und zeitgleich zu einer immensen Zunahme der Transkriptlevel von *FvMYB10* (Lin-Wang *et al.*, 2010).

Im Vergleich zu anderen Blütenbestandteilen besaßen in der vorliegenden Arbeit die Narben die höchsten Gehalte an PAs, was gemeinsam mit den deutlichen phänotypischen Veränderungen durch die Herabregulation der ANR auf eine wichtige Rolle der ANR in Narben, Kronblättern, jungen Früchten und Wurzeln hinweist. Neben den großen Mengen an *ANR*-Transkripten in Kronblättern (Almeida *et al.*, 2007) erreicht die *ANR*-Expression ihr Maximum in grünen Früchten, korrespondierend zu den Gehalten an PAs (Carbone *et al.*, 2009; Halbwirth *et al.* 2006b). Eine Beeinträchtigung der PA-Produktion durch Herabregulation der *ANR* bewirkt somit eine Erhöhung der verfügbaren Menge an Substrat für Glucosyl-Transferasen (GTs). Durch die Bildung von Anthocyanen konnte auf die Aktivität von GTs im erwähnten Gewebe geschlossen werden, was bisher nur selten beobachtet wurde (Halbwirth *et al.*, 2006b), da die meisten Isoformen der GTs reifekorreliert und somit erst im T- oder R-Stadium exprimiert werden (Grießer *et al.*, 2008a, b; Carbone *et al.*, 2009).

Die Anreicherung von Cyanidin- und Quercetin-Derivaten anstelle der in WT-Früchten vorherrschenden Pelargonidin- und Kaempferol-Derivate ist auf die Aktivität der Flavonoid-3'-Hydroxylase (F3'H) zurückzuführen, die ihr Maximum im G1-Stadium besitzt (Carbone *et al.*, 2009). Passend zur Aktivität der F3'H verwendet die ANR bevorzugt Cyanidin als Substrat, obwohl andere Enzyme der Flavonoidbiosynthese, wie FHT, FLS, DFR und ANS, vorwiegend Substrate mit einfach hydroxylierten (4') B-Ringen umsetzen (Almeida *et al.*, 2007; Preuß, 2009). Während die MtANR aus *Medicago truncatula* ebenfalls Cyanidin favorisiert, weist die AtANR aus *A. thaliana* eine genau umgekehrte Substratpräferenz auf (Xie *et al.*, 2004). Darüber hinaus zeigte die Thiolyse, dass die PAs in *F. × ananassa* cv. Senga Sengana vorwiegend aus 3',4'-dihydroxylierten Flavan-3-olen (Catechinen) aufgebaut waren, weshalb si-*ANR*-Pflanzen folglich Produkte mit übereinstimmender B-Ring-Hydroxylierung (Cyanidin- und Quercetin-Derivate) anreicherten. Nach dem gleichen Prinzip führte eine Einschränkung der *ANR*-

Expression in Weißklee (*Trifolium repens*) zu rot gefärbten Kronblättern und einer Akkumulation von Myricetin- und Delphinidin-Derivaten (jeweils 3',4',5'-trihydroxyliert; Abeynayake *et al.*, 2012). An der Generierung des Phänotyps der si-ANR-Erdbeerpflanzen waren demzufolge F3'H und GTs maßgeblich beteiligt.

Ein weiterer Erklärungsansatz für die unterschiedliche Substratspezifität bezüglich des Hydroxylierungsgrades der B-Ringe zwischen der ANR und den restlichen Enzymen der Flavonoidbiosynthese ergibt sich aus einer Differenzierung zwischen PA- und Anthocyan-Biosynthese. Möglich wäre die Präsenz mehrerer Isoformen pro *upstream* Enzym, wobei die eine Isoform in frühen Entwicklungsphasen exprimiert wird, um die PA-Biosynthese mit Substraten zu versorgen, und die zweite Isoform in späteren Stadien korrespondierend mit der Produktion von Anthocyanen (Abeynayake *et al.*, 2012). Die Existenz verschiedener Isoformen eines Enzyms ist zwar gebräuchlich, jedoch fehlen hierzu entweder die Nukleotidsequenzen oder umfassende Expressionsstudien. Da der zeitliche Verlauf der F3'H-Expression in Erdbeerfrüchten mit der Bildung von PAs übereinstimmt (Carbone *et al.*, 2009), ist nach aktuellem Kenntnisstand eine Kontrolle der Produktstruktur ausschließlich anhand der Verfügbarkeit der Substrate wahrscheinlicher. In frühen Entwicklungsphasen sind demnach vorwiegend Substrate mit 3',4'-dihydroxylierten B-Ringen vorhanden, wohingegen in späteren Reifestadien aufgrund der abnehmenden F3'H-Aktivität Substrate mit 4'-monohydroxylierten B-Ringen vorherrschen.

Die ersten rekombinanten ANRs, die nachweislich die Bildung von *cis*-Flavan-3-olen katalysierten, wurden aus den *BANYULS*-Genen aus *A. thaliana* und *M. truncatula* gewonnen (Xie *et al.*, 2003). In den anschließenden Biosyntheseschritten werden Flavan-3-ole durch Kondensationsreaktionen zu den PAs di- und oligomerisiert. Ob und welche Enzyme darin involviert sind, ist unklar (Zhao *et al.*, 2010), wobei die Beteiligung einer Laccase-ähnlichen Polyphenol-Oxidase vermutet wird (Pourcel *et al.*, 2005). In Erdbeeren enthalten die Narben und jungen Früchte die höchsten Gehalte an Catechinen und PAs, die aufgrund ihrer antimikrobiellen Wirkung mit der Resistenz gegenüber Schimmelpilzen in Verbindung gebracht werden. Grauschimmel *Botrytis cinerea* befällt vornehmlich Blüten, bricht jedoch erst in reifen Früchten aus (Mertely *et al.*, 2002; Goetz *et al.*, 1999). Die Latenzzeit korreliert folglich mit abnehmenden Gehalten an Catechinen und PAs. Zusätzlich lässt die *in situ* Biosynthese der PAs in der Rhizodermis und der Kalyptra von Wurzelspitzen weitere Funktionen in der Kommunikation mit Mikroorganismen, z.B. Aufbau von Mycorrhiza oder Abwehrmechanismen gegenüber *Verticillium*, vermuten (Hoffmann *et al.*, 2012).

4.2.2. Herabregulation der *FLS* reduziert Flavonolgehalte

Die Rolle der *FLS* in der Flavonoidbiosynthese konnte deutlich bestätigt werden. In allen untersuchten Geweben führte die Herabregulation der *FLS* zu stark reduzierten Gehalten an Kaempferol- und Quercetin-Derivaten im Vergleich zum WT (s. 3.4.2, S. 88ff). In Kronblättern ergaben sich die signifikantesten Unterschiede zwischen *si-FLS* und WT (**Abb. 22**, S. 88), was mit Literaturdaten über eine gewöhnlich starke Expression von *FLS* in Kronblättern von *F. × ananassa* übereinstimmte (Almeida *et al.*, 2007). Anders als in *FLS*-Mutanten von *Petunia* oder Tabak, in denen sich Anthocyane und Flavan-3-ole anreicherten (Schijlen *et al.*, 2004; Mahajan *et al.*, 2012), konnte eine deutliche Akkumulation von *upstream*- oder anderen Produkten, deren Anreicherung aufgrund mangelnder Verzweigungen in der Biosynthese gefördert werden könnte, in den untersuchten *si-FLS*-Pflanzen nicht festgestellt werden. Visuell waren keine Unterschiede zwischen *si-FLS*-Pflanzen und WT erkennbar.

Während die Gehalte an Kaempferol-Derivaten im Verlauf der Fruchtreifung im WT abnahmen, zeigte sich für Quercetin-glucuronid die maximale relative Konzentration im W-Stadium (**Abb. 23**, S. 89). Dies spiegelt die beiden gegensätzlichen Muster der *FLS*-Expression in der Literatur wider. Einerseits wird von einer abnehmenden Expression im Verlauf der Reifung berichtet (Carbone *et al.*, 2009; Salvatierra *et al.*, 2010), zum anderen von einer maximalen Transkriptionsrate im T-Stadium (Halbwirth *et al.*, 2006b; Almeida *et al.*, 2007). Die unterschiedlichen Expressionsverläufe und die Metabolitkonzentrationen der vorliegenden Messung könnten das Vorhandensein verschiedener *FLS*-Isoformen mit ungleicher Substratspezifität suggerieren. Im Genom von *F. × ananassa* werden bis zu acht isomere Formen vermutet (Almeida *et al.*, 2007), wobei nicht jede Isoform ein funktionales Protein codieren muss. So enthält *A. thaliana* zwar sechs annotierte Isoformen, jedoch nur zwei aktive Flavonol-Synthasen (*FLS1* und *FLS3*; Preuss *et al.*, 2009). Die differenzierte Akkumulation von Kaempferol- und Quercetin-Derivaten könnte auch durch Nebenaktivitäten der involvierten Enzyme zustande kommen, zumal die Sequenz der *FLS* hohe Ähnlichkeit mit der reifekorrelierten *ANS* besitzt, die ebenfalls *FLS*-Aktivität aufweist (Martens *et al.*, 2010).

Die Expression der *FLS* und anderer Gene der Flavonoidbiosynthese wird in *F. × ananassa* von dem Transkriptionsfaktor *FaMYB1*, der hauptsächlich in späten Reifestadien vorhanden ist, unterdrückt (Aharoni *et al.*, 2001). Eine positiv regulierende Wirkung auf die zur Biosynthese von Flavonolen notwendigen Gene (*CHS*, *CHI*, *FHT* und *FLS*) geht in *A. thaliana* von *MYB11*, *MYB12* und *MYB111* aus (Stracke *et al.*, 2007).

Flavonole werden in der Pflanze zum Schutz vor UV-B-Strahlung (280 – 320 nm) produziert (Solovchenko und Schmitz-Eiberger, 2003). Sie wirken einerseits präventiv als UV-Absorber, eine erhöhte Produktion konnte aber auch nach Schädigungen durch UV-Stress festgestellt werden, wobei hauptsächlich Komponenten mit mehrfacher Aromat-Hydroxylierung gebildet wurden, welche erhöhte antioxidative und Radikalfänger-Kapazitäten besitzen, jedoch nicht zu einer entscheidenden Änderung der UV-B-Absorption beitragen (Ryan *et al.*, 2002). Somit kommt den Flavonolen eine besondere Rolle in der Reaktion auf oxidativen Stress, wie z.B. die Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) zu. Zusätzlich dienen Flavonole als Co-Pigmente zur Farbgebung und Stabilität der Anthocyane (Stich *et al.*, 1992). Eine inhibierende Wirkung der Flavonole, speziell Quercetin, auf den Auxin-Transport (Brown *et al.*, 2001; Lattanzio *et al.*, 2006), sowie eine Beteiligung an der Pollenkeimung, insbesondere Kaempferol (Mo *et al.*, 1992), und anderen durch Umwelteinflüsse induzierten Regulationsmechanismen der Pflanzenentwicklung wird vermutet (Pollastri und Tattini, 2011).

4.3. Analyse der *FaMYB10*-RNAi-Früchte

Die transiente Herabregulation des *FaMYB10* Transkriptionsfaktors in reifenden Erdbeerfrüchten führte zu einer deutlichen Reduktion der Anthocyangehalte, was sich auch im Phänotyp ausdrückte (**Abb. 26**, S. 92). *FaMYB10*-RNAi-Früchte erschienen weiß und wiesen selbst im reifen Stadium nur vereinzelte, kleine Flächen mit roter Färbung auf. Zudem besaßen sie im Vergleich zu den Kontrollfrüchten erhöhte Gehalte an Phenylpropanen, die sich womöglich aufgrund der eingeschränkten Anthocyanbiosynthese anreicherten. Des Weiteren akkumulierten *FaMYB10*-RNAi-Früchte höhere Mengen an DMHF-glucosid als die Kontrollfrüchte, was auf ein konkurrierendes Verhalten verschiedener Sekundärstoffwechselwege deutete, wie dies auch in den Analysen der Sortenkollektionen und Segregationspopulationen (s. **4.1.1**, S. 122f) beobachtet werden konnte.

FaMYB10 zählt zu den R2R3-MYB-Transkriptionsfaktoren. Die konservierten DNA-bindenden Domänen sind auch in der Sequenz von *FaMYB10* enthalten (Lin-Wang *et al.*, 2010). Transkriptionsfaktoren regulieren die Expression von Strukturgenen, vermutlich durch Anlagerung an bestimmte DNA-Abschnitte (Allan *et al.*, 2008). Neben der positiven Regulation vieler Strukturgene der Flavonoidbiosynthese schien *FaMYB10* die Expression der Anthocyanidin-Synthase (ANS) und der Leucocyanidin-Reduktase (LAR), und somit die Produktion von PAs zu unterdrücken (Cumplido-Laso *et al.*, unveröffentlichte Daten). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Herabregulation von *FaMYB10* zu einer verminderten Biosynthese von Anthocyanen führte, während die Gehalte an PAs im Vergleich

zum Wildtyp unverändert blieben. Im Einklang mit diesen Ergebnissen resultierte die Überexpression von *FaMYB10* in einer erhöhten Anthocyanproduktion, sowie einem Phänotyp der Blüten, die ähnlich den untersuchten *si-ANR*-Blüten (**Abb. 51**, S. 133) rot gefärbte Narben und Kronblätter aufwiesen (Lin-Wang *et al.*, 2010). Die Expression von *FaMYB10* wurde durch Abscisinsäure positiv reguliert (Cumplido-Laso *et al.*, unveröffentlichte Daten), was den entscheidenden Einfluss der Abscisinsäurekonzentration auf die Anthocyanproduktion verdeutlichte (Jia *et al.*, 2011; Symons *et al.*, 2011; Zifkin *et al.*, 2012).

Ein weiterer Vertreter der R2R3-MYB-Transkriptionsfaktoren ist *FaMYB1*. Im Gegensatz zu *FaMYB10* unterdrückt *FaMYB1* jedoch die Anthocyanbiosynthese (Aharoni *et al.*, 2001).

4.4. Proteinanalyse

Anders als bisherige Proteom-Analysen von *Fragaria*, die sich auf die Erstellung einer Proteinkarte, die Untersuchung des Reifungsprozesses oder unterschiedlich exprimierte Proteine in Nüsschen und Blütenboden konzentrierten (Bianco *et al.*, 2009; Aragüez-Rey, 2011), fand in der vorliegenden Arbeit eine Eingrenzung des Untersuchungsansatzes auf Basis ausgedehnter Metabolit-Analysen statt. Zur 2D-Gelelektrophorese wurden demnach vier der 94 Genotypen der F1-Segregationspopulation Capitola × CF1116 aus dem Jahr 2009 ausgewählt, die sich in den vorangestellten *Metabolite Profiling*-Studien hinsichtlich der Akkumulation phenolischer Metabolite unterschieden (s. **3.11**, S. 119ff). Da die Nachkommen einer Kreuzungspopulation ausgeprägte Ähnlichkeiten im Primärstoffwechsel besitzen, ergaben sich nur wenige Spots mit deutlich unterschiedlicher Intensität in den verschiedenen Genotypen. Drei der sieben identifizierten Proteine lieferten Zusammenhänge zur Flavonoidbiosynthese und werden im Folgenden jeweils kurz beschrieben.

Abscisinsäure-, Stress- und Reife-induzierte (ASR) Proteine sind klein, hitzestabil, hydrophil und im Nucleus und Cytoplasma lokalisiert (Yang *et al.*, 2005). Sie sind nicht nur an bestimmten Phasen der Pflanzenentwicklung, wie Seneszenz, Frucht- und Pollenreifung, beteiligt, sondern auch an der Reaktion auf Salz-, Trocken- und Kältestress. Bisher wurden *ASR*-Orthologe in vielen di- und monokotylen Pflanzen, Gräsern und Bäumen, jedoch nicht in *Arabidopsis* identifiziert (Çakir *et al.*, 2003). Eine der zwei hoch konservierten Regionen enthält sechs N-terminale Histidinreste und beschreibt eine Zn^{2+} -abhängige DNA-bindende Domäne, die auf eine Funktion der ASR-Proteine in der Transkriptionsregulation des Abscisinsäure-Signalweges hinweist. In Erdbeerfrüchten korreliert die Expression von *FaASR* mit der Reifung und Abscisinsäurekonzentration und wird durch exogene Abscisinsäure verstärkt (Chen *et al.*, 2011). Eine Einschränkung der Abscisinsäurebiosynthese führt zu ungefärbten Früchten, was den

Zusammenhang zur Flavonoidbiosynthese verdeutlicht (Jia *et al.*, 2011). In der vorliegenden Studie wurde das ASR-Protein ausschließlich in Genotypen detektiert, die erhöhte Zimtsäuregehalte akkumulierten. Dies deutet auf eine Störung der Anthocyanbiosynthese in den entsprechenden Individuen hin, da Phenylpropane die Ausgangssubstanzen des Flavonoidstoffwechselweges darstellen. Eine reifekorrelierte Expression des ASR-Proteins hätte einen ubiquitären Nachweis in allen Proben zur Folge haben müssen, weshalb eine stressbedingte Expression wahrscheinlicher ist.

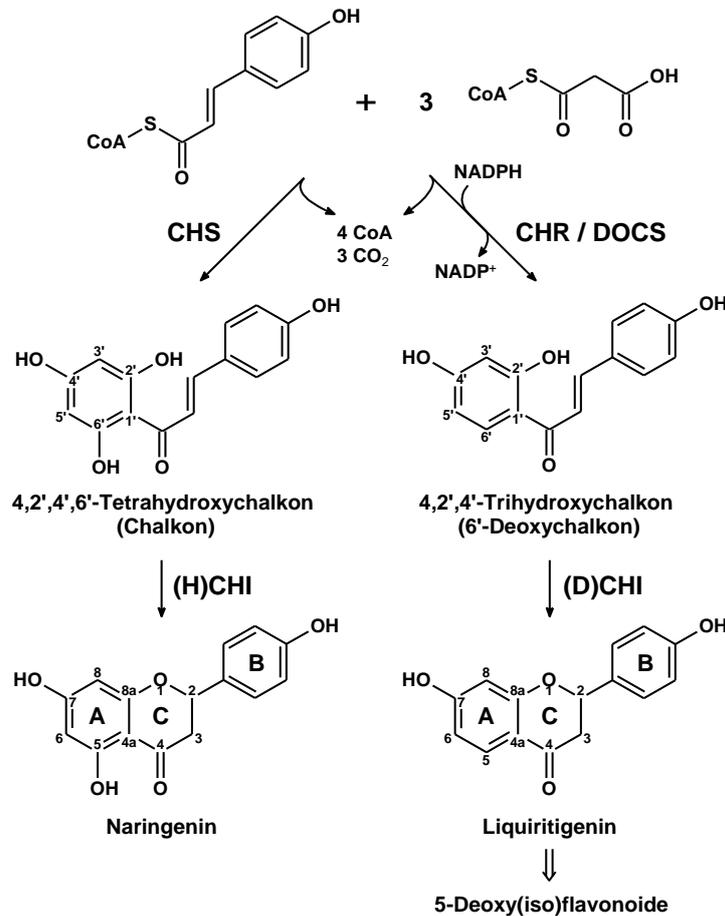


Abb. 53: Schema der Chalkonbiosynthese nach Kimura *et al.*, 2001. **CHS** Chalkon-Synthase, **CHR** Chalkon-Reduktase, **DOCS** 6'-Deoxychalkon-Synthase, **(H)CHI** (6'-Hydroxy)Chalkon-Isomerase, **(D)CHI** (6'-Deoxy)Chalkon-Isomerase. Die unterschiedliche Nummerierung von Chalkon- und Flavonoidgrundgerüst ist zu beachten.

Über die Aktivität einer 6'-Deoxychalkonsynthase und der entsprechenden Produkte wurde in Erdbeeren bisher nicht berichtet. Gemeinsam mit der Chalkon-Reduktase (CHR) katalysiert sie die reduktive Chalkon-Bildung (**Abb. 53**), wobei die Reihenfolge von Reduktion und Cyclisierung nicht geklärt ist (Bomati *et al.*, 2005). Dieser Biosynthesezweig kommt vorwiegend in Leguminosen (Fabaceae) vor und führt zur Formierung von 5-Deoxy(iso)flavonoiden, die als Signalgeber in der symbiotischen Stickstofffixierung und als antimikrobielle Phytoalexine wirken

(Shimada *et al.*, 2003). In einer Sammlung reifeinduzierter mRNAs in Erdbeerfrüchten ist u.a. eine *CHR* gelistet, die große Ähnlichkeit zu einer *CHR* aus Soja (*Glycine max*) aufweist (Manning, 1998).

In Einklang mit der Literatur ergaben eine eingehende Untersuchung der LC-MSⁿ-Chromatogramme anhand entsprechender Ionenspuren sowie eine statistische Analyse unterschiedlich akkumulierter Metaboliten keine Hinweise auf ein großflächiges Vorhandensein von 5-Deoxyflavonoiden in den zur 2D-Gelelektrophorese eingesetzten Erdbeerproben (Hanhineva *et al.*, 2011; <http://massbank.jp>). Für zwei mögliche Produkte konnten allerdings im negativen Modus passende Massenspektren gefunden werden (**Abb. 54**): 5-Deoxyleucopelargonidin-glucosid (Retentionszeit: 36,5 min, -MS¹ m/z 435 und -MS² m/z 273) und Licodion-glucosid (Retentionszeit: 29,5 min, -MS¹ m/z 433 und -MS² m/z 271).

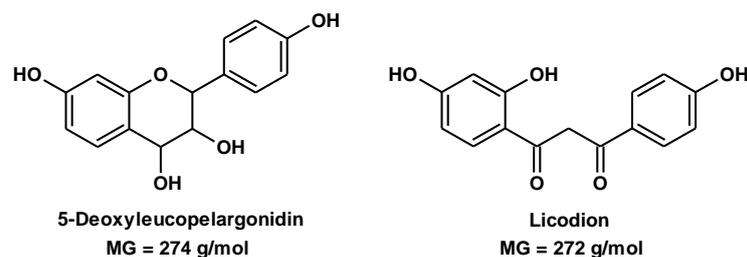


Abb. 54: Strukturformeln und Molekulargewichte (MG) der beiden 5-Deoxyflavonoide 5-Deoxyleucopelargonidin und Licodion, deren Glycoside in den untersuchten Erdbeerproben enthalten sein könnten.

Leucoanthocyanidine besitzen am C5 des A-Rings eine Hydroxygruppe, die verstärkend zur Delokalisierung der Elektronen und somit zur intermolekularen Kondensation und Bildung von Oligomeren, den Proanthocyanidinen, beiträgt. Im Gegensatz dazu sind 5-Deoxyleucoanthocyanidine stabiler, was deren Detektion ermöglichen könnte, zumal die Dihydroflavonol-Reduktase, die die Bildung von Leucoanthocyanidinen katalysiert, auch 5-Deoxydihydroflavonole als Substrate benutzt (Halbwirth *et al.*, 2006a). Licodion entsteht durch Oxidation von Liquiritigenin (Otani *et al.*, 1994). Zur Identifizierung der beiden Substanzen ist jedoch die Messung authentischer Referenzsubstanzen auf dem gleichen System notwendig, da LC-ESI-MSⁿ-Spektren von Flavonoidglykosiden einander sehr ähnlich sind. Zudem ist eine weitere Funktion der putativen 6'-Deoxychalkon-Synthase wahrscheinlich.

Die Isoflavon-Reduktase ist ein monomeres, cytosolisches und NADPH-abhängiges Enzym der Isoflavonoidbiosynthese (Wang *et al.*, 2006). In Erdbeeren wurden Isoflavone bisher nicht nachgewiesen (Hanhineva *et al.*, 2011). Wie in den meisten Nicht-Leguminosen fehlt die Isoflavon-Synthase, die die Bildung des Isoflavons Daidzein aus Liquiritigenin bzw. in

geringerem Umfang auch Genistein aus Naringenin katalysiert (Winkel-Shirley, 2001). Der strukturelle Unterschied zu den Flavonoiden besteht in der Anordnung des B-Rings, welcher sich bei den Isoflavonen an C3 statt C2 befindet. Isoflavon-Reduktase-ähnliche Proteine (IRLs) besitzen eine signifikante Ähnlichkeit zu Isoflavon-Reduktasen und beschreiben eine große Gruppe von Oxido-Reduktasen aromatischer Verbindungen. In einer Proteom-Analyse von *F. × ananassa* erschienen IRLs sowohl unterschiedlich exprimiert zwischen verschiedenen Sorten (USB 35, Miss und Queen Elisa), als auch reifekorreliert (Bianco *et al.*, 2009). IRLs wurden bereits aus diversen Pflanzenspecies isoliert, darunter Mais (*Zea mays*), Tabak (*Nicotiana tabacum*) und Kartoffel (*Solanum tuberosum*) (Wang *et al.*, 2006). In Grapefruit (*Citrus × paradisi*) wurde die Transkription einer IRL durch UV-Bestrahlung induziert (Lers *et al.*, 1998). Ebenso zählt Bet v 5, eines der Birkenpollenallergene, und das durch oxidativen Stress induzierte P3-Genprodukt aus *A. thaliana* zu den IRLs (Karamloo *et al.*, 1999; Babiychuck *et al.*, 1995). Eugenol-Synthase 1 (EGS1) aus Basilikum (*Ocimum basilicum*) und Isoeugenol-Synthase 1 (IGS1) aus *Petunia hybrida* beschreiben ebenfalls zwei Enzyme aus der Gruppe der IRLs (Koeduka *et al.*, 2006). Somit nehmen IRLs neben dem Schutz der Pflanze auch Funktionen in der Aromastoffbiogenese ein. Eugenol ist ein wichtiger Bestandteil des Aromas der Walderdbeere *F. vesca*, was auf die Aktivität der vorhandenen EGS-Homologen zurückzuführen ist (Ulrich *et al.*, 2007). Durch Einbringung der EGS1 und IGS1 in *F. × ananassa* konnte Eugenol auch in der Kulturerdbeere gebildet werden (Hoffmann *et al.*, 2011).

4.5. Microarray-Analyse

Zur Analyse des Transkriptom der Erdbeerfrucht diente eine individuell angefertigte, oligo-basierte Microarray-Plattform mit 18162 *unigenes* von *F. × ananassa*. Die zur Untersuchung eingesetzten Sorten wurden mittels *Metabolite Profiling* ausgewählt. Sie unterschieden sich hinsichtlich der Akkumulation phenolischer Substanzen am deutlichsten (**Abb. 9**, S. 64 und **Tab. 18**, S. 93). Die 17 spezifischen, komparativen Microarray-Analysen ergaben insgesamt 26416 unterschiedlich exprimierte ESTs (> 4-fach, $p < 0,01$, **Abb. 27**, S. 94). Die 25 cDNAs mit den höchsten Expressionsunterschieden (über 200-fach) standen für 15 Kandidatengene (**Tab. 19**, S. 95).

Die Kombination aus *Metabolite Profiling* und Genexpressionsanalysen gewann in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung und lieferte umfassende Überblicke über die Transkriptionsregulation metabolischer Wege und der Reaktion auf Pflanzenhormone und Stress, z.B. in *Arabidopsis thaliana* (Yonekura-Sakakibara *et al.*, 2008), Gerste *Hordeum vulgare* (Kogel *et al.*, 2010), Blaubeere *Vaccinium corymbosum* (Zifkin *et al.*, 2012), Tomate *Solanum lycopersicum*

(Rohrmann *et al.*, 2011), Kartoffel *Solanum tuberosum* (Stushnoff *et al.*, 2010) und Pappel *Populus euphratica* (Janz *et al.*, 2010). Gängige Ansätze sind die Gegenüberstellung von behandelten und unbehandelten Proben, verschiedenen Geweben oder diverser Entwicklungsstadien. Ein Vergleich von reifen Früchten kommerzieller Erdbeersorten ist hingegen äußerst umfangreich, wobei in der vorliegenden Arbeit die vorgeschaltete Charakterisierung mittels *Metabolite Profiling* den nötigen Fokus lieferte.

Die erste Microarray-Analyse mit cDNA aus *F. × ananassa* wurde im Jahr 2000 von Aharoni *et al.* durchgeführt. Die komparative Studie von grünen und roten Früchten führte zur Identifizierung einer Alkohol-Acyl-Transferase, die an der Biosynthese von Fruchtestern beteiligt ist. Weitere vergleichende Analysen wurden angestellt, um unterschiedliche Genexpressionen in Nüsschen und Blütenboden oder in Früchten unter oxidativem Stress feststellen zu können (Aharoni und O’Connell, 2002; Aharoni *et al.*, 2002). Diese Studien lieferten ähnlich hohe Expressionsunterschiede (bis zu 300-fach) in verschiedenem Gewebe des gleichen Genotyps. Fernerhin wurden regulatorische Determinanten der Fruchtfestigkeit mittels vergleichender Microarray-Analysen untersucht (Salentijn *et al.*, 2003; Carbone *et al.*, 2006).

In der vorliegenden Untersuchung ergaben sich unter den ESTs mit den höchsten Expressionsunterschieden einige Redundanzen, was die Reproduzierbarkeit der Analyse bestätigte. Zudem erschienen die Kandidatengene in mehreren komparativen Analysen mit großer Variation der Transkriptmengen, was deren Bedeutung zum Ausdruck brachte. Da die untersuchten Proben aufgrund unterschiedlicher Metabolitakkumulationen ausgewählt wurden, erscheint eine regulatorische Funktion der Gene in der Polyphenolbiosynthese möglich.

4.6. Kandidatengene

Eine Liste der Kandidatengene mit ihren putativen Annotationen ist auf S. 95 (**Tab. 19**) zu finden. Am eindrucksvollsten erschien gene19544, welches vermutlich eine Peroxidase 27 (FaPRX27) codiert. *FaPRX27* tauchte fünfmal unter den Kandidaten auf und zeigte die höchsten Expressionsunterschiede (bis zu 900-fach). Bisher wurde eine Peroxidase 27 aus *F. × ananassa* noch nicht beschrieben, weswegen sie im Rahmen der vorliegenden Arbeit weiter untersucht wurde. Peroxidasen kommt vermutlich eine Rolle in der Ligninbiosynthese zu (Boerjan *et al.*, 2003), die über *p*-Cumaryl-CoA mit dem Stoffwechsel löslicher Polyphenole verbunden ist (Vassão *et al.* 2008). *FaPRX27* wird im Anschluss gesondert diskutiert (s. 4.7, S. 149ff). Weitere Homologe der Kandidatengene scheinen zunächst keine offensichtliche Verbindung zum Flavonoid- und Anthocyanstoffwechsel aufzuweisen, wobei für die meisten Proteine eine

konkrete funktionale Charakterisierung noch aussteht. Viele der Gene spielen vermutlich in bestimmten Entwicklungsstadien und bei der Reaktion auf biotischen und abiotischen Stress eine Rolle. Da die Polyphenolbiosynthese ebenfalls durch Reifung und äußere Faktoren beeinflusst wird, ergeben sich teilweise einige Schnittstellen. Im Folgenden werden die einzelnen Kandidaten kurz beschrieben.

Cucumisin ist eine Subtilisin-ähnliche Serin-Protease (Subtilase), die in großen Mengen in den Früchten der Melone (*Cucumis melo* L.) exprimiert wird. Im Saft der Melonenfrucht macht Cucumisin über 10 % der gesamten Proteinmenge aus. Cucumisin ist als Vorstufe (Pro-Protein) bereits in unreifen Früchten präsent und wird im Laufe der Reifung *in vivo* gespalten, während seine proteolytische Aktivität über den gesamten Zeitraum erhalten bleibt. Cucumisin war die erste pflanzliche Protease der Subtilisin-Familie, deren Primärstruktur vollständig aufgeklärt wurde (Yamagata *et al.*, 1994). Es folgten weitere cDNA-Isolierungen Subtilisin-ähnlicher Serin-Proteasen aus Pflanzen. Sie werden mit zahlreichen physiologischen Prozessen, wie Stickstofffixierung, Microsporogenese oder Pathogenabwehr, in Verbindung gebracht, wobei die Regulation von Wachstum und Entwicklung der Pflanze die am besten aufgeklärte Funktion darstellt (Schaller, 2004). Serin-Proteasen besitzen eine „katalytische Triade“ aus einem Serin-, Histidin- und Asparaginsäurerest im aktiven Zentrum. Neben den Subtilasen stellen die Serin-Carboxypeptidasen eine weitere Untergruppe dar, die sich in der Proteinfaltung und der Position der „katalytischen Triade“ bei gleichbleibendem Reaktionsmechanismus von den Subtilasen unterscheiden. Zusätzlich zu ihrer hydrolytischen Aktivität konnte einigen Serin-Carboxypeptidasen eine Funktion als Acyl-Transferasen im Sekundärmetabolismus nachgewiesen werden, was anhand der Ähnlichkeit von Peptid- und Esterbindungen erklärt werden könnte (Stehle *et al.*, 2008; Schaller, 2004). Des Weiteren wurde Cucumisin (Cuc m 1) als Hauptallergen der Melonenfrucht identifiziert (Sankian *et al.*, 2011).

Expansine zählen zu den wichtigsten Regulatoren der Zellwandvergrößerung. Durch eine Auflockerung der Zellwand wird die Ausdehnung der Zelle aufgrund ihres Turgors ermöglicht (Cosgrove, 2000). Der Mechanismus scheint auf einer Dissoziation der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Cellulosefibrillen und quervernetzten Glycanen zu basieren, womöglich um Raum für Zellwand-degradierende Enzyme zu schaffen (Li *et al.*, 2003). Als Reaktion auf Trockenstress kommt es anhand einer erhöhten Expansinexpression in den Wurzeln zu einem vermehrten Wachstum (Wu *et al.*, 1996). Eine Beteiligung an weiteren Prozessen, wie Fruchterweichung, Abszission und Bestäubung, werden vermutet (Cosgrove, 2005). In Tomatenfrüchten (*Solanum lycopersicum*) führte die Überexpression eines Expansin-Gens zu einer weitläufigen Texturerweichung durch die Depolymerisierung von Pektin und

Hemicellulosen (Brummell *et al.*, 1999). Für verschiedene Expansine aus *F. × ananassa* (*FaEXPs*) ergaben sich reifekorrelierte Genexpressionen (Civello *et al.*, 1999; Harrison *et al.*, 2001). In komparativen Western- und Northern-Blot-Analysen von Erdbeersorten mit harten bzw. weichen Früchten erschienen Expansin-Gene mit einer erhöhten Genexpression in weichen Früchten (Salentijn *et al.*, 2003; Dotto *et al.*, 2006). Für ein rekombinantes Kohlenhydrat-bindendes Modul aus *FaEXP2* konnte die Bindung an Zellwandpolymere wie Cellulose, Pektin oder Xylan gezeigt werden (Nardi *et al.*, 2013).

Hothead-Proteine zählen zu den Oxidoreduktasen und spielen bei der Interaktion zwischen Epidermiszellen eine Rolle, z.B. beim Zusammenschluss des inneren Gewebes der Fruchtblätter während der Blütenentwicklung in *Arabidopsis thaliana* (Krolikowski *et al.*, 2003). Bei der Bildung extrazellulärer Matrixpolymere konnte einem Hothead-Gen eine entscheidende Beteiligung nachgewiesen werden. Offensichtlich katalysiert das Enzym die Oxidation langkettiger ω -Hydroxy- zu ω -Oxofettsäuren und beschreibt somit den nächsten Schritt nach der Cytochrom-P450-Fettsäure- ω -Hydroxylase. Als Endprodukte der ω -Oxidation werden langkettige α,ω -Dicarboxyfettsäuren geformt, die durch Quervernetzung zum Aufbau großer Netzwerke beitragen und einen wesentlichen Bestandteil der Cuticula ausmachen. Eine hohe Genexpression in Wurzeln, die keine Polyester membran ausbilden, lässt auf eine generelle Beteiligung beim Aufbau epidermaler Zellwände schließen (Kurdyukov *et al.*, 2006). Eine intensiv diskutierte Untersuchung an Hothead-Mutanten von *A. thaliana* zeigte, dass eine Veränderung des Gens zu Unregelmäßigkeiten bei der Vererbung führte (Lolle *et al.*, 2005). So wurde genetisches Material erworben, welches nicht im Genom der Eltern, aber in früheren Generationen anwesend war. Die Information könnte womöglich in einem externen Pool außerhalb des Genoms gespeichert werden, etwa in Form von doppelsträngiger RNA. Ein ähnlicher Mechanismus könnte bei genetischen Mutationen aufgrund von Stress durch Umwelteinflüsse oder Pathogenbefall zugrunde liegen (Henikoff, 2005).

Spidroine sind hoch repetitive, Glycin- und Alanin-reiche Strukturproteine aus den Fasern der Spinnenseide (Xu und Lewis, 1990). Der wechselnde Anteil aus kristallinen und amorphen Domänen macht sie sowohl zugfest als auch elastisch (Guerette *et al.*, 1996). Spidroin-Homologe wurden in Pflanzen bisher nicht untersucht.

Korrelierend mit den Expressionsmustern der bekannten *Senescence Associated Genes SAG2* und *SAG4* aus *A. thaliana* (Hensel *et al.*, 1993) wird das *Senescence Related Gene 1 (SRG1)* vermehrt während der Organseneszenz exprimiert (Callard *et al.*, 1996). Das codierte Protein gehört der Superfamilie der Fe(II)/2-Oxoglutarat-abhängigen Oxidoreduktasen (2-ODD) an. Weitere

Mitglieder dieser Gruppe an Dioxygenasen sind die Flavanon-3-Hydroxyltransferase (FHT), die Flavonol-Synthase (FLS), die Flavon-Synthase I (FNS I) und die Anthocyanidin-Synthase (ANS) (Winkel-Shirley, 2001). Sie katalysieren die Oxidation von Intermediaten des Flavonoidstoffwechsels in *F. × ananassa* (Almeida *et al.*, 2007).

Das Tasselseed-2-Gen (*TS2*) spielt eine entscheidende Rolle bei der Abstoßung des Gynoeceums im Laufe der Geschlechtsbestimmung in Mais (*Zea mays*). Der Mechanismus könnte entweder durch die Inaktivierung essentieller Wachstumsfaktoren oder durch die aktive Produktion einer Substanz, die zum Zelltod führt, erklärt werden (DeLong *et al.*, 1993). *TS2* codiert eine kurzkettige Alkohol-Dehydrogenase/Reduktase mit einem großen Aufgabenspektrum. Die biochemische Charakterisierung belegte eine spezifische Aktivität als 3 β - und 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase und Carbonyl-/Chinon-Reduktase. Ähnlich der in Säugern vorkommenden Hydroxysteroid-Dehydrogenasen könnte *TS2* wichtige Funktionen in der metabolischen Aktivierung von Hormonvorstufen und somit der Regulation von Entwicklung, Immunantwort und Stoffwechsel einnehmen (Wu *et al.*, 2007; Nobel *et al.*, 2001).

Die Genfamilie der GDSL-Lipasen zeichnet sich durch ein spezifisches Motiv aus Glycin (G), Asparaginsäure (D), Serin (S) und Leucin (L) nahe dem N-Terminus aus, wobei Serin als nucleophiler Angriffspunkt im aktiven Zentrum dient (Lee *et al.*, 2009). Ihre Funktionen *in planta* konnten bisher nur für wenige Mitglieder gezeigt werden. Die große Anzahl an GDSL-Lipasen in Pflanzen lässt jedoch wichtige Aufgaben vermuten. Neben der Beteiligung an diversen Pflanzenschutzmechanismen bei biotischem und abiotischem Stress sind GDSL-Lipasen scheinbar an der hormonellen Regulierung von Wachstumsprozessen und dem Metabolismus von Cutin und Wachsen in der Cuticula involviert (Volokita *et al.*, 2011). Eine GDSL-Lipase mit Acyltransferase-Aktivität konnte kürzlich im Phenylpropanstoffwechsel der Tomate (*Solanum lycopersicum*) nachgewiesen werden (Teutschbein *et al.*, 2010).

Small Heat Shock Proteins (sHsps) stellen eine Untergruppe der Hitzeschockproteine dar. Sie werden ubiquitär in pro- und eukaryotischen Zellen als Reaktion auf Hitze produziert und sollen der Aggregation denaturierter Proteine entgegenwirken (Lindquist und Craig, 1988). Die Funktion als Chaperone zur Aufrechterhaltung oder Rekonstitution der korrekten Faltung anderer Proteine wird durch *in vitro* und *in vivo* Versuche gestützt (Lee *et al.*, 1997). Eine vermehrte Genexpression von *sHsps* zeigt sich auch unter anderen umweltbedingten Stresseinflüssen, was auf ihre wichtige Rolle in der Stresstoleranz hinweist. Trotz ihrer ausgeprägten Diversität weisen sHsps der gleichen Klasse hohe Homologien zwischen verschiedenen Pflanzenspecies auf (Sun *et al.*, 2002). Die Beteiligung von sHsps an bestimmten

Entwicklungsphasen konnte u.a. für ein *sHsp5*-Homologes der Klasse I in *F. × ananassa* dargelegt werden. In den Früchten erreichte die Genexpression ihr Maximum im weißen Stadium, wenn die Fruchtgröße beinahe erreicht ist und die entscheidenden, metabolischen Änderungen zur Ausbildung von Farbe, Aroma und Textur einsetzen (Medina-Escobar *et al.*, 1998).

Acyl-CoA-bindende Proteine (ACBPs) sind in allen Eukaryonten vertreten und kommen in sechs Isoformen (10 – 75 kDa) in *A. thaliana* vor. Sie binden mittel- bis langkettige Acyl-CoA-Ester (C_{12} – C_{22}) und sind als Regulatoren des intrazellulären Transports von Acyl-CoA-Estern an der Biosynthese von Fettsäuren und transmembranen Phospholipiden beteiligt. Während *ACBP3* für ein extrazellulär-gerichtetes Protein codiert, liegen *ACBP1* und *2* Membran-assoziiert und *ACBP4* – *6* im Cytosol vor (Xiao *et al.*, 2008; Burton *et al.*, 2005). Neben der konservierten Acyl-CoA-Domäne weisen *ACBP4* und *ACBP5* fünf *kelch*-Motive auf (**Abb. 55**), die zur Ausbildung einer speziell auf Protein-Protein-Interaktion ausgelegten Tertiärstruktur führen (Leung *et al.*, 2004; Adams *et al.*, 2000). Möglich wäre eine Andockung von Enzymen, die Acyl-CoA-Ester als Substrate nutzen. ACBPs tragen zur Entwicklung der Cuticula und anderen Abwehrmechanismen gegenüber Pathogenen bei (Xia *et al.*, 2012).

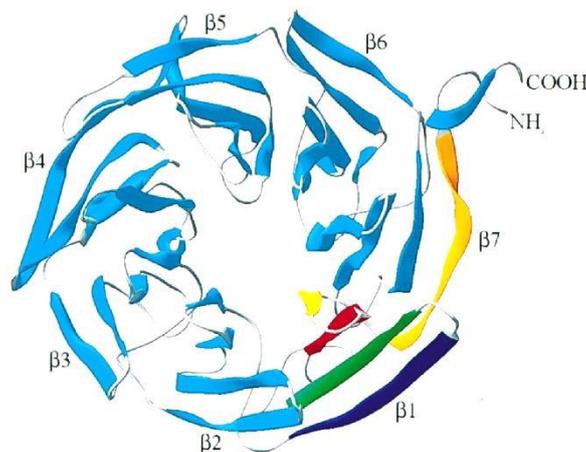


Abb. 55: Tertiärstruktur der Galactose-Oxidase aus *Hypomyces rosellus* als Beispiel für ein Protein mit sieben *kelch*-Motiven (β_{1-7}), die einen β -Propeller formen (aus Adams *et al.*, 2000). Vier anti-parallele β -Faltblatt-Stränge ergeben ein *kelch*-Motiv. Die Acyl-CoA-bindenden Proteine 4 und 5 enthalten jeweils fünf *kelch*-Motive. Das Vorhandensein von *kelch*-Motiven lässt eine Protein-Protein-Interaktion vermuten.

Ephrine sind Membran-gebundene Liganden der Familie der Eph Rezeptor Tyrosin-Kinasen und spielen als extrazelluläre Signalmoleküle eine entscheidende Rolle in der Zellorganisation und Entwicklung des Nervensystems. Ephrine des Typs A sind über eine Glycosyl-phosphatidylinositol-Einheit (GPI) an der Membran verankert, während Typ B Ephrine eine transmembrane Domäne aufweisen (Flanagan und Vanderhaeghen, 1998). Beide Typen besitzen eine

konservierte, Cystein-reiche Region von etwa 125 Aminosäuren. Innerhalb dieser Region beschreibt die extrazelluläre Domäne (Ektodomäne) des Ephrins B-2 eine β -Fass-Struktur bestehend aus acht β -Faltblättern, welche eine große Ähnlichkeit mit der Tertiärstruktur von pflanzlichen Nodulinen und Phytocyaninen aufweist (Toth *et al.*, 2001).

ATHB-15 aus *A. thaliana* verfügt über eine DNA-bindende Region (Homöodomäne) mit Leucin-Reißverschluss (*leucine zipper*) und ist als Transkriptionsfaktor regulierend an der Zelldifferenzierung zur Entwicklung vaskulären Gewebes beteiligt (Ohashi-Itu und Fukuda, 2003). Die Expression von *ATHB-15* geschieht spezifisch in prokambialen Zellen, aus denen die Leitbündel hervorgehen, und wird scheinbar durch die microRNAs (miR) miR165 und miR166 gesteuert (Williams *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2007). Ein Kontrollmechanismus durch Bindung von miRNA an mRNA wird vermutet, da die zu miR165/166 komplementäre Sequenz in der mRNA von *ATHB-15* in verschiedenen Pflanzenspecies konserviert auftritt (Kim *et al.*, 2005).

Die Ubiquitin Carboxy-terminale Hydrolase (UCH) katalysiert die Abspaltung von Polypeptiden, die kovalent am C-terminalen Glycinrest des Ubiquitins gebunden sind (Yan *et al.*, 2000). Ubiquitin ist ein Molekül aus 76 Aminosäuren (8,5 kDa) und wird als Signalgeber an Zielproteine geheftet, die anschließend durch das 26S Proteasom, eine 2 MDa große Protease-Einheit, erkannt und hydrolytisch gespalten werden. Neben der Erhaltung des Gleichgewichts zwischen Anabolismus und Katabolismus spielt die Degradation kurzlebiger und abnormaler Proteine eine wichtige Rolle beim Wachstum, der Entwicklung, der Stressreaktion sowie der Anpassung an Umwelteinflüsse (Smalle und Vierstra, 2004). Durch die hydrolytische Aktivität der UCH wird monomeres Ubiquitin zurückgewonnen und kann wiederverwertet werden.

Defensine sind Cystein-reiche, kationische Peptide (ca. 5 kDa), die zu einer großen Superfamilie von antimikrobiellen Peptiden gehören. Trotz einer hohen Variabilität in der Aminosäuresequenz weisen Defensine eine stark konservierte Sekundär- und Tertiärstruktur auf, bestehend aus einem drei-strängigen β -Faltblatt mit einer parallelen α -Helix (Gachomo *et al.*, 2012). Sie werden ubiquitär in Eukaryonten gefunden und dienen der Pathogenabwehr, vermutlich indem sie mit den negativ geladenen Köpfen der Phospholipide in der Zellmembran interagieren (Thomma *et al.*, 2002). Defensine übernehmen zahlreiche weitere Funktionen, wie die Hemmung der Proteinsynthese, der α -Amylase oder der Ionenkanalfunktion. Aufgrund ihrer Diversität, weitreichenden Verbreitung und hohen physikalisch-chemischen Resistenz stellen Defensine eine vielversprechende Gruppe von großer biotechnologischer und pharmazeutischer Relevanz dar (Oliveira Carvalho und Moreira Gomes, 2011).

4.7. PRX27

Peroxidasen (EC 1.11.1.X) sind Oxidoreduktasen mit einer Vielzahl an physiologischen Funktionen. Durch die Reduktion von Wasserstoffperoxid zu Wasser katalysieren sie die Oxidation verschiedenster Substrate (Veitch, 2004a):



Mögliche Elektronen-Donormoleküle sind Ligninvorstufen und andere phenolische Substanzen. Neben dem etablierten, peroxidativen Zyklus (s. Gleichung und **Abb. 56**, S. 152) scheint für Peroxidasen ein weiterer Mechanismus, der zur Bildung freier Hydroxylradikale und anderer reaktiver Sauerstoffspezies führt, zu existieren (Liszka *et al.*, 2003).

Häm-Peroxidasen weisen eine große Ähnlichkeit in ihrer dreidimensionalen Struktur auf und tragen einen Eisenkern (Fe(III) im Grundzustand) komplexiert in einem Protoporphyrin IX-Ring im aktiven Zentrum. Das Eisenatom wird durch einen proximalen Histidinrest stabilisiert, während die sechste Koordinationsstelle (distale Position) für den Austausch mit Liganden frei bleibt und von Arginin, Phenylalanin und Histidin umrandet wird. Wie Röntgenkristallstrukturanalysen demonstrierten, wird die Substratspezifität von Peroxidasen ferner von einem Prolinrest beeinflusst, dessen Carbonylgruppe eine Wasserstoffbrückenbindung mit den Substraten ausbildet. Peroxidasen besitzen zwei Ca^{2+} -Bindungsstellen (Veitch, 2004b).

Klasse III Peroxidasen (EC 1.11.1.7) kommen in einer großen Anzahl im Pflanzenreich vor. In *A. thaliana* sind 73, in Reis (*Oryza sativa*) 138 und in *F. vesca* 84 putative Peroxidase-Gene annotiert, wobei ein Vergleich sequenzierter Pflanzengenome zeigte, dass in den Genomen von *F. vesca* und *A. thaliana* die kleinste Anzahl an Häm-Peroxidasen prognostiziert wurde (Mathé *et al.*, 2010; <http://supfam.org/superfamily>). Die große Menge an Annotationen im Reisgenom lässt sich vermutlich auf diverse Duplikationsvorgänge zurückführen (Passardi *et al.*, 2004). Die konkreten Funktionen der meisten Gene bleiben unerschlossen (Marjamaa *et al.*, 2009). Die große Variabilität in der Aminosäure-Sequenz in Verbindung mit den hoch konservierten Regionen lässt auf eine Spezialisierung der verschiedenen PRXs schließen (Veitch, 2004a; Cosio und Dunand, 2009).

Während die Kompensation und Entgiftung von Peroxiden in erster Linie durch intrazelluläre Klasse I Peroxidasen, wie die Ascorbat-Peroxidase, realisiert werden (Veitch, 2004b), werden die Klasse III Peroxidasen, deren bekanntester Vertreter die Meerrettich-Peroxidase darstellt, aufgrund ihrer großen Anzahl an Genen und den zwei möglichen Katalyse-Mechanismen mit

einer Vielfalt an zusätzlichen Aufgaben in Verbindung gebracht. Aufgrund ihrer Beteiligung am Zellwandmetabolismus sind sie beim Zellwachstum, der Zellwanddifferenzierung, der Wundheilung und der Abwehr gegenüber Pathogenen, Insekten und schädigenden Umwelteinflüssen involviert (Mathé *et al.*, 2010). Im Speziellen beinhaltet ihre katalytische Funktion den oxidativen Auxin-Katabolismus, die Polymerisation von Lignin- und Suberineinheiten, die Quervernetzung von Zellwandpolysacchariden durch Verknüpfung Polysaccharid-gebundener Ferulasäure, die Ausbildung von Isodityrosin-Brücken in Strukturproteinen und die Produktion freier Hydroxylradikale mit der Fähigkeit Zellwandpolymere im Rahmen der Zellexpansion aufzuspalten oder hypersensitive Reaktionen (kontrollierter Zelltod bei Infektionen) zu bewirken (Marjamaa *et al.*, 2009; Cosio und Dunand, 2009). Klasse III Peroxidasen wirken demnach nicht nur präventiv durch die Bildung fester Strukturen und schützender Polymerfilme, sondern auch in der Reaktion auf biotischen und abiotischen Stress. Ebenso erlaubt die große Anzahl an Isoformen ein ausgewogenes Gleichgewicht zwischen antagonistischen Funktionen der Peroxidasen, wie die Quervernetzung und die Lockerung der Zellwände (Passardi *et al.*, 2005; Cosgrove, 2005).

Peroxidasen (PRXs) der Klasse I sind prokaryotischen Ursprungs und weit verbreitet, während PRXs der Klasse II nur in Pilzen exprimiert werden (Gajhede, 2001). Klasse III PRXs kommen ausschließlich in Landpflanzen vor und werden daher klassischerweise mit der Lignifizierung in Verbindung gebracht (Marjamaa *et al.*, 2009). Dieser Prozess beschreibt die Stärkung der Zellwand durch Einlagerungen von Lignin während der Gewebedifferenzierung. In *A. thaliana* wurden anhand vieler Studien verschiedene PRX-Gene (*AtPRX13*, *AtPRX17*, *AtPRX30*, *AtPRX42*, *AtPRX53*, *AtPRX55*, *AtPRX64*, *AtPRX66* und *AtPRX71*) mit der Lignifizierung bestimmten Gewebes verknüpft, *AtPRX27*, mit dem *FaPRX27* die größte Ähnlichkeit besitzt, tauchte jedoch nicht unter ihnen auf (Cosio und Dunand, 2009). Während manche PRXs nur in speziellen Organen exprimiert werden, scheinen andere in der gesamten Pflanze oder gezielt in lignifizierendem Gewebe zu agieren (Valério *et al.*, 2004). Analog zu dem Expressionsmuster von *AtPRX27* konnten Transkripte von *FaPRX27* ausschließlich in Wurzeln und Früchten gefunden werden.

Der Beitrag von Klasse III PRXs zur Ligninbiosynthese wurde auch in anderen Pflanzenspecies, wie Tabak (*Nicotiana tabacum*), Tomate (*Solanum lycopersicum*), *Zinnia elegans* oder Meerrettich (*Armoracia rusticana*), sowie in nackt- und bedecktsamigen Baumarten untersucht, wobei die meisten dieser Studien auf einer Ermittlung von PRX-Enzymen basierten, die sowohl die entsprechenden katalytischen Eigenschaften als auch ihre Genexpression bzw. die Lokalisierung der Proteine in lignifizierendem Gewebe aufwiesen (Marjamaa *et al.*, 2009). Nur wenige Versuche

mit transgenen Pflanzen oder Mutanten sind bekannt, in denen eine Modifikation der PRX-Expression konsequent zu einem veränderten Muster in der Lignifizierung führte, was vermutlich an der großen Anzahl an Genen und möglicher funktionaler Redundanzen der PRXs liegen könnte (Mansouri *et al.*, 1999; Passardi *et al.*, 2005).

FaPRX27 (35,1 kDa) besteht aus 329 Aminosäuren (AS) und beschreibt klassische Charakteristika einer PRX der Klasse III (Sequenz s. Anhang **Abb. 59**; Veitch, 2004a). Das Protein besitzt einen berechneten pI von 8,47 und entsprechende Aminosäuresequenzen für ein Signalpeptid für den Sekretionsweg (AS 1 – 26), eine Transmembran-Region (AS 7 – 29), sechs N-Glycosylierungsstellen (AS 82 – 87, 95 – 100, 151 – 156, 168 – 173, 209 – 214, 216 – 221) und mögliche Phosphorylierungsstellen (<http://elm.eu.org/search>; Dinkel *et al.*, 2011). Für viele Klasse III PRXs wurden mit diversen Prognoseprogrammen, wie Phobius, SignalP oder Pred-TMR, neben spaltbaren N-terminalen Signalpeptiden auch transmembrane Regionen berechnet. Die meisten der putativ Membran-gebundenen PRXs werden als Sekretionsproteine vermutet. Neben den Funktionen beim Transport und der Signaltransduktion ist die Plasmamembran der erste Angriffspunkt von Stressfaktoren, wie Pathogenen, Schwermetallen oder UV-Strahlung. Im Gegensatz zu Membran-gebundenen Klasse I PRXs sind Klasse III PRXs stress- und entwicklungsreguliert, was deren wichtige Rolle im Membranschutz verdeutlicht (Lüthje *et al.*, 2011). An Glycosylierungsstellen können Glycane angebunden werden, um das Protein zu stabilisieren und aufgrund ihrer Größe den Substratzugang zur PRX zu regulieren (Mathé *et al.*, 2010).

Die Hauptmerkmale des aktiven Zentrums sind in der Sequenz von FaPRX27 komplett konserviert, so wie sie in der dreidimensionalen Struktur der Meerrettich-Peroxidase (ArPrxC) identifiziert wurden. Arg65, Phe68, His69 und Asn96 koordinieren die distale Bindungsstelle des Eisenkerns, während His169 die proximale Position einnimmt (**Abb. 56**). Zusätzlich steuert Pro164 die Substratspezifität durch Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung mit den reduzierenden Substraten.

Die proximalen (Thr195 und Asp247) und distalen (Asp70, Gly75, Asp77, Ser79) Ca²⁺-Bindungsstellen sind ebenfalls erhalten. Die Aminosäurereste 70 – 97 beeinflussen die Aktivität pflanzlicher Peroxidasen, da Asn96 über eine Wasserstoffbrückenbindung His69 in der distalen Position des aktiven Zentrums stabilisiert und den pK_s-Wert dieser Aminosäure reguliert. Im gleichen Netzwerk von Wasserstoffbrücken wirken außerdem ein konserviertes Glu93 und das distale Ca²⁺-Ion (Cosio und Dunand, 2009). Acht der neun Cysteinreste in FaPRX27 kommen in konservierten Positionen vor, übereinstimmend mit der potentiellen Ausbildung von vier Disulfidbrücken (Veitch, 2004a).

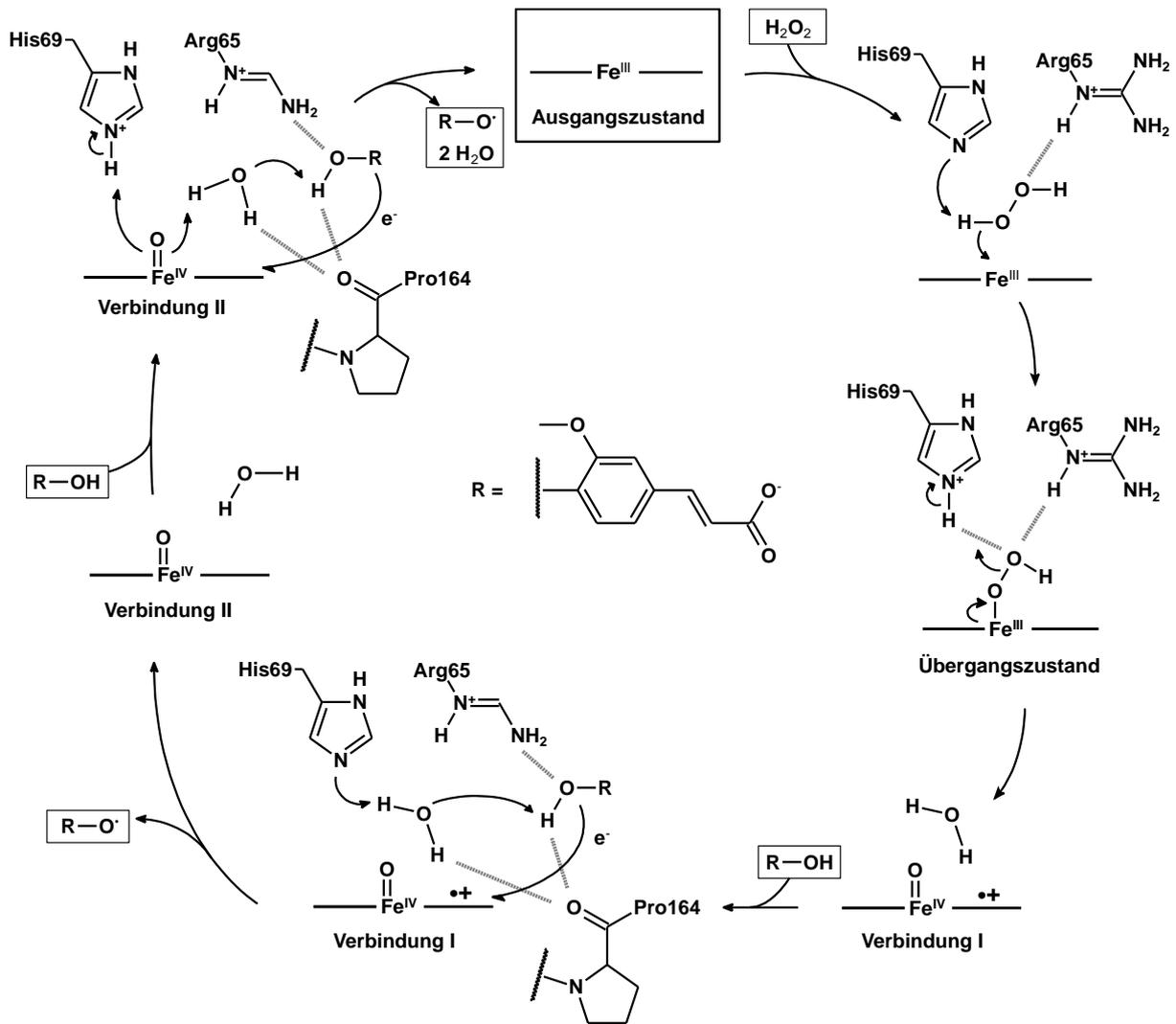


Abb. 56: Schema des peroxidativen Zyklus von FaPRX27 mit Ferulasäure (R) als reduzierendem Substrat, abgeleitet von dem Mechanismus der Meerrettich-Peroxidase Isoform C (ArPrxC) (nach Poulus und Kraut, 1980; Henriksen *et al.*, 1999; Mathé *et al.*, 2010).

Während die Anzahl und Länge der Introns zwischen Paralogen und Orthologen von Klasse III PRXs stark variieren, sind die Positionen und Phasen der Introns bemerkenswert konserviert. Demnach scheint die Expansion der Genfamilie in manchen pflanzlichen Abstammungen zu einem Verlust oder Zuwachs an Introns geführt zu haben (Mathé *et al.*, 2010). Passend zum klassischen Muster der Klasse III PRXs wird die codierende Sequenz von FaPRX27 an drei konservierten Stellen von Introns unterbrochen (s. Anhang **Abb. 60**).

Die Rolle von FaPRX27 in der Ligninbiosynthese konnte durch Enzymassays bestätigt werden. In Anwesenheit von H₂O₂ katalysierte FaPRX27 die Bildung entsprechender Dehydromere aus den Monolignolen Ferulasäure, Coniferylalkohol und Kaffeesäure. Die enzymatische Produktion von Ferulasäure-Dimeren durch pflanzliche Peroxidasen wurde bereits umfassend *in vitro* und *in vivo* untersucht (Ward *et al.*, 2001). Aufgrund der Stabilisierung des Radikals im konjugierten

System kommt es zu vielen verschiedenen Regioisomeren. Bevorzugt entstehen Radikalkopplungen an den Positionen 8 und 4-O. Im Enzymassay von FaPRX27 mit Ferulasäure als Substrat konnten mind. sieben Produkte gefunden werden. Dazu gehörten auch Decarboxylierungsprodukte von Dehydrodimeren (**Abb. 57**).

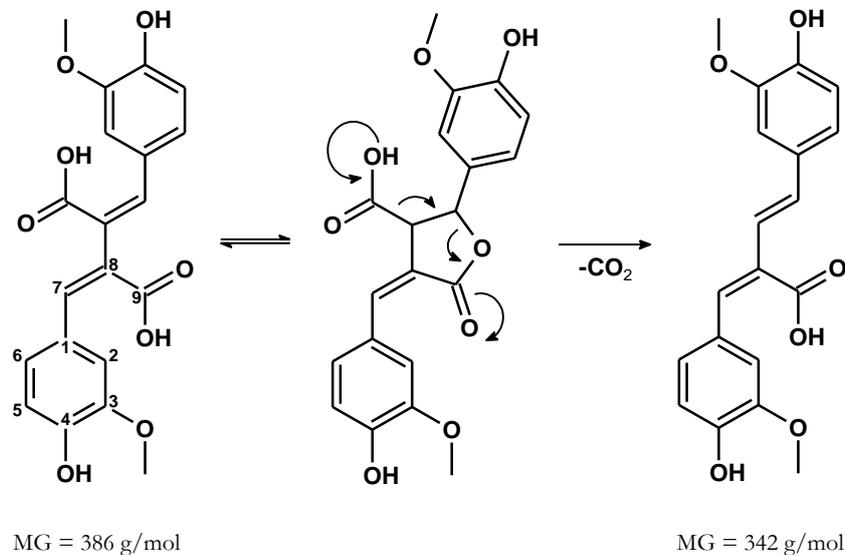


Abb. 57: Putativer Mechanismus der Decarboxylierung eines Dehydrodimeren von Ferulasäure (MG = 386 g/mol) über die Tautomerisierung zum Lacton, abgeleitet von Ward *et al.* (2001).

Die Dimerisierung dient der Quervernetzung von Strukturpolymeren, um Zellwänden Stabilität und Widerstandskraft zu verleihen. Je nach Vorstufe werden die in das Lignin-Polymer eingebauten Segmente als 4-Hydroxyphenyl-(H)-Einheit (aus *p*-Cumarylalkohol), Guajacyl-(G)-Einheit (aus Coniferylalkohol) oder Syringyl-(S)-Einheit (aus Sinapylalkohol) bezeichnet. Lignin dicotyler Bedecktsamer enthält vorwiegend G- und S-Einheiten (Vanholme *et al.*, 2010). In Erdbeerfrüchten wird Lignin hauptsächlich in Nüsschen und Leitbündeln akkumuliert (Suutarinen *et al.*, 1998).

Die Festigkeit von Erdbeerfrüchten wird hauptsächlich durch Pektine, Cellulose und Hemicellulosen bestimmt und ist ein wichtiges ökonomisches Merkmal, da sie die Haltbarkeit und Lagerbeständigkeit bestimmt (Huber, 1984). Obwohl die Zusammensetzung der Zellwände in Erdbeerfrüchten seit Langem untersucht wird (Wade, 1964), sind die konkreten chemischen Vorgänge der Texturerweichung größtenteils ungeklärt. In vielen Fällen korrelierte eine Reduktion der Fruchtfestigkeit mit hohen Transkriptmengen von Pektin-Methylesterasen (PME), Pektat-Lyasen (PL), Polygalacturonidasen (PG), Endo-1,4- β -Glucanasen (EG), β -Xylanasen (β -Xyl) und β -Galactosidasen (β -Gal), was die entscheidende Rolle von Pektinen, Cellulose und Hemicellulosen für die Strukturbildung in Erdbeerfrüchten bestätigte (Goulao und Oliveria,

2008). Demgegenüber steht der Zusammenhang zwischen einer Zunahme an Fruchtfestigkeit und einer erhöhten PME-Aktivität, die gemeinsam mit einer vermehrten Zellwandinlagerung von Ca^{2+} -Ionen beobachtet werden konnte, was auf eine gesteigerte Ausbildung von Ca^{2+} -Brücken zwischen den frei gewordenen Carboxylgruppen der Polymerstränge schließen ließ (Goto *et al.*, 1996). Ein weiterer Einfluss auf Kohlenhydrat-Polymere in Zellwänden geht von Expansinen (EXP) aus, deren Genexpression stets mit einer Fruchterweichung korrelierte (Dotto *et al.*, 2006; Salentijn *et al.*, 2003; Brummell *et al.*, 1999).

In vergleichenden Microarray-Analysen verschiedener Erdbeersorten, deren Früchte sich in ihrer Festigkeit unterschieden, zeigten interessanterweise zwei Enzyme des Ligninstoffwechsels die höchsten Unterschiede an Transkriptmengen. Zwar reicherten weiche Früchte auch leicht erhöhte Mengen an *PMEs*, *PGs* und *EXPs* an, für Zimtsäure-CoA-Reduktase (*CCR*) und Zimtalkohol-Dehydrogenase (*CAD*) ergaben sich jedoch wesentlich größere Unterschiede. Weiche Früchte akkumulierten demnach große Mengen an *CCR*, während *CAD*-mRNA in verringertem Maße gebildet wurde (Salentijn *et al.*, 2003; Carbone *et al.*, 2006). Der gegensätzliche Zusammenhang zwischen *CCR*-Transkripten und Fruchtfestigkeit lässt sich schwer erklären, zumal keine Bestimmung des Ligningehalts oder der -komposition durchgeführt wurde. Da *CCR* und *CAD* direkt aufeinanderfolgende Reaktionen in der Ligninbiosynthese katalysieren (**Abb. 5**, S. 12), könnte die Kombination aus erhöhter *CCR*- und verringerter *CAD*-Expression zu einer Akkumulation von Phenylpropanaldehyden und folglich zu einem vermehrten Einbau von Aldehyd-Fragmenten in das Ligningerüst führen. Eine genetische Manipulation von *CAD* oder *CCR* hatte in vielen Fällen keine beeinträchtigenden Auswirkungen auf das Wachstum und die Entwicklung der Pflanzen (Whetten *et al.*, 1998; Humphreys und Chapple, 2002), obgleich vereinzelt eine Lignin-Reduktion beobachtet werden konnte (Chabannes *et al.*, 2001). Meist wurde jedoch die Zusammensetzung und nicht der Gesamtgehalt des Ligninpolymers beeinflusst, was die wichtige Rolle der Peroxidasen verdeutlicht. PRXs nutzen verschiedene Substrate, wie Phenylpropansäuren, -aldehyde oder -alkohole (Ward *et al.*, 2001; Russell *et al.*, 2000), zur Ausbildung eines polymeren Netzwerks und steuern somit den entscheidenden Schritt zur Strukturbildung bei. Wie in *CAD*-defizitären Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum*) angedeutet, könnte jedoch trotz gleichbleibender Menge an Lignin ein Aldehyd-angereichertes Gerüst durch eine Abnahme der kondensierten Quervernetzungen geschwächt werden (Halpin *et al.*, 1994). Eine positive Korrelation zwischen Fruchtfestigkeit, Ligningehalt und der Enzymaktivitäten von *CAD* und *PRX* zeigte sich in nachreifenden Loquat (*Eriobotrya japonica*)-Früchten (Cai *et al.*, 2006).

Die transiente Herabregulation von *FaCCR* und *FaCAD* in Erdbeerfrüchten mittels *Agrobacterium tumefaciens*, führte trotz verminderter Genexpression (1 – 3 % der Expression im Wildtyp bzw. der

mit einem Kontrollkonstrukt infizierten Früchte) und verminderter Enzymaktivität zu einem erhöhten Ligningehalt und erhöhter Festigkeit (Yeh, 2012). Simultan wurde eine erhöhte Expression von *FaPRX27* beobachtet, scheinbar als Reaktion auf Pathogenbefall. Somit ergibt sich für *FaPRX27* ebenfalls ein direkter Zusammenhang zwischen Expression, Ligningehalt und Fruchtfestigkeit.

Die QTL-Analyse ergab die Lokalisierung von *FaPRX27* in einer Region, die mit der Abnahme der Intensität der Fruchtfarbe verknüpft ist (**Abb. 34**, S. 103). Dies bestätigt *FaPRX27* als funktionale Ligninperoxidase, die *in planta* in der Polymerisierung löslicher Phenolkomponenten involviert ist. *FaPRX27* konkurriert mit Enzymen des Flavonoid- und Anthocyanstoffwechsels um die gemeinsamen Substrate und bestimmt somit die Intensität der roten Fruchtfarbe. Cumaryl-CoA beschreibt die Schnittstelle zwischen Flavonoid- und Ligninmetabolismus, da es als Vorstufe sowohl für Flavonoide als auch für Monolignole dient. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Sorten mit hohen *FaPRX27*-Expressionsraten nur geringe Gehalte an löslichen Polyphenolen, aber höhere Konzentrationen an Lignin aufwiesen, als Sorten mit geringen *FaPRX27*-Transkriptmengen. Damit übereinstimmend bewirkte die Überexpression einer basischen Peroxidase (*SIIRX1*) in Tomaten (*Solanum lycopersicum*) eine Zunahme des Ligningehalts um 40 – 220 % in den Blättern transgener Pflanzen (Mansouri *et al.*, 1999). In *A. thaliana* führte die Herabregulation der Hydroxycinnamoyl-CoA Shikimisäure/Chinasäure Hydroxycinnamoyl Transferase (*HCT*), die an den Reaktionen von Cumaryl-CoA zu Kaffeeyl-CoA beteiligt ist, zu einer Unterdrückung der Ligninbiosynthese und folglich einer Umleitung des metabolischen Flusses zur Produktion von Flavonoiden (Besseau *et al.*, 2007). Ebenso resultierte die simultane Herabregulation von *CAD c*, *CAD d* und *CCR1* in einer Umlenkung des Substratflusses zu höheren Flavonoid- und reduzierten Ligningehalten in *A. thaliana* (Thévenin *et al.*, 2011). Die Überexpression des R2R3-MYB-Faktors *ZmMYB31* aus Mais (*Zea mays*) in *A. thaliana* beeinträchtigte die Ligninbiosynthese und förderte die Bildung von Anthocyanen (Fornalé *et al.*, 2010).

4.8. Schlussfolgerung

Anhand der Metabolit-Analysen verschiedener *F. × ananassa* Genotypen konnte die Konkurrenz einzelner Biosyntheseweige um Kohlenstoffressourcen aufgezeigt werden. Die Manipulation bestimmter Substanzen durch Umlenkung des Substratflusses zwischen verschiedenen Stoffwechselwegen scheint demnach in Züchtungsprogrammen einfacher umzusetzen zu sein, als eine Erhöhung der gesamten Biomasse vornehmen zu können. Die Analyse mehrerer aufeinander folgender Jahrgänge bekräftigte den entscheidenden Einfluss des Genotyps auf die

Polyphenolbiosynthese und somit das grundlegende Potential einer erfolgreichen Züchtung, wenn auch äußere Faktoren eine Rolle spielen.

Die Kombination von *Metabolite Profiling* mit komparativen Transkriptom-Analysen deckte neuartige Kandidatengene auf, die die Akkumulation von Flavonoiden und Anthocyanen in Erdbeerfrüchten beeinflussen können. Unter den signifikantesten Kandidaten erschienen interessanterweise weder Strukturgene noch bekannte Transkriptionsfaktoren der Polyphenolbiosynthese. Die Mehrheit der Gene wurde bisher nicht mit dem Sekundärmetabolismus in Verbindung gebracht, sondern vielmehr nur in bestimmten Entwicklungsphasen und Reaktionen auf biotischen oder abiotischen Stress vermutet. Ein putatives Peroxidase-Gen wurde eingehender untersucht, um die Aussagekraft des Untersuchungsansatzes zu überprüfen. *FaPRX27* codiert eine funktionale Peroxidase, die an der Polymerisierung phenylpropanoider Substrate in reifenden Erdbeerfrüchten beteiligt ist und folglich mit den Enzymen der Flavonoidbiosynthese um die gemeinsamen Vorstufen konkurriert. *FaPRX27* könnte daher eine Schlüsselrolle in der Direktion des metabolischen Substratflusses zwischen löslichen und unlöslichen Polyphenolen einnehmen, wodurch Züchtungsprogrammen eine Verbesserung des ernährungsphysiologischen Potentials in Erdbeerfrüchten ermöglicht wird.

5. Literatur

Aaby K, Ekeberg D, Skrede G (2007) Characterization of phenolic compounds in strawberry (*Fragaria × ananassa*) fruits by different HPLC detectors and contribution of individual compounds to total antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**:4395–4406.

Abeles FB, Takeda F (1990) Cellulase activity and ethylene in ripening strawberry and apple fruits. *Scientia Horticulturae* **42**:269–275.

Abeynayake SW, Panter S, Chapman R, Webster T, Rochfort S, Mouradov A, Spangenberg G (2012) Biosynthesis of proanthocyanidins in white clover flowers: Cross talk within the flavonoid pathway. *Plant Physiology* **158**:666–678.

Adams J, Kelso R, Cooley L (2000) The kelch repeat superfamily of proteins: propellers of cell function. *Trends in Cell Biology* **10**:17–24.

Agati G, Tattini M (2010) Multiple functional roles of flavonoids in photoprotection. *The New Phytologist* **186**:786–793.

Aharoni A, Keizer LC, Bouwmeester HJ, Sun Z, Alvarez-Huerta M, Verhoeven HA, Blaas J, Van Houwelingen AM, De Vos RC, Van der Voet H, Jansen RC, Guis M, Mol J, Davis RW, Schena M, Van Tunen AJ, O'Connell AP (2000) Identification of the *SAAT* gene involved in strawberry flavor biogenesis by use of DNA microarrays. *The Plant Cell* **12**:647–661.

Aharoni A, Keizer LCP, Broeck HC Van Den, Blanco-Portales R, Muñoz-Blanco J, Bois G, Smit P, De Vos RCH, O'Connell AP (2002) Novel insight into vascular, stress, and auxin-dependent and -independent gene expression programs in strawberry, a non-climacteric fruit. *Plant Physiology* **129**:1019–1031.

Aharoni A, De Vos RCH, Wein M, Sun Z, Greco R, Kroon A, Mol JNM, Connell APO (2001) The strawberry *FaMYB1* transcription factor suppresses anthocyanin and flavonol accumulation in transgenic tobacco. *The Plant Journal* **28**:319–332.

Aiyer HS, Vadhanam M V, Stoyanova R, Caprio GD, Clapper ML, Gupta RC (2008) Dietary berries and ellagic acid prevent oxidative DNA damage and modulate expression of DNA repair genes. *International Journal of Molecular Sciences* **9**:327–341.

Allan A, Hellens R, Laing W (2008) MYB transcription factors that colour our fruit. *Trends in Plant Science* **13**:99–102.

Almeida J, D'Amico E, Preuß A, Carbone F, De Vos RCH, Deiml B, Mourgues F, Perrotta G, Fischer TC, Bovy AG, Martens S, Rosati C (2007) Characterization of major enzymes and genes involved in flavonoid and proanthocyanidin biosynthesis during fruit development in strawberry (*Fragaria × ananassa*). *Archives of Biochemistry and Biophysics* **465**:61–71.

Andersen ØM, Fossen T, Torskangerpoll K, Fossen A, Hauge U (2004) Anthocyanin from strawberry (*Fragaria ananassa*) with the novel aglycone, 5-carboxypyranopelargonidin. *Phytochemistry* **65**:405–410.

- Andjelkovic M, Camp J Van, Pedra M, Renders K, Socaciu C, Verhé R** (2008) Correlations of the phenolic compounds and the phenolic content in some Spanish and French olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**:5181–5187.
- Aragüez-Rey I** (2011) Strawberry (*Fragaria × ananassa*) fruit ripening: auxin signaling, proteomic analysis and eugenol production. Dissertation, Universität von Málaga, Spanien.
- Babiychuk E, Kushnir S, Belles-Boix E, Montagu M Van, Inzé D** (1995) *Arabidopsis thaliana* NADPH oxidoreductase homologs confer tolerance of yeasts toward the thiol-oxidizing drug diamide. *Journal of Biological Chemistry* **270**:26224–26231.
- Basten C, Weir BS, Zeng ZB** (1997) QTL cartographer: A reference manual and tutorial for QTL mapping. Raleigh NC: Department of Statistics, North Carolina State University, USA. <http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/>.
- Benjamini Y, Hochberg Y** (1995) Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B* **57**:289–300.
- Besseau S, Hoffmann L, Geoffroy P, Lapierre C, Pollet B, Legrand M** (2007) Flavonoid accumulation in *Arabidopsis* repressed in lignin synthesis affects auxin transport and plant growth. *The Plant Cell* **19**:148–162.
- Bianco L, Lopez L, Scalone AG, Di Carli M, Desiderio A, Benvenuto E, Perrotta G** (2009) Strawberry proteome characterization and its regulation during fruit ripening and in different genotypes. *Journal of Proteomics* **72**:586–607.
- Blanco-Portales R, Medina-Escobar N, López-Ráez J, González-Reyes J, Villalba J, Moyano E, Caballero JL, Muñoz-Blanco J** (2002) Cloning, expression and immunolocalization pattern of a cinnamyl alcohol dehydrogenase gene from strawberry (*Fragaria × ananassa* cv. Chandler). *Journal of Experimental Botany* **53**:1723–1734.
- Boerjan W, Ralph J, Baucher M** (2003) Lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology* **54**:519–546.
- Bohr G, Gerhäuser C, Knauff J, Zapp J, Becker H** (2005) Anti-inflammatory acylphloroglucinol derivatives from hops (*Humulus lupulus*). *Journal of Natural Products* **68**:1545–1548.
- Bomati EK, Austin MB, Bowman ME, Dixon RA, Noel JP** (2005) Structural elucidation of chalcone reductase and implications for deoxychalcone biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry* **280**:30496–30503.
- Boudet A** (2007) Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry* **68**:2722–2735.
- Boudet A, Lapierre C, Grima-Pettenati J** (1995) Tansley review No. 80. Biochemistry and molecular biology of lignification. *New Phytologist* **129**:203–236.
- Bravo L** (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews* **56**:317–333.

- Brown DE, Rashotte AM, Murphy AS, Normanly J, Tague BW, Peer WA, Taiz L, Muday GK** (2001) Flavonoids act as negative regulators of auxin transport in vivo in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **126**:524–535.
- Brummell D, Harpster M, Civello P, Palys J, Bennett A, Dunsmuir P** (1999) Modification of expansin protein abundance in tomato fruit alters softening and cell wall polymer metabolism during ripening. *The Plant Cell* **11**:2203–2216.
- Burton M, Rose TM, Færgeman NJ, Knudsen J** (2005) Evolution of the acyl-CoA binding protein (ACBP). *Biochemical Journal* **392**:299–307.
- Cai C, Xu C, Li X, Ferguson I, Chen K** (2006) Accumulation of lignin in relation to change in activities of lignification enzymes in loquat fruit flesh after harvest. *Postharvest Biology and Technology* **40**:163–169.
- Çakir B, Agasse A, Gaillard C, Saumonneau A, Delrot S, Atanassova R** (2003) A grape ASR protein involved in sugar and abscisic acid signaling. *The Plant Cell* **15**:2165–2180.
- Callard D, Axelos M, Mazzolini L** (1996) Novel molecular markers for late phases of the growth cycle of *Arabidopsis thaliana* cell-suspension cultures are expressed during organ senescence. *Plant Physiology* **112**:705–715.
- Campbell MM, Ellis BE** (1992) Fungal elicitor-mediated response in pine cell cultures: I. Induction of phenylpropanoid metabolism. *Planta* **186**:409–417.
- Capocasa F, Diamanti J, Tulipani S, Battino M, Mezzetti B** (2008) Breeding strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) to increase fruit nutritional quality. *BioFactors* **34**:67–72.
- Carbone F, Mourgues F, Biasioli F, Gasperi F, Märk TD, Rosati C, Perrotta G** (2006) Development of molecular and biochemical tools to investigate fruit quality traits in strawberry elite genotypes. *Molecular Breeding* **18**:127–142.
- Carbone F, Preuß A, De Vos RCH, D'Amico E, Perrotta G, Bovy AG, Martens S, Rosati C** (2009) Developmental, genetic and environmental factors affect the expression of flavonoid genes, enzymes and metabolites in strawberry fruits. *Plant, Cell & Environment* **32**:1117–1131.
- Castañeda-Ovando A, Pacheco-Hernández MDL, Páez-Hernández ME, Rodríguez JA, Galán-Vidal CA** (2009) Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry* **113**:859–871.
- Chabannes M, Barakate A, Lapierre C, Marita JM, Ralph J, Pean M, Danoun S, Halpin C, Grima-Pettenati J, Boudet A** (2001) Strong decrease in lignin content without significant alteration of plant development is induced by simultaneous down-regulation of cinnamoyl CoA reductase (CCR) and cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) in tobacco plants. *The Plant Journal* **28**:257–270.
- Chang S, Puryear J, Cairney J** (1993) A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter* **11**:113–116.

- Chen J, Liu D, Jiang Y, Zhao M, Shan W, Kuang J, Lu W** (2011) Molecular characterization of a strawberry *FaASR* gene in relation to fruit ripening. *PLoS one* **6**:e24649.
- Civello PM, Powell ALT, Sabehat A, Bennett AB** (1999) An expansin gene expressed in ripening strawberry fruit. *Plant Physiology* **121**:1273–1279.
- Cosgrove DJ** (2000) Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature* **407**:321–326.
- Cosgrove DJ** (2005) Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **6**:850–861.
- Cosio C, Dunand C** (2009) Specific functions of individual class III peroxidase genes. *Journal of Experimental Botany* **60**:391–408.
- Crespo P, Bordonaba JG, Terry LA, Carlen C** (2010) Characterisation of major taste and health-related compounds of four strawberry genotypes grown at different Swiss production sites. *Food Chemistry* **122**:16–24.
- Dai J, Mumper RJ** (2010) Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* **15**:7313–7352.
- Dale A, Sjulín TM** (1990) Few cytoplasm contribute to North American strawberry cultivars. *HortScience* **25**:1341–1342.
- Dao TTH, Linthorst HJM, Verpoorte R** (2011) Chalcone synthase and its functions in plant resistance. *Phytochemistry Reviews* **10**:397–412.
- DeLong A, Calderon-Urrea A, Dellaporta SL** (1993) Sex determination gene *TASSELSEED2* of maize encodes a short-chain alcohol dehydrogenase required for stage-specific floral organ abortion. *Cell* **74**:757–768.
- DESTATIS** (2012) Land- und Forstwirtschaft, Fischerei: Landwirtschaftliche Bodennutzung und pflanzliche Erzeugung 2010. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden.
- Dettmer K, Aronov PA, Hammock BD** (2007) Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrometry Reviews* **26**:51–78.
- Devic M, Guilleminot J, Debeaujon I, Bechthold N, Bensaude E, Koornneef M, Pelletier G, Delseny M** (1999) The *BANYULS* gene encodes a DFR-like protein and is a marker of early seed coat development. *Plant Journal* **19**:387–398.
- Dinkel H, Michael S, Weatheritt RJ, Davey NE, Van Roey K, Altenberg B, Toedt G, Uyar B, Seiler M, Budd A, Jödicke L, Dammert MA, Schroeter C, Hammer M, Schmidt T, Jehl P, McGuigan C, Dymecka M, Chica C, Luck K, Via A, Chatr-aryamontri A, Haslam N, Grebnev G, Edwards RJ, Steinmetz MO, Meiselbach H, Diella F, Gibson TJ** (2011) ELM—the database of eukaryotic linear motifs. *Nucleic Acids Research* **40**:D242–D251
- Dixon RA, Chen F, Guo D, Parvathi K** (2001) The biosynthesis of monolignols: a “metabolic grid”, or independent pathways to guaiacyl and syringyl units? (Review). *Phytochemistry* **57**:1069–1084.

- Dixon RA, Xie D-Y, Sharma SB** (2005) Proanthocyanidins - a final frontier in flavonoid research? *The New Phytologist* **165**:9–28.
- Dotto MC, Martínez GA, Civello PM** (2006) Expression of expansin genes in strawberry varieties with contrasting fruit firmness. *Plant Physiology and Biochemistry* **44**:301–307.
- Dou Q** (2009) Molecular mechanisms of green tea polyphenols. *Nutrition and Cancer* **61**:827–835.
- Ehala S, Vaher M, Kaljurand M** (2005) Characterization of phenolic profiles of Northern European berries by capillary electrophoresis and determination of their antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**:6484–6490.
- Everette JD, Bryant QM, Green AM, Abbey YA, Wangila GW, Walker RB** (2010) Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin-Ciocalteu reagent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**:8139–8144.
- Fait A, Hanhineva K, Beleggia R, Dai N, Rogachev I, Nikiforova VJ, Fernie AR, Aharoni A** (2008) Reconfiguration of the achene and receptacle metabolic networks during strawberry fruit development. *Plant Physiology* **148**:730–750.
- FAOSTAT** (2012) <http://faostat.fao.org/> (Stand Dezember 2012).
- Ferrazzano G, Amato I, Ingenito A, Zarrelli A, Pinto G, Pollio A** (2011) Plant polyphenols and their anti-cariogenic properties: a review. *Molecules* **16**:1486–1507.
- Ferreres F, Figueiredo R, Bettencourt S, Carqueijero I, Oliveira J, Gil-Izquierdo A, Pereira DM, Valentão P, Andrade PB, Duarte P, Ros-Barceló A, Sottomayor M** (2011) Identification of phenolic compounds in isolated vacuoles of the medicinal plant *Catharanthus roseus* and their interaction with vacuolar class III peroxidase: an H₂O₂ affair? *Journal of Experimental Botany* **62**:2841–2854.
- Feucht W, Treutter D, Polster J** (2004) Flavanol binding of nuclei from tree species. *Plant Cell Reports* **22**:430–436.
- Fiehn O** (2001) Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. *Comparative and Functional Genomics* **2**:155–168.
- Fiehn O** (2002) Metabolomics - the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology* **48**:155–171.
- Flachowsky H, Hättasch C, Höfer M, Peil A, Hanke M** (2010) Overexpression of *LEAFY* in apple leads to a columnar phenotype with shorter internodes. *Planta* **231**:251–263.
- Flanagan JG, Vanderhaeghen P** (1998) The ephrins and Eph receptors in neural development. *Annual Review of Neuroscience* **21**:309–345.
- Franke W** (1997) Nutzpflanzenkunde, Thieme Verlag, Stuttgart, 6. Auflage.
- Fornalé S, Shi X, Chai C, Encina A, Irar S, Capellades M, Fuguet E, Torres J-L, Rovira P, Puigdomènech P, Rigau J, Grotewold E, Gray J, Caparrós-Ruiz D** (2010) ZmMYB31

directly represses maize lignin genes and redirects the phenylpropanoid metabolic flux. *The Plant Journal* **64**:633–644.

Fossen T, Rayyan S, Andersen ØM (2004) Dimeric anthocyanins from strawberry (*Fragaria ananassa*) consisting of pelargonidin 3-glucoside covalently linked to four flavan-3-ols. *Phytochemistry* **65**:1421–1428.

Franke R, Hemm M, Denault J, Ruegger M, Humphreys J, Chapple C (2002) Changes in secondary metabolism and deposition of an unusual lignin in the *ref8* mutant of *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **30**:47–59.

Friedman M (2007) Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of tea flavonoids and teas (review). *Molecular Nutrition & Food Research* **51**:116–134.

Gachomo EW, Jimenez-Lopez JC, Polycarpe Kayodé AP, Baba-Moussa L, Kotchoni SO (2012) Structural characterization of plant defensin protein superfamily. *Molecular Biology Reports* **39**:4461–4469.

Gajhede M (2001) Protein engineering of peroxidases and cytochrome P450. *Biochemical Society Transactions* **29**:91–99.

Giampieri F, Tulipani S, Alvarez-Suarez JM, Quiles JL, Mezzetti B, Battino M (2012) The strawberry: composition, nutritional quality, and impact on human health. *Nutrition* **28**:9–19.

Gibney MJ, Walsh M, Brennan L, Roche HM, German B, Van Ommen B (2005) Metabolomics in human nutrition: opportunities and challenges. *American Journal of Clinical Nutrition* **82**:497–503.

Gil-Ariza D, Amaya I, López-Aranda J, Sánchez-Sevilla J, Botella MA, Valpuesta V (2009) Impact of plant breeding on the genetic diversity of cultivated strawberry as revealed by expressed sequence tag-derived simple sequence repeat markers. *Journal of the American Society of Horticultural Science* **134**:337–347.

Giovannoni J (2001) Molecular biology of fruit maturation and ripening. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* **52**:725–749.

Giovannoni J (2004) Genetic regulation of fruit development and ripening. *The Plant Cell* **16**:170–181.

Given N, Venis M, Gierson D (1988) Hormonal regulation of ripening in the strawberry, a non-climacteric fruit. *Planta* **174**:402–406.

Goetz G, Fkyerat A, Métails N, Kunz M, Tabacchi R, Pezet R, Pont V (1999) Resistance factors to grey mould in grape berries: identification of some phenolics inhibitors of *Botrytis cinerea* stilbene oxidase. *Phytochemistry* **52**:759–767.

Gonzalez A, Zhao M, Leavitt J, Lloyd A (2008) Regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway by the TTG1/bHLH/Myb transcriptional complex in *Arabidopsis* seedlings. *The Plant Journal* **53**:814–827.

- Görg A, Weiss W** (2004) Chapter 2 – Protein profile comparisons of microorganisms, cells and tissues using 2D gels. *In: Speicher D* (Ed) *Proteome Analysis – Interpreting the genome*. Elsevier Science, Oxford, UK, S. 19-73.
- Goto T, Goto M, Chachin K, Iwata T** (1996) The mechanism of the increase of firmness in strawberry fruit treated with 100% CO₂. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* **43**:1158–1162.
- Götz S, Garcia-Gomez JM, Terol J, Williams TD, Nagaraj SH, Nueda MJ, Robles M, Talon M, Dopazo J, Conesa A** (2008) High-throughput functional annotation and data mining with the blast2go suite. *Nucleic Acids Research* **36**:3420–3435.
- Goulao L, Oliveira C** (2008) Cell wall modifications during fruit ripening: when a fruit is not the fruit. *Trends in Food Science & Technology* **19**:4–25.
- Grießer M, Hoffmann T, Bellido ML, Rosati C, Fink B, Kurtzer R, Aharoni A, Muñoz-Blanco J, Schwab W** (2008a) Redirection of flavonoid biosynthesis through the down-regulation of an anthocyanidin glucosyltransferase in ripening strawberry fruit. *Plant Physiology* **146**:1528–1539.
- Grießer M, Vitzthum F, Fink B, Bellido ML, Raasch C, Muñoz-Blanco J, Schwab W** (2008b) Multi-substrate flavonol O-glucosyltransferases from strawberry (*Fragaria × ananassa*) achene and receptacle. *Journal of Experimental Botany* **59**:2611–2625.
- Gu L, Kelm MA, Hammerstone JF, Beecher G, Holden J, Haytowitz D, Prior RL** (2003) Screening of foods containing proanthocyanidins and their structural characterization using LC-MS/MS and thiolytic degradation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**:7513–7521.
- Gu L, Kelm M, Hammerstone JF, Beecher G, Cunningham D, Vannozzi S, Prior RL** (2002) Fractionation of polymeric procyanidins from lowbush blueberry and quantification of procyanidins in selected foods with an optimized normal-phase HPLC-MS fluorescent detection method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**:4852–4860.
- Halbwirth H, Kahl S, Jäger W, Reznicek G, Forkmann G, Stich K** (2006a) Synthesis of (14C)-labeled 5-deoxyflavonoids and their application in the study of dihydroflavonol/leucoanthocyanidin interconversion by dihydroflavonol 4-reductase. *Plant Science* **170**:587–595.
- Halbwirth H, Puhl I, Haas U** (2006b) Two-phase flavonoid formation in developing strawberry (*Fragaria × ananassa*) fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**:1479–1485.
- Halpin C, Knight M, Foxon G, Campbell M, Boudet A, Boon J, Chabbert B, Tollier M-T, Schuch W** (1994) Manipulation of lignin quality by downregulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase. *The Plant Journal* **6**:339–350.
- Hancock JF, Luby JJ** (1993) Genetic resources at our doorstep: the wild strawberries. *BioScience* **43**:141–147.
- Hancock JF** (1999) *Strawberries*. CABI Publishing, Wallingford, UK.

- Hanhineva K, Rogachev I, Kokko H, Mintz-Oron S, Venger I, Kärenlampi S, Aharoni A** (2008) Non-targeted analysis of spatial metabolite composition in strawberry (*Fragaria × ananassa*) flowers. *Phytochemistry* **69**:2463–2481.
- Hanhineva K, Kokko H, Siljanen H, Rogachev I, Aharoni A, Kärenlampi SO** (2009) Stilbene synthase gene transfer caused alterations in the phenylpropanoid metabolism of transgenic strawberry (*Fragaria × ananassa*). *Journal of Experimental Botany* **60**:2093–2106.
- Hanhineva K, Kärenlampi S, Aharoni A** (2011) Recent advances in strawberry metabolomics. In: Husaini AM, Mercado JA (Eds) Genomics, transgenics, molecular breeding and biotechnology of strawberry. *Genes, Genomes and Genomics* **5**:65–75.
- Harrison EP, McQueen-Mason SJ, Manning K** (2001) Expression of six expansin genes in relation to extension activity in developing strawberry fruit. *Journal of Experimental Botany* **52**:1437–1446.
- Hart A** (2001) Mann-Whitney test is not just a test of medians: differences in spread can be important. *BMJ* **323**:391–393.
- Henikoff S** (2005) Rapid changes in plant genomes. *The Plant Cell* **17**:2852–2855.
- Henriksen A, Smith AT, Gajhede M** (1999) The structures of the horseradish peroxidase C-ferulic acid complex and the ternary complex with cyanide suggest how peroxidases oxidize small phenolic substrates. *The Journal of Biological Chemistry* **274**:35005–35011.
- Hensel LL, Grbić V, Baumgarten DA, Bleecker AB** (1993) Developmental and age-related processes that influence the longevity and senescence of photosynthetic tissues in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **5**:553–564.
- Hernanz D, Recamales A, Meléndez-Martínez A, González-Miret M, Heredia F** (2007) Assessment of the differences in the phenolic composition of five strawberry cultivars (*Fragaria × ananassa* Duch.) grown in two different soilless systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**:1846–1852.
- Hoffmann F, Van Den Heuvel J, Zidek N, Rinas U** (2004) Minimizing inclusion body formation during recombinant protein production in *Escherichia coli* at bench and pilot plant scale. *Enzyme and Microbial Technology* **34**:235–241.
- Hoffmann T, Kurtzer R, Skowranek K, Kiessling P, Fridman E, Pichersky E, Schwab W** (2011) Metabolic engineering in strawberry fruit uncovers a dormant biosynthetic pathway. *Metabolic engineering* **13**:527–531.
- Hoffmann T, Friedlhuber R, Steinhauser C, Tittel I, Skowranek K, Schwab W, Fischer TC** (2012) Histochemical screening, metabolite profiling and expression analysis reveal Rosaceae roots as the site of flavan-3-ol biosynthesis. *Plant Biology* **14**:33–40.

- Hoffmann T, Kalinowski G, Schwab W** (2006) RNAi-induced silencing of gene expression in strawberry fruit (*Fragaria × ananassa*) by agroinfiltration: a rapid assay for gene function analysis. *Plant Journal* **48**:818–826.
- Hu W, Harding SA, Lung J, Popko JL, Ralph J, Stokke DD, Tsai C, Chiang VL** (1999) Repression of lignin biosynthesis promotes cellulose accumulation and growth in transgenic trees. *Nature Biotechnology* **17**:808–812.
- Huber D** (1984) Strawberry fruit softening: the potential roles of polyuronides and hemicelluloses. *Journal of Food Science* **49**:1310–1315.
- Höfgen R, Willmitzer L** (1988) Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucleic Acids Research* **16**:9877.
- Iannetta PPM, Laarhoven L-J, Medina-Escobar N, James EK, McManus MT, Davies HV, Harren FJM** (2006) Ethylene and carbon dioxide production by developing strawberries show a correlative pattern that is indicative of ripening climacteric fruit. *Physiologia Plantarum* **127**:247–259.
- Ihaka R, Gentleman R** (1996) R: A language for data analysis and graphics. *Journal of Computational and Graphical Statistics* **5**:299–314.
- Janz D, Behnke K, Schnitzler J, Kanawati B, Schmitt-Kopplin P, Polle A** (2010) Pathway analysis of the transcriptome and metabolome of salt sensitive and tolerant poplar species reveals evolutionary adaptation of stress tolerance mechanisms. *BMC Plant Biology* **10**:1–17.
- Jefferson AR** (1987) Assaying chimeric genes in plants: the *GUS* gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reporter* **5**:387–405.
- Jia H-F, Chai Y-M, Li C-L, Lu D, Luo J-J, Qin L, Shen Y-Y** (2011) Abscisic acid plays an important role in the regulation of strawberry fruit ripening. *Plant Physiology* **157**:188–199.
- Kajdžanoska M, Gjamovski V, Stefova M** (2010) HPLC-DAD-ESI-MSⁿ identification of phenolic compounds in cultivated strawberries from macedonia. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering* **29**:181–194.
- Kalinowski GK** (2009) Etablierung einer RNAi-Methode zur funktionellen Genomik in Erdbeeren. Dissertation, Technische Universität München.
- Karamloo F, Schmitz N, Scheurer S, Foetisch K, Hoffmann A, Haustein D, Vieths S** (1999) Molecular cloning and characterization of a birch pollen minor allergen, Bet v 5, belonging to a family of isoflavone reductase-related proteins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **104**:991–999.
- Katajamaa M, Miettinen J, Orešič M** (2006) MZmine: Toolbox for processing and visualization of mass spectrometry based molecular profile data. *Bioinformatics* **22**:634–636.
- Kim J, Jung J-H, Reyes JL, Kim Y-S, Kim S-Y, Chung K-S, Kim JA, Lee M, Lee Y, Kim NV, Chua N-H, Park C-M** (2005) microRNA-directed cleavage of *ATHB15* mRNA regulates vascular development in *Arabidopsis* inflorescence stems. *The Plant Journal* **42**:84–94.

- Kimura Y, Aoki T, Ayabe S** (2001) Chalcone isomerase isozymes with different substrate specificities towards 6'-hydroxy- and 6'-deoxychalcones in cultured cells of *Glycyrrhiza echinata*, a leguminous plant producing 5-deoxyflavonoids. *Plant & Cell Physiology* **42**:1169–1173.
- Koeduka T, Fridman E, Gang DR, Vassão DG, Jackson BL, Kish CM, Orlova I, Spassova SM, Lewis NG, Noel JP, Baiga TJ, Dudareva N, Pichersky E** (2006) Eugenol and isoeugenol, characteristic aromatic constituents of spices, are biosynthesized via reduction of a coniferyl alcohol ester. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**:10128–10133.
- Kogel K, Voll LM, Schäfer P, Jansen C, Wu Y, Langen G, Imani J, Hofmann J, Schmiedl A, Sonnewald S, Wettstein von D, Cook R, Sonnewald U** (2010) Transcriptome and metabolome profiling of field-grown transgenic barley lack induced differences but show cultivar-specific variances. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**:6198–6203.
- Krolikowski K a., Victor JL, Wagler TN, Lolle SJ, Pruitt RE** (2003) Isolation and characterization of the *Arabidopsis* organ fusion gene *HOTHEAD*. *The Plant Journal* **35**:501–511.
- Kurdyukov S, Faust A, Trenkamp S, Bär S, Franke R, Efremova N, Tietjen K, Schreiber L, Saedler H, Yephremov A** (2006) Genetic and biochemical evidence for involvement of *HOTHEAD* in the biosynthesis of long-chain α - ω -dicarboxylic fatty acids and formation of extracellular matrix. *Planta* **224**:315–329.
- Kähkönen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha JP, Pihlaja K, Kujala TS, Heinonen M** (1999) Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**:3954–3962.
- Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL) Bayern** (2012) Agrarmärkte 2011/2012. Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Freising-Weihenstephan.
- Lane DM** (2012) Online statistics education: An multimedia course of study. Rice University, Houston, TX, USA. <http://onlinestatbook.com> (Stand: Oktober 2012)
- Larsen M, Poll L** (1992) Odour thresholds of some important aroma compounds in strawberries. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -forschung* **195**:120–123.
- Larsen M, Poll L, Olsen C** (1992) Evaluation of the aroma composition of some strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) cultivars by use of odour threshold values. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -forschung* **195**:536–539.
- Latrasse A** (1991) Fruits III. In: Maarse H (Ed) Volatile Compounds in Foods and Beverages. Marcel Dekker Publishing, New York, USA, S. 329-387.
- Lattanzio V, Lattanzio VMT, Cardinali A, Amendola V** (2006) Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. *Phytochemistry: Advances in Research* **661**:23–67.
- Lazo GR, Stein PA, Ludwig RA** (1991) A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*. *Biotechnology* **9**:963-967.

- Lee GJ, Roseman AM, Saibil HR, Vierling E** (1997) A small heat shock protein stably binds heat-denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding-competent state. *The EMBO Journal* **16**:659–671.
- Leung K-C, Li H-Y, Mishra G, Chye M-L** (2004) ACBP4 and ACBP5, novel *Arabidopsis* acyl-CoA-binding proteins with kelch motifs that bind oleoyl-CoA. *Plant Molecular Biology* **55**:297–309.
- Li L, Zhou Y, Cheng X, Sun J, Marita J, Ralph J, Chiang VL** (2003a) Combinatorial modification of multiple lignin traits in trees through multigene cotransformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**:4939–4944.
- Li Y, Jones L, McQueen-Mason S** (2003b) Expansins and cell growth. *Current Opinion in Plant Biology* **6**:603–610.
- Li Z, Wang Q, Ruan X, Pan C, Jiang D** (2010) Phenolics and plant allelopathy. *Molecules* **15**:8933–8952.
- Lin-Wang K, Bolitho K, Grafton K, Kortstee A, Karunairetnam S, McGhie TK, Espley RV, Hellens RP, Allan AC** (2010) An R2R3 MYB transcription factor associated with regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway in Rosaceae. *BMC Plant Biology* **10**:50.
- Lindquist S, Craig EA** (1988) The heat-shock proteins. *Annual Review of Genetics* **22**:631–677.
- Liszkay A, Kenk B, Schopfer P** (2003) Evidence for the involvement of cell wall peroxidase in the generation of hydroxyl radicals mediating extension growth. *Planta* **217**:658–667.
- Lolle SJ, Victor JL, Young JM, Pruitt RE** (2005) Genome-wide non-mendelian inheritance of extra-genomic information in *Arabidopsis*. *Nature* **434**:505–509.
- Lunkenbein S, Bellido M, Aharoni A, Salentijn EMJ, Kaldenhoff R, Coiner HA, Muñoz-Blanco J, Schwab W** (2006) Cinnamate metabolism in ripening fruit. Characterization of a UDP-glucose:cinnamate glucosyltransferase from strawberry. *Plant Physiology* **140**:1047–1058.
- Lüthje S, Meisrimler C, Hopff D, Möller B** (2011) Phylogeny, topology, structure and functions of membrane-bound class III peroxidases in vascular plants. *Phytochemistry* **72**:1124–1135.
- Maas J, Wang S, Galletta G** (1991) Evaluation of strawberry cultivars for ellagic acid content. *HortScience* **26**:66–68.
- Mahajan M, Joshi R, Gulati A, Yadav SK** (2012) Increase in flavan-3-ols by silencing flavonol synthase mRNA affects the transcript expression and activity levels of antioxidant enzymes in tobacco. *Plant Biology* **14**:725–733.
- Manning K** (1998) Isolation of a set of ripening-related genes from strawberry: their identification and possible relationship to fruit quality traits. *Planta* **205**:622–631.
- Mansouri I El, Mercado J, Santiago-Dómenech N, Pliego-Alfaro F, Valpuesta V, Quesada M** (1999) Biochemical and phenotypical characterization of transgenic tomato plants overexpressing a basic peroxidase. *Physiologia Plantarum* **106**:355–362.

- Marjamaa K, Kukkola EM, Fagerstedt KV** (2009) The role of xylem class III peroxidases in lignification. *Journal of Experimental Botany* **60**:367–376.
- Martens S, Preuß A, Matern U** (2010) Multifunctional flavonoid dioxygenases: flavonol and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* L. *Phytochemistry* **71**:1040–1049.
- Masoudi-Nejad A, Tonomura K, Kawashima S, Moriya Y, Suzuki M, Itoh M, Kanehisa M, Endo T, Goto S** (2006) EGassembler: Online bioinformatics service for large-scale processing, clustering and assembling ESTs and genomic DNA fragments. *Nucleic Acids Research* **34**:459–462.
- Mathé C, Barre A, Jourda C, Dunand C** (2010) Evolution and expression of class III peroxidases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **500**:58–65.
- McNiven EMS, German JB, Slupsky CM** (2011) Analytical metabolomics: nutritional opportunities for personalized health. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **22**:995–1002.
- Medina-Escobar N, Cárdenas J, Muñoz-Blanco J, Caballero J** (1998) Cloning and molecular characterization of a strawberry fruit ripening-related cDNA corresponding a mRNA for a low-molecular-weight heat-shock protein. *Plant Molecular Biology* **36**:33–42.
- Mertely J, MacKenzie S, Legard D** (2002) Timing of fungicide applications for *Botrytis cinerea* based on development stage of strawberry flowers and fruit. *Plant Disease* **86**:1019–1024.
- Meyer K, Shirley AM, Cusumano JC, Bell-Lelong DA, Chapple C** (1998) Lignin monomer composition is determined by the expression of a cytochrome P450-dependent monooxygenase in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**:6619–6623.
- Mo Y, Nagelt C, Taylor LP** (1992) Biochemical complementation of chalcone synthase mutants defines a role for flavonols in functional pollen. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **89**:7213–7217.
- Modafar C El, Boustani E El** (2001) Cell wall-bound phenolic acid and lignin contents in date palm as related to its resistance to *Fusarium oxysporum*. *Biologia Plantarum* **44**:125–130.
- Moing A, Renaud C, Gaudillère M, Raymond P, Roudeillac P, Denoyes-Rothan B** (2001) Biochemical changes during fruit development of four strawberry cultivars. *Journal of the American Society of Horticultural Science* **126**:394–403.
- Mämmelä P, Savolainen H, Lindroos L, Kangas J, Vartiainen T** (2000) Analysis of oak tannins by liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **891**:75–83.
- Nam YW, Tichit L, Leperlier M, Cuerq B, Marty I, Lelièvre JM** (1999) Isolation and characterization of mRNAs differentially expressed during ripening of wild strawberry (*Fragaria vesca* L.) fruits. *Plant Molecular Biology* **39**:629–636.
- Nardi C, Escudero C, Villarreal N, Martínez G, Civello PM** (2013) The carbohydrate-binding module of *Fragaria* × *ananassa* expansin 2 (CBM-FaExp2) binds to cell wall

polysaccharides and decreases cell wall enzyme activities “in vitro”. *Journal of Plant Research* **126**:151–159.

Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **9**:255-262.

Nobel S, Abrahmsen L, Oppermann U (2001) Metabolic conversion as a pre-receptor control mechanism for lipophilic hormones. *European Journal of Biochemistry* **268**:4113–4125.

Ohashi-Ito K, Fukuda H (2003) HD-zip III homeobox genes that include a novel member, *ZeHB-13* (*Zinnia*)/*ATHB-15* (*Arabidopsis*), are involved in procambium and xylem cell differentiation. *Plant and Cell Physiology* **44**:1350–1358.

Oliveira Carvalho A de, Moreira Gomes V (2011) Plant defensins and defensin-like peptides - biological activities and biotechnological applications. *Current Pharmaceutical Design* **17**:4270-4293.

Olsson M, Andersson S, Berglund RH, Gustavsson K-E, Oredsson S (2007) Extracts from organically and conventionally cultivated strawberries inhibit cancer cell proliferation in vitro. *Acta Horticulturae* **744**:189–194.

Otani K, Takahashi T, Furuya T, Ayabe S (1994) Licodione synthase, a cytochrome P450 monooxygenase catalyzing 2-hydroxylation of 5-deoxyflavanone, in cultured *Glycyrrhiza ebinata* L. cells. *Plant Physiology* **105**:1427–1432.

Paniego NB, Zuurbier KW, Fung SY, Van der Heijden R, Scheffer JJ, Verpoorte R (1999) Phlorisovalerophenone synthase, a novel polyketide synthase from hop (*Humulus lupulus* L.) cones. *European Journal of Biochemistry* **262**:612–616.

Panjehkeh N, Backhouse D, Taji A (2010) Role of proanthocyanidins in resistance of the legume *Swainsona formosa* to *Phytophthora cinnamomi*. *Journal of Phytopathology* **158**:365–371.

Passardi F, Cosio C, Penel C, Dunand C (2005) Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Reports* **24**:255–265.

Passardi F, Longet D, Penel C, Dunand C (2004) The class III peroxidase multigenic family in rice and its evolution in land plants. *Phytochemistry* **65**:1879–1893.

Pereira DM, Valentão P, Pereira JA, Andrade PB (2009) Phenolics: from chemistry to biology. *Molecules* **14**:2202–2211.

Perkins-Veazie P (1995) Growth and ripening of strawberry fruit. *Horticultural Reviews* **17**:267-345.

Pincemail J, Kevers C (2012) Cultivars, culture conditions, and harvest time influence phenolic and ascorbic acid contents and antioxidant capacity of strawberry (*Fragaria* × *ananassa*). *Journal of Food Science* **77**:205–210.

Pollastri S, Tattini M (2011) Flavonols: old compounds for old roles. *Annals of Botany* **108**:1225–1233.

- Poulos TL, Kraut J** (1980) The stereochemistry of peroxidase catalysis. *The Journal of Biological Chemistry* **255**:8199–8205.
- Pourcel L, Routaboul J, Kerhoas L, Caboche M, Lepiniec L, Debeaujon I** (2005) *TRANSPARENT TESTA10* encodes a laccase-like enzyme involved in oxidative polymerization of flavonoids in *Arabidopsis* seed coat. *The Plant Cell* **17**:2966–2980.
- Preuß A, Stracke R, Weisshaar B, Hillebrecht A, Matern U, Martens S** (2009) *Arabidopsis thaliana* expresses a second functional flavonol synthase. *FEBS letters* **583**:1981–1986.
- Preuß A** (2009) Untersuchungen zur Flavonol- und Proanthocyanidinsynthese als Konkurrenzreaktionen in der Flavonoidbiosynthese. Dissertation, Philipps Universität Marburg.
- Prior R, Wu X, Schaich K** (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**:4290–4302.
- Quideau S, Deddieux D, Douat-Casassus C, Pouysegu L** (2011) Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie International Edition* **50**:586–621.
- Raab T, López-Ráez J, Klein D, Caballero JL, Moyano E, Schwab W, Muñoz-Blanco J** (2006) *FaQR*, required for the biosynthesis of the strawberry flavor compound 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone, encodes an enone oxidoreductase. *The Plant Cell* **18**:1023–1037.
- Rekika D, Khanizadeh S, Deschênes M, Levasseur A, Charles MT, Tsao R, Raymond Y** (2005) Antioxidant capacity and phenolic content of selected strawberry genotypes. *HortScience* **40**:1777–1781.
- Rohrmann J, Tohge T, Alba R, Osorio S, Caldana C, McQuinn R, Arvidsson S, Merwe van der MJ, Riaño-Pachón DM, Mueller-Roeber B, Fei Z, Nesi AN, Giovannoni J, Fernie AR** (2011) Combined transcription factor profiling, microarray analysis and metabolite profiling reveals the transcriptional control of metabolic shifts occurring during tomato fruit development. *The Plant Journal* **68**:999–1013.
- Rosati P** (1993) Recent trends in strawberry production and research: an overview. *Acta Horticulturae* **34**:23–44.
- Rousseau-Gueutin M, Lerceteau-Köhler E, Barrot L, Sargent DJ, Monfort A, Simpson D, Arús P, Guérin G, Denoyes-Rothan B.** (2008) Comparative genetic mapping between octoploid and diploid *Fragaria* species reveals a high level of colinearity between their genomes and the essentially disomic behavior of the cultivated octoploid strawberry. *Genetics* **179**:2045–2060.
- Russell WR, Provan GJ, Burkitt MJ, Chesson A** (2000) Extent of incorporation of hydroxycinnamaldehydes into lignin in cinnamyl alcohol dehydrogenase-downregulated plants. *Journal of Biotechnology* **79**:73–85.
- Rusznayák S, Szent-Györgyi A** (1936) Vitamin P: Flavonols as vitamins. *Nature* **138**:27.

- Ryan KG, Swinny EE, Markham KR, Winefield C** (2002) Flavonoid gene expression and UV photoprotection in transgenic and mutant *Petunia* leaves. *Phytochemistry* **59**:23–32.
- Sachs L** (1999) *Angewandte Statistik*, Springer Verlag, Berlin, 9. Auflage, S. 510ff
- Saeed AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N, Braisted J, Klapa M, Currier T, Thiagarajan M, Sturn A, Snuffin M, Rezantsev A, Popov D, Ryltsov A, Kostukovich E, Borisovsky I, Liu Z, Vinsavich A, Trush V, Quackenbush J** (2003) TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques* **34**:374–378.
- Sakagami H, Oi T, Satoh K** (1999) Prevention of oral diseases by polyphenols (review). *In Vivo* **13**:155–171.
- Salentijn EMJ, Aharoni A, Schaart JG, Boone MJ, Krens FA** (2003) Differential gene expression analysis of strawberry cultivars that differ in fruit-firmness. *Physiologia Plantarum* **118**:571–578.
- Salminen J, Karonen M** (2011) Chemical ecology of tannins and other phenolics: we need a change in approach. *Functional Ecology* **25**:325–338.
- Salvatierra A, Pimentel P, Moya-Leon MA, Caligari PDS, Herrera R** (2010) Comparison of transcriptional profiles of flavonoid genes and anthocyanin contents during fruit development of two botanical forms of *Fragaria chiloensis* ssp. *chiloensis*. *Phytochemistry* **71**:1839–1847.
- Sankian M, Talebi F, Moghadam M, Vahedi F, Azad FJ, Varasteh A-R** (2011) Molecular cloning and expression of cucumisin (Cuc m 1), a subtilisin-like protease of *Cucumis melo* in *Escherichia coli*. *Allergology International* **60**:61–67.
- Saravanan RS, Rose JKC** (2004) A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. *Proteomics* **4**:2522–2532.
- Scalbert A, Manach C, Morand C, Rémésy C, Jiménez L** (2005) Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **45**:287–306.
- Scalbert A, Williamson G** (2000) Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. *Journal of Nutrition* **130**:2073–2085.
- Schaller A** (2004) A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. *Planta* **220**:183–197.
- Schieberle P, Hofmann T** (1997) Evaluation of the character impact odorants in fresh strawberry juice by quantitative measurements and sensory studies on model mixtures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**:227–232.
- Schijlen EGWM, De Vos CHR, Van Tunen AJ, Bovy AG** (2004) Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants. *Phytochemistry* **65**:2631–2648.
- Schwab W** (1998) Application of stable isotope ratio analysis explaining the bioformation of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone in plants by a biological maillard reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**:2266–2269.

- Schwab W, Davidovich-Rikanati R, Lewinsohn E** (2008) Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. *The Plant Journal* **54**:712–732.
- Schwab W, Hoffmann T, Kalinowski G, Preuß A** (2011) Functional genomics in strawberry fruit through RNAi-mediated silencing. In: Husaini AM, Mercado JA (Eds) Genomics, transgenics, molecular breeding and biotechnology of strawberry. *Genes, Genomes and Genomics* **5**:91-101.
- Seeram NP, Adams LS, Zhang Y, Lee R, Sand D, Scheuller HS, Heber D** (2006) Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**:9329–9339.
- Shimada N, Aoki T, Sato S, Nakamura Y, Tabata S, Ayabe S** (2003) A cluster of genes encodes the two types of chalcone isomerase involved in the biosynthesis of general flavonoids and legume-specific 5-deoxy(iso)flavonoids in *Lotus japonicus*. *Plant Physiology* **131**:941–951.
- Shulaev V, Sargent DJ, Crowhurst RN, Mockler TC, Folkerts O, Delcher AL, Jaiswal P, Mockaitis K, Liston A, Mane SP, Burns P, Davis TM, Slovin JP, Bassil N, Hellens RP, Evans C, Harkins T, Kodira C, Desany B, Crasta OR, Jensen RV, Allan AC, Michael TP, Setubal JC, Celton JM, Rees DJG, Williams KP, Holt SH, Ruiz Rojas JJ, Chatterjee M, Liu B, Silva H, Meisel L, Adato A, Filichkin SA, Troggio M, Viola R, Lynn Ashman T, Wang H, Dharmawardhana P, Elser J, Raja R, Priest HD, Bryant DW, Fox SE, Givan SA, Wilhelm LJ, Naithani S, Christoffels A, Salama DY, Carter J, Lopez Girona E, Zdepski A, Wang W, Kerstetter RA, Schwab W, Korban SS, Davik J, Monfort A, Denoyes-Rothan B, Arus P, Mittler R, Flinn B, Aharoni A, Bennetzen JL, Salzberg SL, Dickerman AW, Velasco R, Borodovsky M, Veilleux RE, Folta KM** (2011) The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). *Nature Genetics* **43**:109–116.
- Singh R, Rastogi S, Dwivedi UN** (2010) Phenylpropanoid Metabolism in Ripening Fruits. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **9**:398–416.
- Sjulin TM, Dale A** (1987) Genetic diversity of North American strawberry cultivars. *Journal of the American Society of Horticultural Science* **112**:375–385.
- Smalle J, Vierstra RD** (2004) The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annual Review of Plant Biology* **55**:555–590.
- Smith CA, Want EJ, O'Maille G, Abagyan R, Siuzdak G** (2006) XCMS: Processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching and identification. *Analytical Chemistry* **78**:779-787.
- Smith CA** (2010) LC-MS preprocessing and analysis with xcms.
- Solovchenko A, Schmitz-Eiberger M** (2003) Significance of skin flavonoids for UV-B-protection in apple fruits. *Journal of Experimental Botany* **54**:1977–1984.
- Souci SW, Fachmann W, Kraut H** (2008) Food Composition and Nutrition Tables. Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart, 7. Auflage: S. 1058-1059.

- Spolaore S, Trainotti L, Casadoro G** (2001) A simple protocol for transient gene expression in ripe fleshy fruit mediated by *Agrobacterium*. *Journal of Experimental Botany* **52**:845–850.
- Sreekumar A, Poisson LM, Rajendiran TM, Khan AP, Cao Q, Yu J, Laxman B, Mehra R, Lonigro RJ, Li Y, Nyati MK, Ahsan A, Kalyana-Sundaram S, Han B, Cao X, Byun J, Omenn GS, Ghosh D, Pennathur S, Alexander DC, Berger A, Shuster JR, Wei JT, Varambally S, Beecher C, Chinnaiyan AM** (2009) Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression. *Nature* **457**:910–914.
- Stafford HA, Lester HH** (1984) Flavan-3-ol biosynthesis: The conversion of (+)-dihydroquercetin and flavan-3,4-cis-diol (leucocyanidin) to (+)-catechin by reductases extracted from cell suspension cultures of douglas fir. *Plant Physiology* **76**:184–186.
- Stehle F, Stubbs MT, Strack D, Milkowski C** (2008) Heterologous expression of a serine carboxypeptidase-like acyltransferase and characterization of the kinetic mechanism. *The FEBS Journal* **275**:775–787.
- Stevens JF, Page JE** (2004) Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health! *Phytochemistry* **65**:1317–1330.
- Stich K, Eidenberger T, Wurst F, Forkmann G** (1992) Flavonol synthase activity and regulation of flavonol and anthocyanin biosynthesis during flower development in *Dianthus caryophyllus* L. (carnation). *Zeitschrift für Naturforschung C* **47**:553–560.
- Stracke R, Ishihara H, Hupé G, Barsch A, Mehrrens F, Niehaus K, Weisshaar B** (2007) Differential regulation of closely related R2R3-MYB transcription factors controls flavonol accumulation in different parts of the *Arabidopsis thaliana* seedling. *The Plant Journal* **50**:660–677.
- Stushnoff C, Ducreux LJM, Hancock RD, Hedley PE, Holm DG, McDougall J, McNicol JW, Morris J, Morris WL, Sungurtas JA, Verrall SR, Zuber T, Taylor MA** (2010) Flavonoid profiling and transcriptome analysis reveals new gene – metabolite correlations in tubers of *Solanum tuberosum* L. *Journal of Experimental Botany* **61**:1225–1238.
- Sun W, Montagu M Van, Verbruggen N** (2002) Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. *Biochimica et Biophysica Acta* **1577**:1–9.
- Suutarinen J, Änäkäinen L, Autio K** (1998) Comparison of light microscopy and spatially resolved fourier transform infrared (FT-IR) microscopy in the examination of cell wall components of strawberries. *LWT - Food Science and Technology* **31**:595–601.
- Symons GM, Chua Y-J, Ross JJ, Quittenden LJ, Davies NW, Reid JB** (2012) Hormonal changes during non-climacteric ripening in strawberry. *Journal of Experimental Botany* **63**:4741–4750.
- Tautenhahn R, Patti GJ, Rinehart D, Siuzdak G** (2012) XCMS Online: a web-based platform to process untargeted metabolomic data. *Analytical Chemistry* **84**:5035–5039.
- Teutschbein J, Gross W, Nimtz M, Milkowski C, Hause B, Strack D** (2010) Identification and localization of a lipase-like acyltransferase in phenylpropanoid metabolism of tomato (*Solanum lycopersicum*). *Journal of Biological Chemistry* **285**:38374–38381.

- Thomma BPHJ, Cammue BPA, Thevissen K** (2002) Plant defensins. *Planta* **216**:193–202.
- Thévenin J, Pollet B, Letarnec B, Saulnier L, Gissot L, Maia-Grondard A, Lapierre C, Jouanin L** (2011) The simultaneous repression of CCR and CAD, two enzymes of the lignin biosynthetic pathway, results in sterility and dwarfism in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant* **4**:70–82.
- Toth J, Cutforth T, Gelinas AD, Bethoney KA, Bard J, Harrison CJ** (2001) Crystal structure of an ephrin ectodomain. *Developmental Cell* **1**:83–92.
- Treutter D** (2006) Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environmental Chemistry Letters* **4**:147–157.
- Tsukamoto S, Tomise K, Aburatani M, Onuki H, Hirorta H, Ishiharajima E, Ohta T** (2004) Isolation of cytochrome P450 inhibitors from strawberry fruit, *Fragaria ananassa*. *Journal of Natural Products* **67**:1839–1841.
- Tulipani S, Mezzetti B, Capocasa F, Bompadre S, Beekwilder J, De Vos CHR, Capanoglu E, Bovy A, Battino M** (2008) Antioxidants, phenolic compounds, and nutritional quality of different strawberry genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**:696–704.
- Ulrich D, Komes D, Olbricht K, Hoberg E** (2007) Diversity of aroma patterns in wild and cultivated *Fragaria* accessions. *Genetic Resources and Crop Evolution* **54**:1185–1196.
- Valério L, Meyer M De, Penel C, Dunand C** (2004) Expression analysis of the *Arabidopsis* peroxidase multigenic family. *Phytochemistry* **65**:1331–1342.
- Vanholme R, Demedts B, Morreel K, Ralph J, Boerjan W** (2010) Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiology* **153**:895–905.
- Van Ooijen JW** (2006) Joinmap, software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations. Kyazma BV, Wageningen, Niederlande.
- Vattem D, Shetty K** (2005) Biological functionality of ellagic acid: a review. *Journal of Food Biochemistry* **29**:234–266.
- Veitch NC** (2004a) Structural determinants of plant peroxidase function. *Phytochemistry Reviews* **3**:3–18.
- Veitch NC** (2004b) Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry* **65**:249–259.
- Ververidis F, Trantas E, Douglas C, Vollmer G, Kretschmar G, Panopoulos N** (2007) Biotechnology of flavonoids and other phenylpropanoid-derived natural products. Part I: Chemical diversity, impacts on plant biology and human health. *Biotechnology Journal* **2**:1214–1234.
- Vitali A, Botta B, Delle Monache G, Zappitelli S, Ricciardi P, Melino S, Petruzzelli R, Giardina B** (1998) Purification and partial characterization of a peroxidase from plant cell cultures of *Cassia didymobotrya* and biotransformation studies. *The Biochemical Journal* **331**:513–519.
- Vogt T** (2010) Phenylpropanoid Biosynthesis. *Molecular Plant* **3**:2–20.

- Volokita M, Rosilio-Brami T, Rivkin N, Zik M** (2011) Combining comparative sequence and genomic data to ascertain phylogenetic relationships and explore the evolution of the large *GDSL-lipase* family in land plants. *Molecular Biology and Evolution* **28**:551–565.
- Wade P** (1964) The insoluble cell wall polysaccharides of strawberries during the later stages of ripening and after preservation and storage under commercial conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **15**:51–56.
- Wang H, Cao G, Prior RL** (1996) Total antioxidant capacity of fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44**:701–705.
- Wang SY, Chen C-T, Wang CY, Chen P** (2007) Resveratrol content in strawberry fruit is affected by preharvest conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**:8269–8274.
- Wang SY, Feng R, Lu Y, Bowman L, Ding M** (2005) Inhibitory effect on activator protein-1, nuclear factor-kappaB, and cell transformation by extracts of strawberries (*Fragaria* × *ananassa* Duch.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**:4187–4193.
- Wang SY, Lin HS** (2000) Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**:140–146.
- Wang X, He X, Lin J, Shao H, Chang Z, Dixon RA** (2006) Crystal structure of isoflavone reductase from alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Journal of Molecular Biology* **358**:1341–1352.
- Ward G, Hadar Y, Bilkis I, Konstantinovskiy L, Dosoretz CG** (2001) Initial steps of ferulic acid polymerization by lignin peroxidase. *The Journal of Biological Chemistry* **276**:18734–18741.
- Wein M, Lavid N, Lunkenbein S, Lewinsohn E, Schwab W, Kaldenhoff R** (2002) Isolation, cloning and expression of a multifunctional O-methyltransferase capable of forming 2,5-dimethyl-4-methoxy-3(2H)-furanone, one of the key aroma compounds in strawberry fruits. *The Plant Journal* **31**:755–765.
- Whetten RW, Mackay JJ, Sederoff RR** (1998) Recent advances in understanding lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**:585–609.
- Williams L, Grigg SP, Xie M, Christensen S, Fletcher JC** (2005) Regulation of *Arabidopsis* shoot apical meristem and lateral organ formation by microRNA *miR166g* and its *AtHD-ZIP* target genes. *Development* **132**:3657–3668.
- Willson M, Whelan C** (1990) The evolution of fruit color in fleshy-fruited plants. *The American Naturalist* **136**:790–809.
- Winkel-Shirley B** (2001) Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology* **126**:485–493.
- Winkel-Shirley B** (2002) Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology* **5**:218–223.

- Wong C, Mazenod FP, Whitesides GM** (1983) Chemical and enzymatic syntheses of 6-deoxyhexoses. Conversion to 2,5-dimethyl-4-hydroxy-2,3-dihydrofuran-3-one (furanol) and analogues. *Journal of Organic Chemistry* **48**:3493–3497.
- Wu X, Knapp S, Stamp A, Stammers D, Jörnvall H, Dellaporta S, Oppermann U** (2007) Biochemical characterization of TASSELSEED 2, an essential plant short-chain dehydrogenase/reductase with broad spectrum activities. *The FEBS Journal* **274**:1172–1182.
- Wu Y, Sharp RE, Durachko DM, Cosgrove DJ** (1996) Growth maintenance of the maize primary root at low water potentials involves increases in cell-wall extension properties, expansin activity, and wall susceptibility to expansins. *Plant Physiology* **111**:765–772.
- Würtenberger E** (ZMP Bonn) (2009) Zehn Jahre Spargel & Erdbeer Profi: Was hat sich auf dem Erdbeermarkt bewegt? In *Spargel & Erdbeer Profi*, online-Ausgabe (17.01.2009).
- Xia Y, Yu K, Gao Q-M, Wilson EV, Navarre D, Kachroo P, Kachroo A** (2012) Acyl CoA binding proteins are required for cuticle formation and plant responses to microbes. *Frontiers in Plant Science* **3**:224.
- Xiao S, Li H-Y, Zhang J-P, Chan S-W, Chye M-L** (2008) *Arabidopsis* acyl-CoA-binding proteins ACBP4 and ACBP5 are subcellularly localized to the cytosol and ACBP4 depletion affects membrane lipid composition. *Plant Molecular Biology* **68**:571–583.
- Xie D-Y, Sharma SB, Dixon RA** (2004) Anthocyanidin reductases from *Medicago truncatula* and *Arabidopsis thaliana*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **422**:91–102.
- Xie D-Y, Sharma SB, Paiva NL, Ferreira D, Dixon RA** (2003) Role of anthocyanidin reductase, encoded by *BANYULS* in plant flavonoid biosynthesis. *Science* **299**:396–399.
- Xu M, Lewis R V** (1990) Structure of a protein superfiber: spider dragline silk. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **87**:7120–7124.
- Yahia EM** (2010) The contribution of fruit and vegetable consumption to human health. In: De la Rosa LA, Alvarez-Parrilla E, Gonzalez GA (Eds) *Fruit and Vegetable Phytochemicals*. Wiley-Blackwell, Ames, IA, USA, S. 3-51.
- Yamagata H, Masuzawa T, Nagaoka Y, Ohnishi T, Iwasaki T** (1994) Cucumisin, a serine protease from melon fruits, shares structural homology with subtilisin and is generated from a large precursor. *The Journal of Biological Chemistry* **269**:32725–32731.
- Yan N, Doelling J, Falbel T, Durski A, Vierstra R** (2000) The ubiquitin-specific protease family from *Arabidopsis*. *AtUBP1* and *2* are required for the resistance to the amino acid analog canavanine. *Plant Physiology* **124**:1828–1843.
- Yang C, Chen Y, Jauh G, Wang C** (2005) A lily ASR protein involves abscisic acid signaling and confers drought and salt resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **139**:836–846.
- Yeh S-Y** (2012) The lignification of strawberry fruit: Molecular basis and effects on fruit quality. Dissertation, Technische Universität München.

- Yonekura-Sakakibara K, Tohge T, Matsuda F, Nakabayashi R, Takayama H, Niida R, Watanabe-Takahashi A, Inoue E, Saito K** (2008) Comprehensive flavonol profiling and transcriptome coexpression analysis leading to decoding gene–metabolite correlations in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **20**:2160–2176.
- Zabetakis I, Holden MA** (1997) Strawberry flavour: Analysis and biosynthesis. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **74**:421–434.
- Zeng ZB** (1994) Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics* **136**:1457–1468.
- Zhang Y, Seeram NP, Lee R, Feng L, Heber D** (2008) Isolation and identification of strawberry phenolics with antioxidant and human cancer cell antiproliferative properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**:670–675.
- Zhao J, Pang Y, Dixon RA** (2010) The mysteries of proanthocyanidin transport and polymerization. *Plant Physiology* **153**:437–443.
- Zhou G-K, Kubo M, Zhong R, Demura T, Ye Z-H** (2007) Overexpression of *miR165* affects apical meristem formation, organ polarity establishment and vascular development in *Arabidopsis*. *Plant & Cell Physiology* **48**:391–404.
- Zifkin M, Jin A, Ozga J, Zaharia L, Scherthner J, Gesell A, Abrams S, Kennedy J, Constabel C** (2012) Gene expression and metabolite profiling of developing highbush blueberry fruit indicates transcriptional regulation of flavonoid metabolism and activation of abscisic acid metabolism. *Plant Physiology* **158**:200–224.
- Zorrilla-Fontanesi Y, Cabeza A, Domínguez P, Medina J, Valpuesta V, Denoyes-Rothan B, Sánchez-Sevilla J, Amaya I** (2011) Quantitative trait loci and underlying candidate genes controlling agronomical and fruit quality traits in octoploid strawberry (*Fragaria × ananassa*). *Theoretical and Applied Genetics* **123**:755–778.
- Zuurbier KWM, Fung S, Scheffer JJC, Verpoorte R** (1995) Formation of aromatic intermediates in the biosynthesis bitter acids in *Humulus lupulus*. *Phytochemistry* **38**:77–82.
- Zuurbier KWM, Leser J, Berger T, Hofte A, Schröder G, Verpoorte R, Schröder J** (1998) 4-Hydroxy-2-pyrone formation by chalcone and stilbene synthase with nonphysiological substrates. *Phytochemistry* **49**:1945–1951.

6. Anhang

Tab. 24: Relative Gesamtpolyphenolgehalte [mg equ./g TM] \pm SA in den verschiedenen Jahrgängen der Segregationspopulation *Capitola* \times CF1116. Aufgelistet sind nur Individuen (#), die in allen drei Jahren vorhanden waren.

#	2009	2010	2011	#	2009	2010	2011
6	41,09 \pm 1,59	45,23 \pm 15,86	43,69 \pm 9,25	94	24,34 \pm 1,86	23,35 \pm 3,88	25,92 \pm 2,48
7	30,10 \pm 3,82	34,31 \pm 7,09	32,87 \pm 5,89	97	29,29 \pm 4,53	21,51 \pm 1,89	34,14 \pm 5,37
8	36,96 \pm 9,26	32,58 \pm 4,30	32,25 \pm 6,09	98	29,05 \pm 5,38	32,74 \pm 4,33	36,05 \pm 4,81
9	24,76 \pm 5,81	29,76 \pm 5,63	28,81 \pm 5,74	101	28,05 \pm 7,62	19,59 \pm 1,58	29,06 \pm 4,39
10	18,02 \pm 3,57	18,54 \pm 2,30	22,91 \pm 4,66	108	28,66 \pm 1,01	32,39 \pm 4,13	31,35 \pm 6,75
14	28,34 \pm 7,27	35,07 \pm 4,70	36,47 \pm 8,37	109	23,61 \pm 4,66	22,31 \pm 2,34	27,09 \pm 6,82
15	24,91 \pm 5,96	30,68 \pm 7,14	30,68 \pm 6,20	110	26,19 \pm 3,97	20,58 \pm 4,31	35,73 \pm 14,28
16	24,78 \pm 5,12	30,21 \pm 5,49	28,22 \pm 6,14	111	33,30 \pm 0,36	21,62 \pm 4,37	31,27 \pm 4,98
19	24,64 \pm 6,34	26,10 \pm 6,01	26,94 \pm 6,40	113	30,18 \pm 3,10	29,14 \pm 4,47	36,00 \pm 3,57
34	29,03 \pm 6,80	42,26 \pm 11,94	35,93 \pm 6,06	114	23,46 \pm 3,74	30,07 \pm 5,39	36,52 \pm 7,37
43	32,76 \pm 9,58	31,34 \pm 4,64	34,16 \pm 5,98	122	27,42 \pm 2,19	30,42 \pm 4,77	37,21 \pm 8,39
46	20,66 \pm 4,88	17,45 \pm 5,01	23,67 \pm 2,92	126	19,32 \pm 1,80	24,22 \pm 3,69	32,68 \pm 6,63
49	16,35 \pm 1,60	16,04 \pm 1,95	19,32 \pm 4,23	139	20,62 \pm 3,09	28,40 \pm 6,11	33,89 \pm 9,67
53	30,74 \pm 6,65	29,30 \pm 5,08	31,76 \pm 6,41	148	20,80 \pm 2,31	23,50 \pm 3,76	36,56 \pm 9,36
56	26,59 \pm 4,57	27,86 \pm 2,99	37,66 \pm 6,50	172	34,79 \pm 2,17	26,16 \pm 4,34	35,63 \pm 8,44
57	34,44 \pm 6,02	31,38 \pm 4,78	33,43 \pm 2,59	180	21,30 \pm 1,87	17,75 \pm 1,36	26,64 \pm 8,46
62	26,74 \pm 5,01	28,01 \pm 4,97	39,96 \pm 2,89	183	23,63 \pm 3,91	25,21 \pm 1,64	28,82 \pm 7,66
75	22,84 \pm 4,41	22,97 \pm 3,88	29,21 \pm 1,01	198	26,63 \pm 6,14	41,98 \pm 3,48	39,34 \pm 8,11
76	22,26 \pm 5,50	20,13 \pm 4,02	34,90 \pm 2,47	199	24,60 \pm 3,61	33,47 \pm 3,33	31,98 \pm 3,45
81	30,86 \pm 9,88	27,25 \pm 4,31	31,99 \pm 3,87	210	24,58 \pm 6,87	24,20 \pm 2,86	32,46 \pm 4,42
83	26,48 \pm 5,50	29,72 \pm 4,37	33,57 \pm 2,93	215	31,10 \pm 2,63	33,97 \pm 4,76	38,44 \pm 4,89
85	35,83 \pm 1,75	36,93 \pm 2,94	37,52 \pm 3,26	216	30,38 \pm 3,18	36,08 \pm 5,48	39,61 \pm 5,57
88	28,38 \pm 3,26	31,15 \pm 6,14	33,37 \pm 4,98	218	24,69 \pm 3,05	25,60 \pm 1,75	29,21 \pm 4,28

Tab. 25: Relative Gesamtpolyphenolgehalte [mg equ./g TM] \pm SA der französischen Sortenkollektion in den Jahren 2010 und 2011.

Sorte	2010	2011
Betty	39,09 \pm 9,57	36,69 \pm 0,99
Camarosa	39,65 \pm 12,14	42,55 \pm 4,43
Candiss	31,10 \pm 8,20	19,99 \pm 1,07
Capitola	30,87 \pm 7,39	40,88 \pm 3,68
CF3107	24,43 \pm 4,09	28,93 \pm 1,41
CF3149	43,66 \pm 5,68	43,76 \pm 1,43
CF3453	38,28 \pm 7,78	38,31 \pm 2,96
CF4128	28,76 \pm 5,78	30,60 \pm 0,86
Charlotte	28,53 \pm 6,68	21,76 \pm 1,30
Ciflorette	27,57 \pm 8,12	30,08 \pm 1,60
Cigaline	27,84 \pm 7,69	29,48 \pm 2,00
Cigoulette	38,21 \pm 6,25	32,67 \pm 1,29
Cijosée	39,75 \pm 7,24	53,84 \pm 2,14
Ciloé	32,31 \pm 6,53	27,62 \pm 3,08
CIR705	22,45 \pm 4,43	24,93 \pm 1,97
Cirafine	41,02 \pm 13,6	47,95 \pm 3,98
Cirano	29,07 \pm 7,60	33,92 \pm 1,52
Cireine	30,30 \pm 5,56	31,12 \pm 1,28
DarSelect	25,39 \pm 5,86	33,77 \pm 1,77
Dover	37,89 \pm 5,55	50,36 \pm 2,12
Elsanta	37,98 \pm 9,11	29,16 \pm 1,51
Mara des Bois	35,75 \pm 9,32	34,74 \pm 2,37
Orléans	28,95 \pm 7,07	34,09 \pm 0,88
Pájaro	24,47 \pm 3,43	46,18 \pm 2,47
Saint Joseph	28,66 \pm 9,12	18,56 \pm 1,33
Sweet Charlie	24,89 \pm 6,65	29,66 \pm 1,43

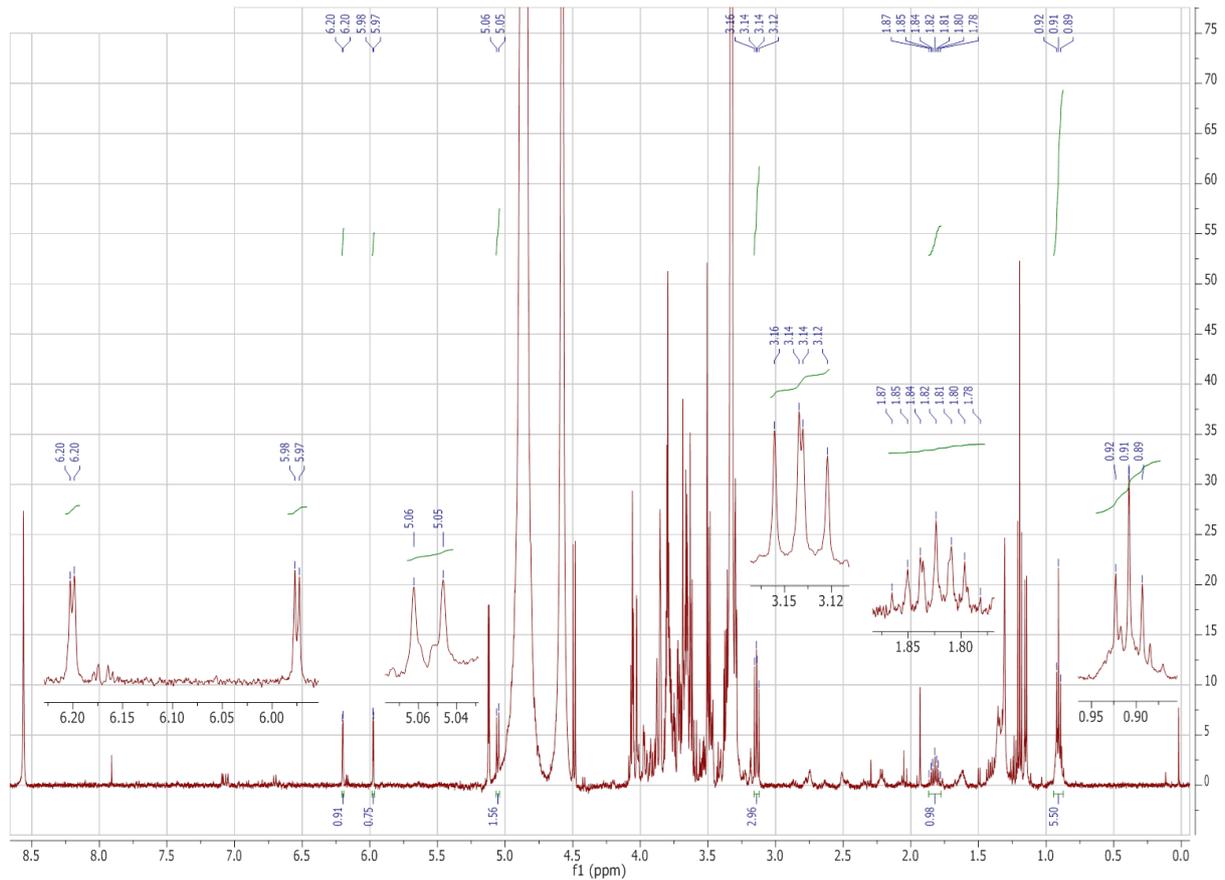


Abb. 58: ^1H -NMR-Spektrum des aufgereinigten Metaboliten 2-(3-Methylbutanoyl)-phlorogluciny-1- β -D-glucopyranosid. Zusammenfassung und Erklärung der Signale in **Tab. 22**, S. 118.

Tab. 26: Relative Konzentrationen [%o equ. TM] \pm SA verschiedener Metabolitgruppen der zur 2D-Gelelektrophorese eingesetzten Genotypen aus der Segregationspopulation von Capitola \times CF1116 aus dem Jahr 2009 (Sp. 2009). In Klammern sind die minimalen und maximalen relativen Konzentrationen der Sp. 2009 angegeben.

Metabolitgruppe	#7	#64	#111	#187
Gesamt-PPs (16,4 - 41,1)	30,10 \pm 3,82	18,67 \pm 2,88	33,30 \pm 0,36	31,49 \pm 6,24
Phenylpropanoide (0,5 - 4,3)	1,17 \pm 0,08	2,22 \pm 0,34	2,08 \pm 0,16	1,50 \pm 0,16
Flavonoide (0,8 - 2,2)	2,22 \pm 0,68	1,27 \pm 0,18	1,35 \pm 0,43	1,29 \pm 0,08
Anthocyane (14,2 - 37,5)	26,55 \pm 4,16	15,00 \pm 2,77	29,8 \pm 0,91	28,63 \pm 6,16

ATGGCTGCTACTTCAAAGCTCATCTTCCTCCTGATCCAAGGGATCGTTCTGCTTTC
TGTTCTTGACTGTGCAAATGCACAGGGACTGAAAGTAGGGTTCTATGCGAAGTC
GTGCCCCGGAAGCTGAGGCCATAGTGAAGAAGGTTATCGCTCAAACCTTGTCGGT
AGCACCTTCACTTGGTGGTCCTTTGCTGAGAATGCATTTCCATGATTTGCTTTGTCA
GGGGTTGCGACGGTTCAGTGCTACTGAATTCCTTCATCAAACCAAGCCGAGAAGG
ATGCAATTCCAAACCTAAGTCTTCGAGGGTATGGAGTCATTGACAGAGTCAAGTC
TGCTTTGGAGAAAGCATGCCCTGGAGTGGTTTCATGTTCTGACATCTTAGCCGTT
GTAGCTAGAGATGTCGTCGTCGCGGACATGGGAGTACATTGGGATGTTGAAACT
GGACGAAGAGATGGTAATGTATCAAACATGATAGATGCCTTGCGAAATCTCCCAG
CACCTAGTTCAAACATCTCTTCATTAATAAATCAAGCTTTGCATCAAAGGGTCTAAGC
GCTAAAGATCTTGTAGTACTATCAGGGAGTCACACCATCGGGACATCTCACTGCT
CTTCCTTCACCAACCGTCTTTATAACTTCACCGGAAAGAACGTAAACGATACCGAT
CCCACCTTGGATAGCAACTACATTCGAAAGTTGAAGATGAAATGCAAGCCCAACG
ACCAAACACTCTCGTTGAGATGGATCCTGGGAGTTTCAAGACATTTGACGGTTC
TTACTATACTCTTGTGGCCAAGAGAAGGGGTCTCTTTTCAGTCAGATGCAGCTCTTC
TTGATGACAGTGAAACCAAAGCTTACGTGACAAGCCATGCCGTACCAAAGGGAG
AAGCTAGTTTCTTGAAGGATTTTGGTGTTTCAATGGTGAACATGGGAAGGATCG
GAGTTCTCACGGGGAATGCAGGAGAGATCAGGAAAGTGTGCAGCAAGATCAATT
AG

MAATSKLIFLLIQGIVLLSVLDCANAQGLKVGIFYAKSCPEAEAIKKVIAQTLVAPSL
GGPLLRMHFHDCFVRGCDGSVLLNSSNQAEKDAIPNLSLRGYGVIDRVKSALEKAC
PGVVSCSDILAVVARDVVVADMGVHWDVETGRRDGNVSNMIDALRNLPAPSSNISSL
KSSFASKGLSAKDLVVLGSHITIGTSHCSSFTNRLYNFTGKNVNDTDPITLDSNYIAKL
KMKCKPNDQTLVEMDPGSFKTFDGSYYTLVAKRRGLFQSDAALLDDSETKAYVTS
HAVPKGEASFLKDFGVSMVNMGRIGVLTGNAGEIRKVC SKIN

Abb. 59: Nukleotidsequenz (**oben**) und korrespondierende Aminosäuresequenz (**unten**) der funktionell charakterisierten *F. × ananassa* Peroxidase 27 (FaPRX27) (UniProt.org Nr.: JX290513).

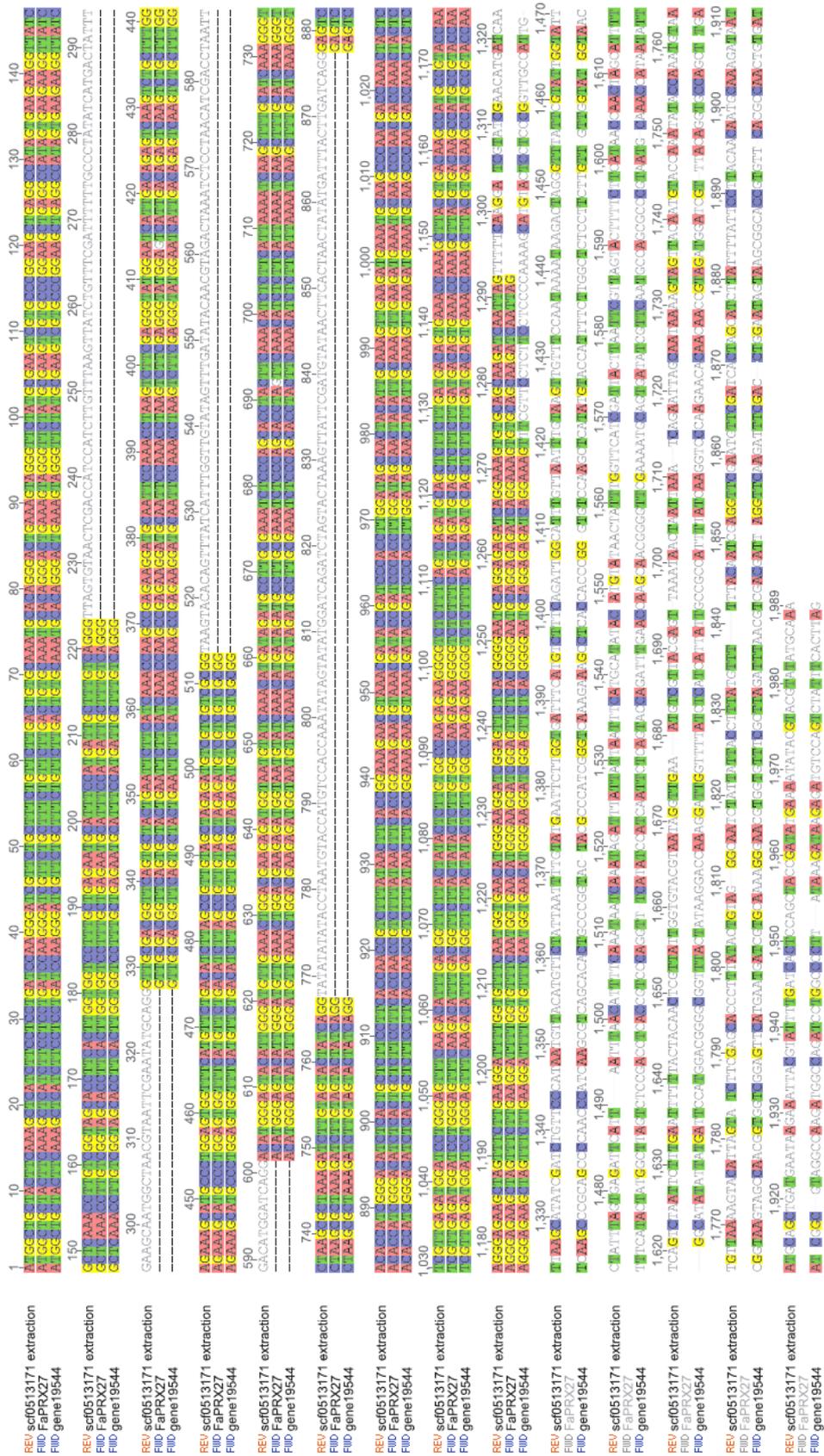


Abb. 60: Abgleich der Nukleotidsequenzen von Scaffold 0513171 (Teilsequenz aus dem Genom von *F. vesca* (Shulaev *et al.*, 2011)), *FaPRX27* und *gene19544* (Sequenz aus EST-Datenbank).

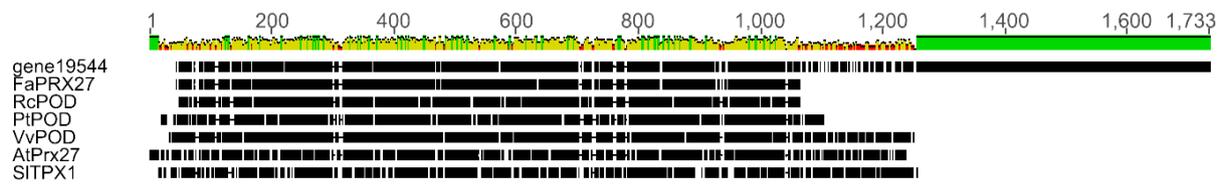


Abb. 61: Abgleich der Nukleotidsequenzen von gene19544, *F. × ananassa* Peroxidase 27 (*FaPRX27*) und homologen Sequenzen von *Ricinus communis* (*RcPOD*, [gi|255555006|ref|XM_002518495.1|](#)), *Populus trichocarpa* (*PtPOD*, [gi|224113902|ref|XM_002316574.1|](#)), *Vitis vinifera* (*VvPOD*, [gi|225444398|ref|XM_002268324.1|](#)), *Arabidopsis thaliana* (*AtPRX27*, [gi|30678297|ref|NM_110985.2|](#)), *Solanum lycopersicum* (*SITPX1*, [gi|678546|gb|L13654.1|TOMTPX1A](#)).