

Einfluss von Umwelt und Genotyp auf die Gehalte der Sekundärmetaboliten und des Allergens Fra a 1 von Erdbeeren (*Fragaria x ananassa*)

Johanna Magdalena Trinkl

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät TUM School of Life Sciences der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Wolfgang Liebl

Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. Wilfried Schwab
2. Prof. Dr. Corinna Dawid

Die Dissertation wurde am 01.07.2020 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät TUM School of Life Sciences am 16.09.2020
angenommen.

In jedem Ende liegt ein neuer Anfang.

Miguel de Unamuno

Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Willi Schwab für die Überlassung des Themas, seine ansteckende Begeisterung für die Forschung und seine Unterstützung.

Ich bedanke mich außerdem bei all meinen Projektpartnern an der Universidad de Málaga (UMA), an der Università Politecnica delle Marche (UPM), am Instytut Ogronictwa (INHORT), bei INVENIO (ehemals Ciref), am Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA), am Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), an der Hansabred GmbH & Co. KG und am Julius Kühn-Institut (JKI) für ihre Zusammenarbeit und Unterstützung. Das betrifft insbesondere Luca, Silke und Susan.

Ich danke auch meinen fleißigen Studentinnen Chiara, Andja und Ann-Katrin für ihre Hilfe.

Des Weiteren möchte ich Tom und Rafal für ihr Engagement danken. Ihr habt immer dafür gesorgt, dass trotz mechanischer und technischer Probleme bei unserer Arbeitsgruppe alles am Laufen gehalten wurde.

Vielen Dank Tom und Willi, dass ihr mir ermöglicht habt öfter von daheim aus zu arbeiten – auch vor Covid-19. Das war für mich nicht nur zeitlich ein Gewinn.

Danke Katja, Tom und Julian für eure Einführungen in die Arbeitswelt der Biotechnologie. Ich habe viel von euch gelernt.

Mein Dank gilt auch Ruth, die insbesondere bei der Kultivierung der Erdbeerpflanzen eine große Hilfe war.

Vielen Dank Isabelle, Rafal und Soraya für eure offenen Ohren und dass ich mich immer auf euch verlassen konnte.

Auch bei allen weiteren Mitarbeitern an der Professur für Biotechnologie der Naturstoffe möchte ich mich herzlich für die Hilfsbereitschaft und die offene Atmosphäre bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich während meiner Promotion stets unterstützt hat. Danke Mama, Papa, Martina, Matthias und Korbinian!

Publikationen

Die der Dissertation zugrundeliegenden praktischen Arbeiten wurden von September 2016 bis April 2020 an der Professur der Biotechnologie der Naturstoffe unter der Leitung von Prof. Dr. Wilfried Schwab am Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München durchgeführt. Die Dissertation entstand im Rahmen des GoodBerry-Projekts, gefördert durch das Forschungs- und Innovationsprogramm der Europäischen Union Horizont 2020 (Grant Agreement Number 679303).

Orginaltitel

Haugeneder, A.; Trinkl, J.; Härtl, K.; Hoffmann, T.; Allwood, J. W.; Schwab, W. (2018): Answering biological questions by analysis of the strawberry metabolome. *Metabolomics* 14 (11). 145.

Rakesh, J.; Trinkl, J.; Haugeneder, A.; Härtl, K. Franz-Oberdorf, Giri, A.; K.; Hoffman, T.; Schwab, W. (2019): Semirational design and engineering of grapevine glucosyltransferases for enhanced activity and modified product selectivity. *Glycobiology* 29 (11). 765–775.

Vorträge

Trinkl, J.; Schwab, W. (2018): The GoodBerry project: Improving the stability of high-quality traits of berry. Forschungsseminar der Lebensmittelchemie. Freising

Trinkl, J.; Habegger, R.; Schwab, W. (2018): Profile der Sekundärstoffwechselprodukte von gentechnisch veränderten Erdbeerpflanzen. GHL Symposium. Freising

Trinkl, J.; Haugeneder, A.; Hoffmann, T.; Durán, S.; Jiménez, L.; Pott, D.; Osorio, S.; Muñoz del Rio, P.; Sánchez Sevilla, J. F; Amaya, I.; Petit, A.; Chartier, P.; Mazzoni, L.; Mezzetti, B.; Siucinska, K.; Masny, A.; Olbricht, K.; Lesemann, S.; Schwab, W. (2019): GoodBerry: Verbesserung der Fruchtqualität- und Stabilität von Europäischen Beeren. 48. Deutscher Lebensmittelchemikertag. Dresden

Poster

Trinkl, J.; Haugeneder, A.; Schwab, W. (2018): Einfluss von Genotyp und Umwelt auf die Sekundärmetaboliten einer Kreuzungspopulation von Erdbeerpflanzen. 47. Deutscher Lebensmittelchemikertag. Berlin

Trinkl, J.; Habegger, R.; Hoffmann, T.; Flachowsky, H; Hanke, M.-V.; Schwab, W. (2019): Impact of the strawberry allergen Fra a 1.02 and the associated protein FaAP on secondary metabolism. IX North American Strawberry Symposium. Orlando, USA

Trinkl, J.; Haugeneder, A.; Hoffmann, T.; Durán, S.; Jiménez, L.; Pott, D.; Osorio, S.; Muñoz del Rio, P.; Sánchez Sevilla, J. F; Amaya, I.; Petit, A.; Chartier, P.; Mazzoni, L.; Mezzetti, B.; Siucinska, K.; Masny, A.; Olbricht, K.; Lesemann, S.; Schwab, W. (2019): GoodBerry: Verbesserung der Fruchtqualität- und Stabilität von Europäischen Beeren. 48. Deutscher Lebensmittelchemikertag. Dresden

Trinkl, J.; Haugeneder, A.; Hoffmann, T.; Muñoz del Rio, P.; Sánchez Sevilla, J. F; Amaya, I.; Petit, A.; Chartier, P.; Mazzoni, L.; Mezzetti, B.; Siucinska, K.; Masny, A.; Olbricht, K.; Lesemann, S.; Schwab, W. (2019): GoodBerry: Improving the stability of high-quality traits of berry. 3rd Global Bioeconomy Alliance Symposium. Ubatuba, Brasilien

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	II
Publikationen	III
Abkürzungen	XI
Zusammenfassung	XV
Summary	XVIII
1. Einleitung	1
1.1. Erdbeeren	1
1.1.1. Kultivierung	1
1.1.2. Morphologie und Ursprünge	3
1.1.3. Inhaltsstoffe der Erdbeerfrucht	5
1.2. Polyphenole	7
1.2.1. Biosynthese	7
1.2.1.1. Gallussäure, Ellagsäure, Gallotannine und Ellagtannine	8
1.2.1.2. Phenylpropanoide und Lignin	9
1.2.1.3. Flavonoide	11
1.2.1.4. Modifizierende Enzyme	13
1.2.1.5. Regulierung der Biosynthese	15
1.2.2. Pflanzenfunktion.....	17
1.2.3. Effekte auf den Menschen.....	18
1.3. Allergene	19
1.3.1. Klassifizierung der Allergene	20
1.3.2. Effekte der Bet v 1 Homologe auf den Menschen.....	21
1.3.3. Bet v 1 Homologe der Erdbeere	23
1.3.4. Pflanzenfunktion der Bet v 1 Homologe.....	24
1.4. Aufgabenstellung	27
2. Material und Methoden	29
2.1. Material	29
2.1.1. Pflanzliches Material	29

Inhaltsverzeichnis

2.1.1.1.	GoodBerry-Erdbeerkreuzungspopulation	29
2.1.1.2.	Französische Erdbeerkreuzungspopulation.....	30
2.1.1.3.	Transgenes Pflanzenmaterial.....	31
2.1.2.	Messkontrollstandards	32
2.1.2.1.	Allergen-Standard	32
2.1.2.2.	LC-MS Erdbeerstandard	33
2.1.3.	Chemikalien	33
2.1.4.	Medien, Puffer und Lösungen	36
2.1.5.	SDS-PAGE-Gel.....	39
2.1.6.	Agarose-Gel.....	40
2.1.7.	Bakterienstämme, Vektoren, Enzyme, Antikörper, Kits und Sonstiges	40
2.2.	Geräte.....	43
2.2.1.	Flüssigkeitschromatographie-Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie (LC-ESI-MS).....	43
2.2.2.	Sonstige Geräte	44
2.3.	Methoden	45
2.3.1.	Polyphenol Analytik.....	45
2.3.1.1.	Polyphenolextraktion.....	45
2.3.1.2.	Identifizierte Metaboliten	46
2.3.1.3.	Quantifizierung.....	49
2.3.1.4.	Ungerichtete Analyse	49
2.3.2.	Grundlegende Molekularbiologische Methoden.....	49
2.3.2.1.	DNA-Extraktion	49
2.3.2.2.	Polymerase-Kettenreaktion	50
2.3.2.3.	Aufreinigung des PCR-Produkts.....	50
2.3.2.4.	A-Tailing.....	50
2.3.2.5.	Ligation	51
2.3.2.5.1.	Ligation in pGEM-T Vector	51
2.3.2.5.2.	Ligation in pGEX-4T-1 Vector	51
2.3.2.6.	Herstellung kompetenter Zellen.....	52

Inhaltsverzeichnis

2.3.2.6.1. Chemo-kompetente Zellen	52
2.3.2.6.2. Elektrokompente Zellen.....	52
2.3.2.7. Plasmid Transformation	52
2.3.2.7.1. Transformation mit Hitzeschock	52
2.3.2.7.2. Transformation mit elektrokompenten Zellen.....	53
2.3.2.8. Colony PCR	53
2.3.2.9. Agarosegelelektrophorese	54
2.3.2.10. Plasmid Aufreinigung	54
2.3.2.11. Bradford	54
2.3.2.12. SDS-PAGE	54
2.3.2.13. Gel-Färbung.....	54
2.3.2.14. Western-Blot	54
2.3.2.15. Proteinexpression	55
2.3.3. Aktivitäts-Test von rekombinanten Malonyltransferasen	55
2.3.3.1. Herstellung des rekombinanten Proteins	55
2.3.3.1.1. Klonierung.....	55
2.3.3.1.2. Zellaufschluss	56
2.3.3.1.3. Proteinaufreinigung mit GST-Tag.....	56
2.3.3.2. Malonyltransferase Aktivitäts-Assay	56
2.3.4. Analyse von Fra a 1.02 aus Erdbeeren	57
2.3.4.1. Herstellung des rekombinanten Proteins	57
2.3.4.1.1. Zellaufschluss	57
2.3.4.1.2. Aufschluss Inclusion Bodies	57
2.3.4.1.3. Proteinaufreinigung mit His-Tag	58
2.3.4.1.4. Regeneration His-Tag-Resin.....	58
2.3.4.1.5. Endaufreinigung von Fra a 1.02 rek	58
2.3.4.2. Proteinextraktion aus Erdbeeren	59
2.3.4.3. Indirekt kompetitives ELISA.....	59
2.4. Software.....	60
3. Ergebnisse.....	63

3.1. Validierungsparameter der verwendeten Analysemethoden	63
3.1.1. LC-MS-Screening der Sekundärmetaboliten	63
3.1.2. Quantifizierung des Allergengehaltes mittels indirekt kompetitiven ELISA	67
3.2. Sekundärmetabolitenanalyse von Kreuzungspopulationen	67
3.2.1. Französische Kreuzungspopulation 'Capitola' x 'CF1116'	67
3.2.2. GoodBerry-Kreuzungspopulation 'Senga Sengana' x 'Candongga'	73
3.2.2.1. Einfluss von Genotyp und Umwelt.....	74
3.2.2.1.1. Genotypeneffekte.....	75
3.2.2.1.2. Umwelteffekte	78
3.2.2.2. Korrelationen.....	81
3.3. Allergengehalte der GoodBerry-Kreuzungspopulation 'Senga Sengana' x 'Candongga'	86
3.3.1. Einfluss von Genotyp und Umwelt.....	86
3.3.2. Korrelationen.....	87
3.4. Identifizierung von Anthocyan-Malonyltransferasen der Erdbeere	89
3.4.1. Genexpression in <i>Fragaria vesca</i>	89
3.4.2. Gen- und Proteinsequenzvergleich der Erdbeerkultivare.....	91
3.4.3. Aktivitäts-Assay.....	93
3.5. Sekundärmetabolitenprofil transgener Pflanzen	96
3.5.1. siFLS-Pflanzen.....	96
3.5.1.1. Veränderungen in den Früchten der siFLS-Linie	97
3.5.1.2. Veränderungen in den Blättern der siFLS-Linie.....	100
3.5.1.3. Veränderungen in den Wurzeln der siFLS-Linie	100
3.5.1.4. Veränderungen in den Blüten der siFLS-Linie	100
3.5.2. siFra a 1.02-Pflanzen	101
3.5.2.1. Veränderungen in den Früchten der siFra a 1.02-Linie.....	103
3.5.2.2. Veränderungen in den Blättern der siFra a 1.02-Linie	104
3.5.2.3. Veränderungen in den Wurzeln der siFra a 1.02-Linie.....	105
3.5.2.4. Veränderungen in den Blüten der siFra a 1.02-Linie.....	105
3.5.3. Spanische siFra a 1.02-Früchte.....	106

3.5.3.1.	<i>Metabolic Profiling</i> der spanischen siFra 1.02-Früchte	107
3.5.3.2.	Ungerichtete Analyse der spanische siFra 1.02-Früchte	109
4.	Diskussion	113
4.1.	Metabolitenprofil der Erdbeer-Kreuzungspopulationen	113
4.1.1.	Umwelteffekt auf die Metabolitengehalte	113
4.1.2.	Genotypeneffekt auf die Metabolitengehalte	117
4.1.3.	Korrelationen der Metabolitengehalte	123
4.2.	Allergengehalte der GoodBerry-Kreuzungspopulation ‘Senga Sengana’ x ‘Candongá’	128
4.3.	Identifizierung von Anthocyan-Malonyltransferasen der Erdbeere	132
4.3.1.	Aktivitäten der FaMAT-Kandidaten	132
4.3.2.	Malonylierung von HDMF-glucosid	137
4.3.3.	Malonylierung von Flavonoiden	141
4.4.	Einfluss der FaFLS	142
4.5.	Einfluss des siFra a 1.02	145
4.6.	Schlussfolgerung	147
5.	Literatur	149
6.	Anhang	187

Abkürzungen

Abkürzungen

°		Cap	Capitola
		Cat	Catechin
°C	Grad Celsius	CHI	Chalkonisomerase
		CHS	Chalkonsynthase
μ		cm ²	Quadratzentimeter
μg	Mikrogramm	Cy	Cyanidin
μl	Mikroliter	Cy-3-glc	Cyanidin-3-glucosid
		D	
4		d.h	das heißt
4CL	p-Cumaryl-CoA-Ligase	dATPS	Desoxyriboadenosintriphosphat
		DFR	Dihydroflavonol-4-Reduktase
Å		DiECA	Natriumdiethyldithiocarbaminat
Å	Ångström	DIN	Deutsches Institut für Normung
A		DMF	Dimethylformamid
AAT	Anthocyan-Acyltransferase	DMMF	2,5-Dimethyl-4-methoxy-3(2H)-furanon
ABC	ATP binding cassette	DMSO	Dimethylsulfoxid
Afze	Afzelechin	DNA	Desoxyribonukleinsäure
AK	Antikörper	dNTPS	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ANR	Anthocyanidin-Reduktase	E	
ANS	Anthocyanidin-Synthase	E. coli	Escherichia coli
APS	Ammoniumpersulfat	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
AS	Aminosäure	EIC	Extracted Ion Chromatogramm
AT	Acyltransferase	ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ATP	Adenosintriphosphat	Equ.	Äquivalente
		et al.	und andere
B		F	
BCIP	(Dinatrium)-5-Brom-4-chlor-3-iodoxylphosphat	F3GT	Flavonoid-3-O-Glucosyltransferase
Blattst.	Blattstadium	F3'H	Flavonoid-3'-Hydroxylase
bp	Basenpaare	FaEO	Enon-Oxidoreduktase
BSA	Bovine Serum Albumin	FaMAT	Malonyltransferase aus <i>Fragaria x ananassa</i>
		FaOMT	O-Methyltransferase aus <i>Fragaria x ananassa</i>
C		FHT	Flavanon-3-Hydroxyltransferase
C3H	Kaffeesäure-3-Hydroxylase	FLS	Flavonol-Synthase
C4H	Zimtsäure-4-Hydroxylase	Fur-glc	Furaneol-glucosid
		Fur-malglc	Furaneol-malonylglucosid

Abkürzungen

g		L	
<i>g</i>	<i>g</i> -Kraft	L	Liter
		LAR	Leucoanthocyanidin-Reduktase
		LC-ESI-MS	Flüssigkeitschromatographie-Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie
		LC-MS	Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie
GC-O	Gaschromatographie-Olfaktometrie	LMIV	Lebensmittelinformationsverordnung
GGT	Gallussäure-Glucosyltransferase	LOD	Nachweisgrenze
Glc	Glucosid, Glucose	LOQ	Bestimmungsgrenze
Glu	Glucuronid		
GST	Glutathion-S-Transferase		
GT	Glucosyltransferase		
		M	
		M	Molar
		<i>m/z</i>	Masse/ Ladung
h	Stunden	mA	Milliampere
ha	Hektar	mal	malonyl
HDMF	Furaneol bzw. 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon	MALDI-IMS	Matrix-unterstützte-Laser-Desorptions-Ionsisations-Bildgebungs-Massenspektrometrie
hg	Hektogramm	MAT	Malonyltransferase
HHDP	3,4,5,3',4',5'-Hexahydroxydiphensäurel	MATE	Multi-Antimicrobial Extrusion bzw. Multidrug and Toxin Extrusion
HMMF	4-Hydroxy-5-methyl-2-methylen-3(2H)-furanon	mg	Milligramm
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie	min	Minuten
HW4	Hawaii 4	ml	Milliliter
		mm	Millimeter
		MQ-Wasser	MilliQ-Wasser
		MWCO	Molecular Weight Cut Off
		N	
IgE	Immunglobulin E	NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
INRA	Institut national de la recherche agronomique	ng	Nanogramm
Intens.	Intensität	nm	Nanometer
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid	Nr.	Nummer
IS	Interner Standard		
IUIS	International Union of Immunological Societies		
		O	
K	Kaempferol	OMT	O-Methyltransferase
K-3-glc	Kaempferol-3-glucosid	ox.	oxidiert
kb	Kilobasen		
kDa	Kilodalton		
Konz.	Konzentration		
kt	Kilotonnen		

Abkürzungen

P		S
p.a.	für die Analyse	SCPL-ATs <i>serine carboxy peptidase-like acyltransferases</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	SDH Shikimat-Dehydrogenase
PAL	Phenylalanin-Ammoniak-Lyase	SDS Natriumlaurylsulfat
PC	Hauptkomponente (Principal Component)	sec Sekunden
PCA	Hauptkomponentenanalyse	ssp. Unterart
PCR	Polymerasekettenreaktion	STD Standardabweichung
Pg	Pelargonidin	
Pg-3-glc	Pelargonidin-3-glucosid	T
PGG	1,2,3,4,6- Pentagalloylglucose	t Tonnen
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid	TEMED N, N, N', N'-Tetramethylendiamin
ppm	Parts per million	TMB 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
PSPG	<i>plant secondary product glycosyltransferase</i>	Tris Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
PVPP	Polyvinylpyrrolidon	
		U
Q		u atomare Masseneinheit
qPCR	quantitative PCR	U Enzymeinheit
QTL	Quantitative Trait Locus	u.a. unter anderem
Qu-3-glc	Quercetin-3-glucosid	UV Ultraviolettstrahlung
R		V
Rdv	Reine des Vallées	v Volt
red.	reduziert	
rek.	rekombinant(e)	W
rel.	relativ(e)	WHO World Health Organization
RNA	Ribonukleinsäure	
RNAi	RNA-Interferenz-induzierten Gen-Stilllegung g	X
ROS	reaktive Sauerstoff-Spezies	X-β-Gal 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid
rpm	Umdrehungen pro Minute	
r_{SP}	Spearman'scher Rangkorrelationskoeffizient	Y
RT	Retentionszeit, Raumtemperatur	YW Yellow Wonder
Rut	Rutinosid	

Nukleinbasen Abkürzungen

Symbol	Nukleinbase
A	Adenin
C	Cytosin
T	Thymin
G	Guanin

Aminosäuren-Buchstabencode

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

Zusammenfassung

Die Erdbeere ist eine weltweit konsumierte Frucht und insbesondere wegen ihres ansprechenden aromatischen Profils und Nährstoffgehalts sehr beliebt.

Erdbeeren enthalten unter anderem Polyphenole, eine Klasse von Pflanzeninhaltsstoffen, deren Konsum mit positiven Effekten auf die menschliche Gesundheit in Zusammenhang gebracht wird. Weiterhin enthalten die Früchte jedoch auch Fra a 1 Proteine, welche dem Hauptbirkenpollenallergen Bet v 1 strukturell ähneln, wodurch es zu einer Kreuzreaktion kommen kann, die zu einer Pollen-assoziierten-Nahrungsmittelallergie für Erdbeeren führt. Dadurch wird die Verfügbarkeit dieser Nährwertstoffquelle für betroffene Allergiker eingeschränkt.

In Pflanzen sind Polyphenole Teil des Pflanzenabwehrsystems und haben darüber hinaus auch eine regulierende Funktion, wie beispielsweise beim Pflanzenwachstum. Die Sekundärmetaboliten der Erdbeerpflanzen umfassen mehrere Verbindungen, die zur Klasse der Polyphenole gehören. Unter anderem enthalten sie die Flavonoide, Anthocyane, Flavanole und Flavonole, sowie Phenylpropanoide und Polyphenol-Polymere, wie Proanthocyanidine, Ellagittannin und Lignin. Die Biosynthese der Polyphenole ist durch ein komplexes System reguliert, welches u.a. Pflanzenhormone, Expressionsfaktoren und Enzyme, die spezifische Syntheseschritte katalysieren, umfasst. Um den Metabolitenfluss und dessen Regulierung besser zu verstehen, wurde das Metabolitenprofil zweier Kreuzungspopulationen (GoodBerry-Population und französische Kreuzungspopulation), sowie transgener RNAi Pflanzen analysiert. Um neben genetischen Effekten auch den Effekt der Umwelt auf die Metabolitkonzentrationen bewerten zu können, wurde die GoodBerry-Population an fünf verschiedenen Standorten in Europa (Spanien, Italien, Frankreich, Deutschland und Polen) angebaut.

Die Analysen zeigten, dass die Metabolitkonzentrationen in der Erdbeerfrucht unterschiedlich von der Umwelt beeinflusst wurden. Nur wenige Flavanolgehalte zeigten eine Varianz abhängig von der Umwelt. Im Gegensatz dazu war bei jedem der analysierten Flavonole ein Umwelteffekt zu beobachten. Die einzelnen Flavanolgehalte wurden jedoch nicht gleich beeinflusst. Das unterschiedliche Verhalten ermöglichte die Einteilung der Flavonole in zwei Gruppen, deren Konzentrationen unabhängig voneinander von der Umwelt beeinflusst wurden. Eine dieser Gruppen besteht aus Quercetin-glucosid, Quercetin-glucuronid und Kaempferol-glucuronid, während die andere Gruppe Kaempferol-glucosid, Kaempferol-cumarylglucosid und Kaempferol-malonylglucosid enthält. Das gemeinsame Merkmal der zuletzt genannten Metaboliten ist ihr bevorzugtes Vorkommen in den Nüsschen, den Samen der Erdbeerfrüchte.

Darüber hinaus wurde das Polyphenol-Profil der Erdbeerpopulationen stark von dem Genotyp beeinflusst. Für einzelne Metaboliten konnte eine klare Vererbung durch einen Elternteil identifiziert werden. Dies war der Fall für die malonylierten Anthocyane Pelargonidin-3-malonylglucosid und Cyanidin-3-malonylglucosid. Diese beiden Metaboliten wiesen eine hohe Variabilität zwischen den Genotypen auf. Zwischen dem Genotyp mit dem geringsten Gehalt und dem Genotyp mit dem höchsten Gehalt betrug der Faktor bis zu 100. Für beide Anthocyane konnte dieselbe Segregation innerhalb der Populationen beobachtet werden. Unter Berücksichtigung der Konzentrationsverteilung der malonylierten Anthocyane innerhalb der Erdbeerkultivare und -genotypen konnte ein dominantes Anthocyan-Malonyltransferase-Gen als verantwortlich für diese Segregation postuliert werden.

In Folge davon wurden Malonyltransferase-Kandidatengene isoliert und analysiert. Zwei der fünf Kandidatengene resultierten in aktiven rekombinanten Proteinen. Diese Enzyme akzeptierten Flavonole, sowie HDMF-glucosid, neben Anthocyanen als Acyl-Akzeptor-Substrate und variierten in ihrer Aktivität, aber nicht in ihrer Substratspezifität. Zwischen den beiden Eltern-Kultivaren der GoodBerry-Population, 'Candongga' und 'Senga Sengana' konnte ein Unterschied in ihrer Enzymaktivität festgestellt werden. Dies war die Folge eines Unterschieds im genetischen Code und damit in der Primärstruktur der jeweiligen Proteine. Dieser Unterschied könnte auch die Ursache für das kontrastreiche Metabolitenprofil sein. Um dies vollständig zu bestätigen sind jedoch weitere Analysen notwendig.

Des Weiteren wurde auch eine transgene siFLS-Linie analysiert. In dieser Erdbeerlinie war die Expression der Flavonol-Synthase reduziert. Die Flavonol-Synthase (FLS) ist ein Enzym der Polyphenol-Biosynthese und katalysiert die Synthese von Flavonolen aus Dihydroflavonolen. In der hier durchgeführten Analyse resultierte diese Reduzierung in erniedrigten Flavonol-Gehalten in den Blüten, Früchten und Blättern. Jedoch konnte keine Reduzierung der Flavonole in den Wurzeln festgestellt werden. Dies könnte ein Hinweis auf die zentrale Rolle dieser Metaboliten-Gruppe in Wurzeln oder die Expression einer weiteren nicht erniedrigt exprimierten Flavonol-Synthase in diesem Pflanzengewebe sein. Darüber hinaus führte die Reduzierung der Flavonole zu einem Anstieg der Flavanole und Proanthocyanidine in Blättern und der Anthocyane in Früchten. Dies entspricht dem Anstieg der alternativ gebildeten *Upstream* Produkte, wenn die konkurrierende Seitensynthese der Flavonole reduziert ist.

Unabhängig von der Analyse der Polyphenole, wurden der Gehalt an Fra a 1 in den Erdbeeren und dessen Auswirkung auf die Erdbeerpflanze im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

Die Analyse des Fra a 1-Gehaltes der GoodBerry-Population zeigte eine starke Genotypen-Umwelt-Interaktion. Es konnte kein Genotyp identifiziert werden, der an allen Standorten einen signifikant niedrigen Allergengehalt aufwies. Dadurch verdeutlicht das Experiment die

Komplexität der Zucht hypoallergener Erdbeeren für Allergiker, da nicht nur der Genotyp, sondern auch der Einfluss der Umwelt berücksichtigt werden muss.

Darüber hinaus wurden zwei unabhängige Experimente mit stabilen siFra a 1.02-Pflanzen durchgeführt. In beiden Studien wurde der Gehalt an Polyphenolen und Glutathion durch die Herunterregulierung der *Fra a 1.02*-Expression verändert. Eine Korrelations-Analyse der Fra a 1- und der Metabolitengehalte bei der GoodBerry-Population resultierte in einer Verbindung der Gehalte von Fra a 1 mit denen von Cyanidin-3-malonylglucosid, Pelargonidin-3-malonylglucosid und Glutathion. Dadurch bestätigen diese Experimente die Beteiligung von Fra a 1 Homologen beim Metabolitenfluss der Polyphenolbiosynthese. Da Fra a 1 Homologe Polyphenol-Intermediate binden können, wird angenommen, dass Fra a 1 Proteine als Regulator oder Transporter dieser Metaboliten fungieren. Die in Bezug auf den Fra a 1-Gehalt und die Fra a 1 Expression am meisten betroffenen Metaboliten waren die malonylierten Anthocyane und Glutathion. Alle diese Metaboliten beeinflussen den Metabolitentransport. Die Malonylierung erhöht die Aufnahmefähigkeit der Polyphenole in die Vakuole, während Glutathion als Co-Transporter fungiert. Zusammenfassend zeigen die Beobachtungen die Wichtigkeit des Transports für den Metabolitenfluss und dadurch auch für das finale Metabolitenprofil.

Summary

Strawberry is a worldwide consumed fruit and favoured because of its attractive aromatic profile and nutritional value.

Among the nutrients of the strawberry are the polyphenols a class of phytochemicals that is associated with positive health effects after consumption. However, strawberry fruits also contain Fra a 1 proteins, which show structural similarities to the main birch pollen allergen Bet v 1, which causes cross-reactivity leading to a pollen-associated food allergy to strawberries. This limits the availability of this nutritional source for concerned allergy sufferers.

In plant, polyphenols are part of the plant defence systems and have a regulatory function, e.g. in plant growth. Strawberry plants contain several molecules that belong to this class of secondary metabolites. Among these are the flavonoids, anthocyanins, flavanols and flavonols, as well as phenylpropanoids and polyphenol polymers like proanthocyanidins, ellagitannins and lignin. The biosynthesis of the polyphenols is regulated by a complex system that involves plant hormones, expression factors as well as enzymes that catalyse specific steps of the synthesis. To better understand the metabolic flux and the regulation of the biosynthesis, the metabolite profile of two crossbreeding populations (GoodBerry population and French population) as well as of transgenic RNAi plants were studied. To investigate not only the genetic effect but also the influence of the environment on the metabolite levels, the GoodBerry population was planted at five different locations within Europe (Spain, Italy, France, Germany and Poland).

The environment affected not every metabolite concentration of the strawberry fruit. Only few flavanol levels showed an environmental variation. In contrast a clear effect on every analysed flavanol could be seen. However, the single flavanol concentrations were not equally affected. The different behaviour led to the separation of the flavanols into two independent, environmentally regulated groups. One group is made up of the metabolites quercetin-glucoside, quercetin-glucuronide and kaempferol-glucuronide while the other group contains kaempferol-glucoside, kaempferol-cumarylglucoside and kaempferol-malonylglucoside. The common feature of the latter metabolites is their preferred occurrence in the achenes, the seeds of the strawberry fruit.

Additionally, the polyphenol profile of the strawberry populations was overall strongly affected by the genotype. For certain metabolites a clear inheritance by one parental cultivar could be identified. This was the case for the malonylated anthocyanins pelargonidin-3-malonylglucoside and cyanidin-3-malonylglucoside. These two metabolites showed a significantly high variability depending on the genotype, ranging between the genotype with the lowest and the genotype with the highest content up to a factor of 100. The same

segregation within the populations could be observed for both anthocyanins. Taking into account the concentration distribution of malonylated anthocyanins within the strawberry cultivars and genotypes, a dominant anthocyanin malonyltransferase gene could be postulated as responsible for this segregation.

Consequently, malonyltransferase candidate genes were isolated and analysed. Two of the five candidate genes resulted in active recombinant proteins. These enzymes accepted flavonols and HDMF-glucosid in addition to anthocyanins as acyl-acceptor substrates and varied within their activity but not within their substrate specificity. A difference in enzyme activity was observed between candidates isolated from the parental cultivars of the GoodBerry population, 'Candongá' and 'Senga Sengana'. This was a consequence of a difference in the genetic code and therefore in the primary structure of the respective proteins. This difference could also be the reason for the contrasting metabolite profiles. However, to fully confirm this, further analyses are necessary.

A transgenic siFLS strawberry line was analysed as well. In this strawberry line the expression of a flavonol-synthase gene was down-regulated. The flavonol-synthase (FLS) is an enzyme of the polyphenol biosynthesis and catalyses the synthesis of flavonols from dihydroflavonols. In the present analyses, this down-regulation resulted in an expected reduction of the flavonol content in flowers, fruits and leaves. However, no reduction of the flavonol concentration was detected in roots. This could indicate the central role of this metabolite class in roots or the expression of another not down-regulated flavonol-synthase in this tissue. In addition to the decrease in the flavonol concentrations, an increase in the levels of flavanols and proanthocyanidins in the leaves and of anthocyanins in the fruits was observed. This is consistent with the increased levels of alternative up-stream products because the competing side synthesis of flavonols is reduced.

In addition to the analysis of the polyphenols, the content of Fra a 1 in strawberries as well as its effect on strawberry plants was analysed in this work.

The analysis of the Fra a 1 content of the GoodBerry population showed a strong genotype environment interaction. No genotype could be identified that had a significant low allergen content at all locations. Thus, this experiment shows the complexity of the breeding for hypoallergenic strawberries for persons suffering from a strawberry allergy as not only the genotype but also the environment has to be considered.

Furthermore, two independent experiments with stable siFra a 1.02 plants were carried out. In both studies the content of polyphenols and glutathione was altered as consequence of the down-regulation of the Fra a 1.02 expression. A correlation analysis of the Fra a 1 content and the metabolite contents of the GoodBerry population showed a correlation between the content

of Fra a 1 and the concentration of cyanidin-3-malonylglucoside, pelargonidin-3-malonylglucoside and glutathione. Thus, these experiments confirm the involvement of Fra a 1 homologues in the metabolite flux of the polyphenol biosynthesis. As Fra a 1 homologues can bind polyphenol intermediates, it is assumed that Fra a 1 proteins act as regulators or transporters for these metabolites. The most affected metabolites regarding the Fra a 1 content and the Fra a 1 expression were the malonylated anthocyanins and glutathione. All these molecules influence the metabolite transport. The malonylation increases the uptake of the polyphenolic metabolites in the vacuole while glutathione acts as a Co-transporter. These observations emphasize the importance of the transport on the metabolite flux and thus on the final metabolite profile.

1. Einleitung

1.1. Erdbeeren

Erdbeeren liegen mit 3,5 kg/Person/Jahr nach Äpfeln (21 kg/Person/Jahr), Bananen (12 kg/Person/Jahr), Tafeltrauben (5,3 kg/Person/Jahr) und Pfirsichen (5,3 kg/Person/Jahr) auf dem fünften Platz (Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) 2019) der meist verzehrten Obstsorten in Deutschland. Das Besondere an Erdbeeren ist jedoch, dass sich deren Haltbarkeit insbesondere im Gegensatz zu Äpfeln, Bananen und Pfirsichen, auf nur wenige Tage beschränkt. Erdbeeren sind nicht-klimakterische Früchte, d.h. sie reifen somit nach der Ernte nicht weiter nach und müssen deswegen im vollständig ausgereiften Zustand geerntet werden. Dies ist bei Äpfeln, Bananen und Pfirsichen nicht der Fall.

1.1.1. Kultivierung

2017 wurden 135 kt Erdbeeren in Deutschland produziert. Der Ertrag wird überwiegend regional konsumiert und verarbeitet. Weniger als 10 % der Ernte wird exportiert. Mit der regionalen Erdbeerproduktion kann zwar mehr als die Hälfte des heimischen Bedarfs abgedeckt werden, um die Bedarfslücke auszugleichen müssen jedoch weitere 108 kt aus überwiegend europäischen Staaten importiert werden. Spanien ist dabei mit 77 kt das dominierende Importland (Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) 2019). Das im Südwesten von Spanien gelegene Huelva ist hier das Hauptanbaugebiet. Die Pflanzen werden dabei in Spanien typischerweise im Herbst in Erddämmen, bedeckt mit einer Mulchfolie, eingepflanzt und unter Plastik-Tunneln kultiviert. Die Erntezeit erstreckt sich dann auf eine relativ lange Zeitspanne von Dezember bis Juni (Mínguez und Navarro 2017). Im Gegensatz dazu dominiert in Deutschland der Anbau auf freiem Feld (eben oder Erddämme mit Strohmulch oder Plastikmulchfolie) mit einer Haupterntezeit von nur wenigen Wochen Ende Frühling/ Anfang Sommer, wodurch die Erträge in Deutschland wesentlich geringer ausfallen als in Spanien (Abbildung 1). Generell besteht weltweit der Trend zur Ausdehnung der Erntezeit. Dies kann zum einen durch den Anbau von immertragenden Sorten in Zentral- und Nordeuropa bzw. dem Anbau von Sorten mit einem geringen Kältebedarf in Südeuropa, zum anderen mit spezialisierten Anbautechniken und durch Pflanzenschutz- und Treibhaussystemen erreicht werden. In Europa ist dadurch inzwischen ein ganzjähriger Anbau von Erdbeeren möglich (Neri et al. 2012). In Deutschland können durch den Einsatz von Gewächshäusern und Folientunneln die Erdbeeren von Frühling bis in den Dezember geerntet werden. 2018 betrug der Anteil an in begehbaren Treibhaussystemen produzierten Erdbeeren in Deutschland schon 16 %. Ein Nebeneffekt dieser geschützten Systeme sind

Ertragssteigerungen von durchschnittlich 60 % im Vergleich zum Freilandanbau (Statistisches Bundesamt (StBA) 2018).

Weltweite Erdbeer-Hauptproduzenten sind China, dessen Produktion vor allem seit Anfang der 1990er Jahre exponentiell auf über 3500 kt/ Jahr gestiegen ist, die USA und Mexiko. Der stärkste Europäische Produzent Spanien ist mit ca. 360 kt auf dem sechsten Platz. Polen und Deutschland schaffen es trotz verhältnismäßig schlechten Erträgen auf Platz acht und zwölf (Abbildung 2) (Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) 2019).

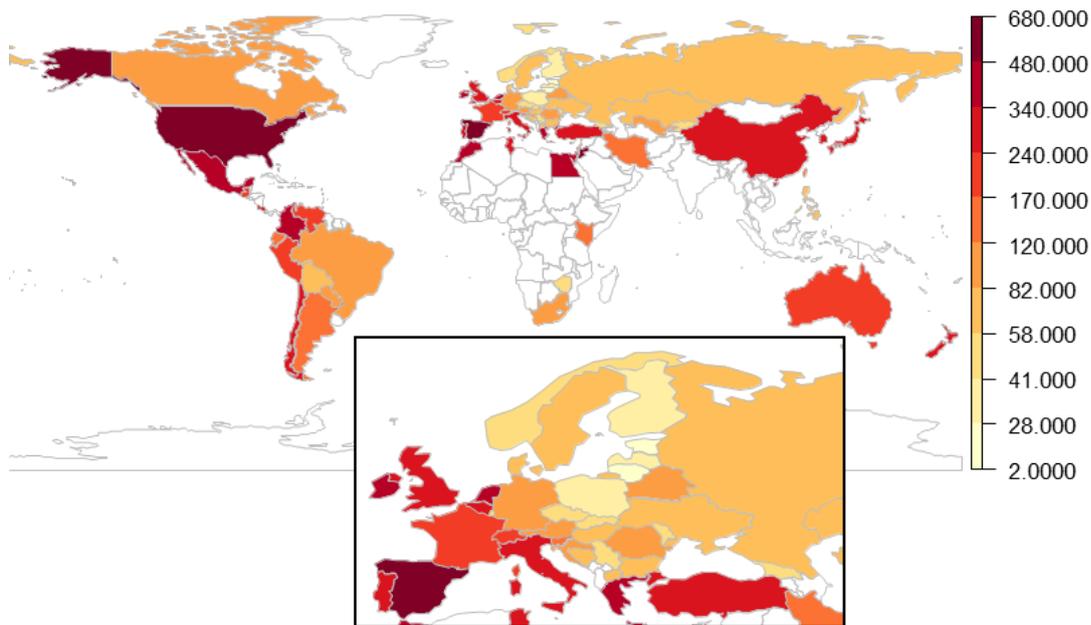


Abbildung 1: Weltweiter Erdbeerertrag 2017 [hg/ha] (Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) 2019)

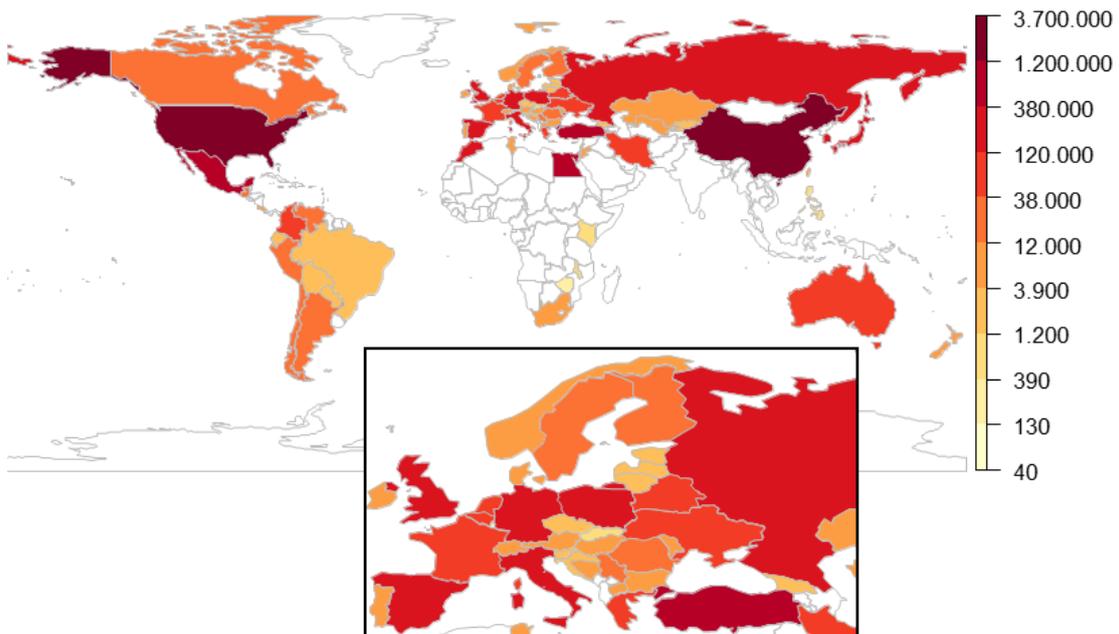


Abbildung 2: Weltweite Erdbeerproduktion 2017 [t] (Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) 2019)

1.1.2. Morphologie und Ursprünge

Die Gattung der Erdbeeren (*Fragaria*) gehört zur Familie der Rosengewächse (Rosaceae), einer Pflanzenfamilie, die neben der Erdbeere auch noch weitere bedeutende Nutzpflanzen, wie Apfel, Kirsche, Mandel, Pflaume, Brombeere und Himbeere, umfasst (Hummer und Janick 2009). Der von Carl von Linné vergebene Gattungsname *Fragaria* stammt dabei von dem lateinischen Wort „fragrans“ ab und bedeutet so viel wie „süß duftend“ und ist vom aromatischen Geruch der Erdbeerfrüchte abgeleitet (Staudt 1962). *Fragaria* umfasst eine Vielzahl an verschiedenen Erdbeerarten. Mittlerweile sind über 20 wild vorkommende Arten beschrieben. Zwar werden Erdbeeren inzwischen mit Ausnahme der Antarktis auf jedem Kontinent kultiviert, ihr natürliches Vorkommen beschränkt sich jedoch auf Asien, Nord- und Südamerika, sowie Europa. In Asien ist die Artenvielfalt besonders groß (Stewart 2011).

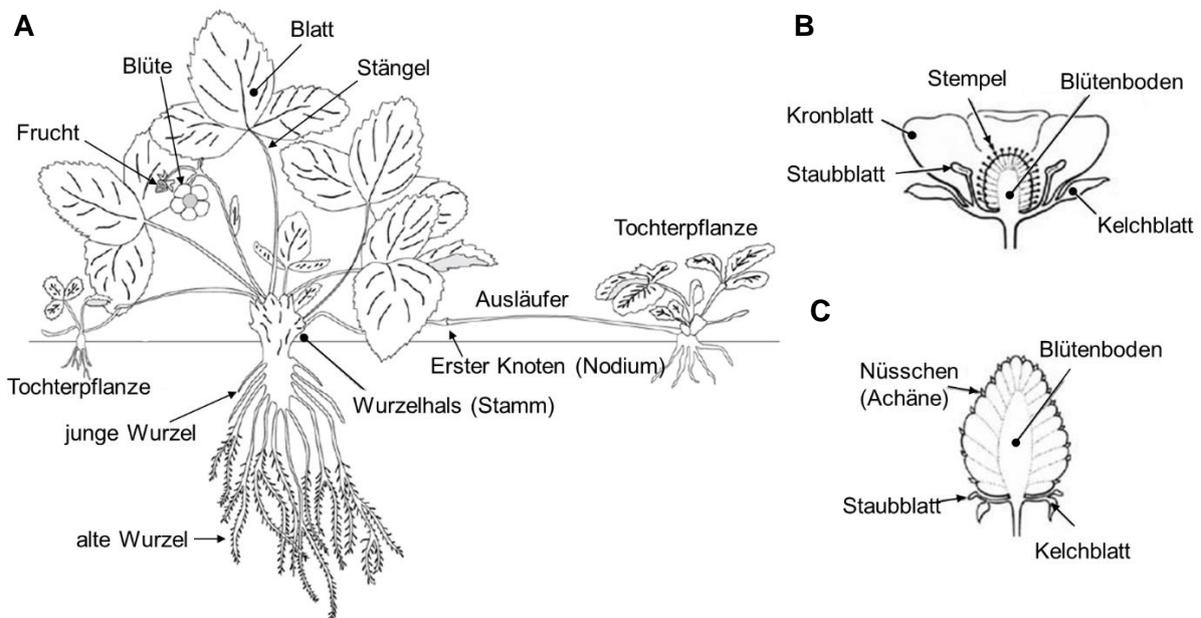


Abbildung 3: Morphologie der Erdbeere A) Erdbeerpflanze mit Ausläufer (Trejo-Télez und Gómez-Merino 2014) B) Blütenquerschnitt C) Fruchtquerschnitt (Hancock 1999)

Allen Erdbeerarten gemein ist ein krautiger Wuchs (Abbildung 3). Sie sind mehrjährige akauleszente Pflanzen (Staudt 1999). Ausgehend von einem Vegetationskegel entwickeln sich Wurzeln, Blätter, Blütenstände und Ausläufer. Erdbeeren sind mit Ausnahme von *Fragaria iinumae* immergrün. Die Blätter sind meist dreiblättrig, wobei einzelne Arten auch bis zu fünfblättrig sein können. Die Blüten, bestehen aus in der Regel fünf weiß bis rosa farbenen Kronblättern, die radiärsymmetrisch angeordnet sind. Erneut ist hier *Fragaria iinumae* mit bis zu acht Kronblättern die Ausnahme (Liston et al. 2014). Obwohl der Name dies impliziert, handelt es sich bei den Früchten der Erdbeeren im botanischen Sinne nicht um Beeren (per Definition Schließfrüchte, deren Fruchtwand (Perikarp) im reifen Zustand fleischig sind) sondern um Sammelnussfrüchte, da eine Erdbeerfrucht überwiegend aus dem Blütenboden besteht, der die sich darauf befindenden Einzelfrüchte mit verholztem Perikarp, die Nüsschen,

zusammenhält (RÖMPP 2019). Bei den Früchten zeigt sich eine große Vielfalt bezüglich Farbe, Form, Anzahl und Aussehen der Nüsschen und Größe. Diese werden von der Art beeinflusst, zeigen jedoch auch innerhalb einer Art eine große Varianz. Neben der generativen Vermehrung über die Samen der Früchte, können sich Erdbeeren vegetativ über Ausläufer vermehren (Staudt 1999).

Ausgehend von einem einfachen Grundchromosomensatz $x = 7$ unterscheiden sich die Erdbeerarten auch durch die Anzahl der Chromosomensätze. Es gibt diploide ($2x = 14$), tetraploide ($4x = 28$), pentaploide ($5x = 35$), hexaploide ($6x = 42$), octaploide ($8x = 56$) und decaploide ($10x = 70$) Spezies (Longley 1926; Rousseau-Gueutin et al. 2009). In Europa sind die Moschus-Erdbeere *Fragaria moschata* ($6x$), die Hügel-Erdbeere *Fragaria viridis* ($2x$) und die Wald-Erdbeere *Fragaria vesca* ssp. *vesca* ($2x$) beheimatet. Das Besondere an der Wald-Erdbeere ist ihre einzigartig weite Verbreitung. Sie ist nicht nur in Europa und Asien, sondern auch mit ssp. *americana*, ssp. *bracteata* und ssp. *california* in Nordamerika vertreten (Johnson et al. 2014; Liston et al. 2014; Rousseau-Gueutin et al. 2009).

Fragaria vesca wurde vermutlich schon von den alten Römern und Griechen angebaut und letztendlich im 14. Jahrhundert in ganz Europa kultiviert (Darrow 1966). Auch *Fragaria moschata*, die europäische Erdbeerart mit der größten Frucht, wurde ca. 400 Jahre lang kultiviert (Stewart 2011). Allerdings werden in Europa heutzutage die einheimischen Spezies auf Grund des geringen Ertrags bzw. der geringen Fruchtgröße kaum noch angebaut und sind kommerziell nicht von Bedeutung. Ab dem 17. Jahrhundert wurden *Fragaria vesca* und *Fragaria moschata* zunächst zunehmend durch die großfruchtigen octaploiden amerikanischen Arten *Fragaria virginiana* (Nordamerika) und *Fragaria chiloensis* (Westküste Nord- und Südamerika) verdrängt (Darrow 1966; Hancock et al. 2008). Im 18. Jahrhundert folgte dann die bis heute den weltweiten Markt dominierende Gartenerdbeere *Fragaria × ananassa* ($8x$). Diese Erdbeerart entstand vor ca. 300 Jahren in Frankreich durch eine zufällige Kreuzung der beiden Arten *Fragaria virginiana* und *Fragaria chiloensis*. Diese wurde als erstes von Antoine Nicolas Duchesne beschrieben (Darrow 1966). Moderne Genanalysen gehen noch einen Schritt weiter und ermöglichen die Identifizierung der diploiden Arten durch deren Polyploidisierung die octaploiden Arten und somit auch letztendlich *Fragaria × ananassa* entstehen konnte. Edger et al. 2019 postulieren, dass es zunächst zu einer Ploidisierung zwischen den in Japan endemischen Arten *Fragaria iinumae* ($2x$) und *Fragaria nipponica* ($2x$) kam. Daraufhin folgte das Genom von *Fragaria viridis* ($2x$, Europa und Asien). Die ersten octoploiden Arten entstanden dann durch weitere Ploidisierung mit *Fragaria vesca* ssp. *bracheta* ($2x$) in Nordamerika. Das Genom von *Fragaria vesca* hat dabei eine besondere Bedeutung, da deren Subgenom in *Fragaria × ananassa* sehr dominant ist. Gründe dafür sind insbesondere eine höhere Transposonen-Dichte in der Nähe von homologen Genen und der

bessere Erhalt von duplizierten Genen im Vergleich zu den anderen Subgenomen, sowie ein homologer Genaustausch in die anderen Subgenomen durch das *vesca*-Genom.

Wie bereits erwähnt, ist *Fragaria* × *ananassa* bei der weltweiten Fruchtproduktion vorherrschend, jedoch sind auch die anderen Erdbeerarten weiterhin sehr relevant. Die diploide *Fragaria vesca* fungiert auf Grund des verhältnismäßig kleinen Genoms, sowie der einfachen und schnellen Kultivierung, oft als Modellorganismus in der Forschung für die Familie der Rosengewächse, insbesondere für die im Vergleich zur *Fragaria vesca* genetisch komplexeren *Fragaria* × *ananassa* (Shulaev et al. 2008; Slovin und Michael 2011). Die Übertragbarkeit von Experimenten wird dabei durch die Dominanz des *Fragaria vesca* Subgenoms in *Fragaria* × *ananassa* erleichtert. Außerdem beinhalten die wilden Erdbeerarten genetisches Potential für die Züchtung zur Verbesserung der Gartenerdbeere (Stewart 2011). So konnten durch Einkreuzung von *Fragaria virginiana* ssp. *glauca* tagesneutrale Sorten gezüchtet werden. Das charakteristische dieser Sorten ist, dass diese von Sommer bis Herbst durchgehend Früchte ansetzen, wodurch der Erntezeitraum deutlich erhöht werden kann (Bringhurst und Voth 1980; Ahmadi et al. 1990).

1.1.3. Inhaltsstoffe der Erdbeerfrucht

Erdbeeren bestehen mit einem Anteil von ca. 89,5 g/ 100 g überwiegend aus Wasser. Die weiteren Hauptbestandteile sind Zucker (5,5 g/ 100 g), Ballaststoffe (1,6 g/ 100 g), organische Säuren (1,1 g/ 100 g), Eiweiß (0,8 g/ 100g), Mineralstoffe (0,5 g/ 100g) und Fette (0,4 g/ 100 g). Die Zucker sind hauptsächlich Glucose (2,2 g/ 100 g), Fructose (2,3 g/ 100 g) und Saccharose (1,0 g/ 100 g) (Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie 2009).

Mittels MALDI-IMS konnten Enomoto et al. 2018 genauere Rückschlüsse auf die Verteilung dieser Zucker in der Frucht ziehen. Die Hexosen Glucose und Fructose waren fast in der gesamten Erdbeerfrucht gleichmäßig verteilt. Die Konzentration war nur im oberen Teil des Markgewebes etwas erhöht. Saccharose hatte hingegen eine deutliche Konzentrationsspitze im Rindengewebe.

Des Weiteren untersuchten Enomoto et al. 2018 auch die Verteilung der Citronensäure. Hier konnte eine gleichmäßige Verteilung im Fruchttinneren beobachtet werden. Bei der Citronensäure handelt es sich um die dominierende organische Säure in der Erdbeere. Weitere Vertreter in absteigender Konzentrationsreihenfolge sind Äpfelsäure, Oxalsäure, Purine und Salicylsäure (Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie 2009). Die Zucker und Säuren bestimmen den Geschmack der Erdbeerfrucht weswegen deren Konzentrationen, sowie auch das Verhältnis beider Gruppen zueinander, das letztendlich die süß-sauer Balance ergibt, entscheidend für die Qualität der Erdbeeren sind. Die

Konzentrationen können dabei durch Reife, Sorte und Umwelt beeinflusst werden (Ulrich und Olbricht 2017; Jouquand und Chandler 2008; Schwieterman et al. 2014).

Ein weiteres Qualitätskriterium ist das Aroma der Früchte. Mehr als 900 flüchtige Stoffe sind bereits durch verschiedene Studien in der Erdbeere identifiziert worden. Mittels GC-O und berechneter Aromawerte konnten je nach Studie 12 bis 48 dieser Verbindungen als für das Erdbeeraroma charakterprägend beurteilt werden. Es besteht jedoch, vermutlich auf Grund verschiedener Aufarbeitungs- und Analysetechniken, sowie unterschiedlicher Erdbeersorten und Wachstumsbedingungen, eine sehr große Variabilität zwischen den identifizierten Verbindungen der verschiedenen Studien. Überwiegend handelt es sich hierbei um Ester, Säuren, Lactone, Alkohole, Ketone und Terpene (Ulrich et al. 2018). Als Beispiele sind cis-3-Hexenal, 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon (HDMF), Ethylbutanoat, 2,3-Butandion, γ -Decalacton, Linalool und Essigsäure zu nennen (Schieberle und Hofmann 1997; Nuzzi et al. 2008).

Darüber hinaus sind Erdbeeren, insbesondere deren Nüsschen, eine Quelle an ungesättigten Fettsäuren. Der Anteil an mehrfach ungesättigten Fettsäuren im Samenöl beträgt 78 % (van Hoed et al. 2009). Insgesamt ist der Fettgehalt in der Erdbeerfrucht jedoch relativ gering.

Das Besondere der Erdbeeren sind nicht die bereits genannten Hauptbestandteile und die flüchtigen Verbindungen, sondern ein hoher Gehalt an Ascorbinsäure (Vitamin C) und Folaten, sowie eine große Vielfalt an Polyphenolen. Diese Inhaltsstoffe tragen vermutlich maßgeblich zu den gesundheitlich positiven Wirkungen bei, die mit dem Verzehr von Erdbeeren assoziiert werden (Giampieri et al. 2012; Giampieri et al. 2014; Alvarez-Suarez et al. 2014; Joseph et al. 1998; Tulipani et al. 2008; Alvarez-Suarez et al. 2014). Vitamin C hat antioxidative Eigenschaften und ist als Elektronendonator an vielen Redoxreaktionen im Körper beteiligt. Folate sind als Cofaktor bei C₁-Gruppen Übertragung, wie bei der Synthese von Nukleinsäuren und der Remethylierung von Homocystein zu Methionin, beteiligt. Sowohl Ascorbinsäure als auch Folate können durch den Menschen nicht selbstständig gebildet werden, sind aber für den menschlichen Metabolismus lebensnotwendig. Das bedeutet, dass, um den Bedarf dieser Vitamine abzudecken, eine gute Versorgung durch die Nahrung essenziell ist. Die Folatversorgung in Deutschland, insbesondere bei Frauen im gebärfähigen Alter, erreicht oft nicht die Referenzwerte der WHO (Mensink et al. 2016). Erdbeeren stellen eine natürliche Quelle dar um diesen Folatmangel auszugleichen (Tulipani et al. 2008; Striegel et al. 2018). Wie bereits erwähnt zeichnet sich die Erdbeere auch durch eine Vielfalt an phenolischen Bestandteilen aus. Die Frucht enthält u.a. Anthocyane, Flavanole, Derivate der Ellagsäure, Phenolsäuren und Flavonole (Aaby et al. 2012; Giampieri et al. 2012; Giampieri et al. 2014). Polyphenole sind zwar im Gegensatz zu den Vitaminen für den Menschen nicht essenziell, es besteht jedoch eine positive Korrelation mit deren Verzehr und der menschlichen Gesundheit.

Im Kapitel 1.2 wird die Polyphenolzusammensetzung der Erdbeere sowie die Wirkung der Polyphenole auf den Menschen detaillierter erläutert.

Darüber hinaus enthalten Erdbeeren auch Proteine, die eine allergene Reaktion auslösen können (vgl. 1.3).

1.2. Polyphenole

Polyphenole sind wichtige Sekundärmetaboliten der Pflanzen. Der Begriff Polyphenol umfasst eine große Anzahl und Vielfalt an chemischen Verbindungen. Per Wortdefinition sind damit Moleküle gemeint, die aus mindestens einem aromatischen Ring, der mit Hydroxygruppen verknüpft ist, bestehen. Das kann sowohl einfache Verbindungen wie p-Cumarsäure, aber auch hochkomplexe, hochmolekulare Polymere, wie Lignin, umfassen. Die Monomere lassen sich je nach Grundstruktur in Phenolsäuren (Hydroxybenzoesäure- und Hydroxyzimtsäurederivate), Flavonoide (Flavonole, Flavone, Flavanone, Isoflavone, Anthocyane und Flavanole), Stilbene und Lignane unterteilen. Diese Moleküle können mit anderen Phenolen, aber auch mit anderen Strukturklassen, wie Zuckern und organischen Säuren, verknüpft werden (Manach et al. 2004).

Erdbeeren enthalten überwiegend die Flavonoide Anthocyane, Flavanole und Flavonole, sowie Phenolsäuren. Vorkommende Polymere sind oligomere Procyanidine, Ellagttannine, sowie Lignin (Hanhineva et al. 2011; Aaby et al. 2012).

1.2.1. Biosynthese

Ausgangspunkt der Polyphenolbiosynthese (Abbildung 4) ist der Shikimisäureweg – ein zentraler Stoffwechselweg bei Pflanzen aber auch Bakterien und Pilzen. Das Hauptprodukt dieses Stoffwechselwegs sind die aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Phenylalanin und Tyrosin. Diese Aminosäuren, aber auch Zwischenprodukte des Shikimisäurewegs, sind Vorläufer einer Vielzahl an aromatischen Verbindungen, nicht nur der Polyphenole. So sind sie u.a. auch Vorläufer von weiteren Sekundärmetaboliten, wie Alkaloiden, Phytoalexinen und Pflanzenhormonen (Schmid und Amrhein 1995).

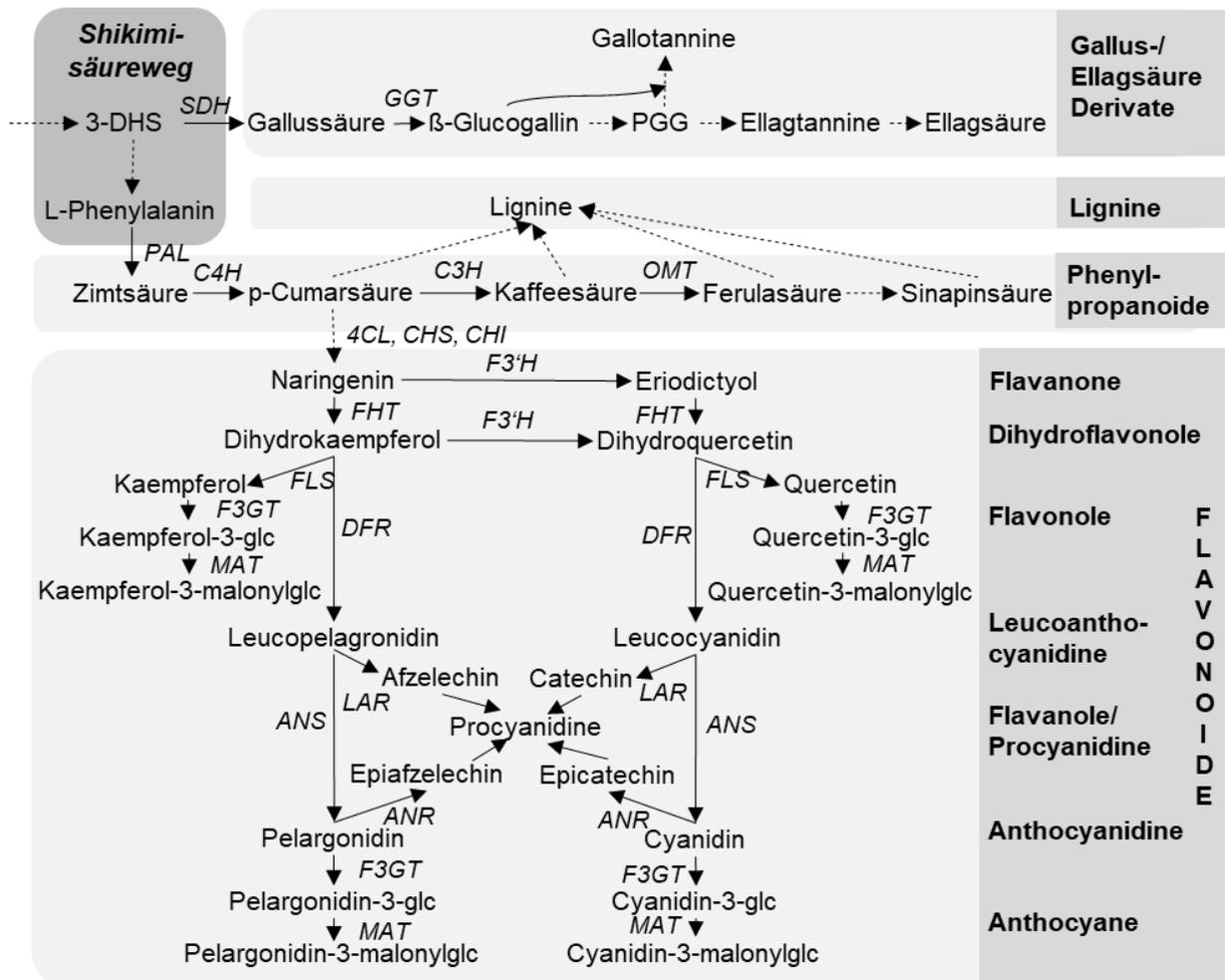


Abbildung 4: Polyphenolbiosynthese – 3-DHS: 3-Dehydroshikimat, 4CL: p-Cumaryl-CoA-Ligase, ANR: Anthocyanidin-Reduktase, ANS: Anthocyanidin-Synthase, C3H: Kaffeesäure-3-Hydroxylase, CHI: Chalkon-Isomerase, CHS: Chalkon-Synthase, C4H: Zimtsäure-4-Hydroxylase, DFR: Dihydroflavonol-4-Reduktase, F3'H: Flavonoid-3'-Hydroxylase, F3GT: Flavonoid-3-O-Glucosyltransferase, FHT: Flavanon-3-Hydroxyltransferase, FLS: Flavonol-Synthase, GGT: Gallussäure-Glucosyltransferase, LAR: Leucoanthocyanidin-Reduktase, MAT: Malonyltransferase, OMT: O-Methyltransferase, PAL: L-Phenylalanin-Ammoniaklyase, PGG: Pentagalloylglucose, SDH: Shikimisäure-Dehydrogenase

1.2.1.1. Gallussäure, Ellagsäure, Gallotannine und Ellagtannine

Ellagsäure, Gallussäure, sowie die jeweiligen Tannine werden über ein Zwischenprodukt des Shikimisäurewegs, der Dehydroshikimisäure, gebildet (Abbildung 5). Die Shikimat-Dehydrogenase (SDH) ermöglicht die Bildung von Gallussäure aus Dehydroshikimisäure (Bontpart et al. 2016). Daraufhin erfolgt die Veresterung von Glucose mit Gallussäure zu β -Glucogallin. Schulenburg et al. 2016 identifizierten mehrere UDP-Glucose-abhängige Glucosyltransferasen, die die Bildung dieses zentralen Vorläufermoleküls in der Erdbeere ermöglichen. Ausgehend von β -Glucogallin kann mittels 1-O-Acylglucose-abhängiger Acyltransferase 1,2,3,4,6-Pentagalloylglucose (PGG) gebildet werden (Cammann et al. 1989). PGG ist das Ausgangsmolekül für die Bildung von Ellagsäure, sowie der Gallo- und Ellagtannine (Niemetz und Gross 2005). Durch kontinuierliche Übertragung weiterer Galloyl-

Einheiten mittels β -Glucogallin auf PGG bilden sich letztendlich die Gallotannine (Hofmann und Gross 1990; Niemetz und Gross 2001). Charakteristisch für Ellagtannine sind 3,4,5,3',4',5'-Hexahydroxydiphensäure (HHDP) Einheiten. Diese entstehen durch Oxidation mittels Laccasen, die zu einer Biaryl-Kopplung benachbarter Galloyl-Gruppen führt (Niemetz und Gross 2003). HHDP kann durch Hydrolyse aus den Ellagtanninen freigesetzt werden. Mittels Lactonisierung bildet sich aus HHDP vermutlich letztendlich die Ellagsäure (Quideau 2009).

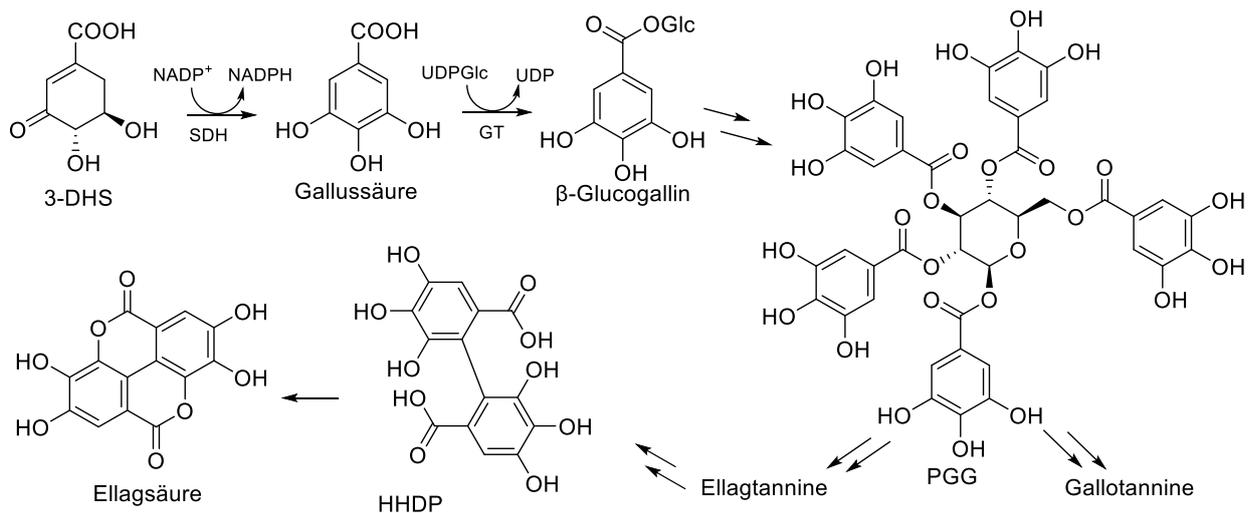


Abbildung 5: Biosynthese der Gallussäure- und Ellagsäure-Derivate – SDH: Shikimisäure-Dehydrogenase, GT: Glucosyltransferase, NADP: Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat, UDP: Uridindiphosphat, Glc: Glucose

1.2.1.2. Phenylpropanoide und Lignin

Die Synthese der Phenylpropanoide bzw. der Zimtsäure-Derivate beginnt mit der aromatischen Aminosäure L-Phenylalanin (Abbildung 6). Die Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL) ermöglicht die trans-Eliminierung von Ammoniak und dadurch die Bildung der Phenylpropansäure trans-Zimtsäure (Davies und Schwinn 2006). Diese kann mittels Zimtsäure-4-Hydroxylase (C4H) zu p-Cumarsäure reagieren. C4H gehört zur Superfamilie der P450 Proteine. Die P450 Proteine benötigen molekularen Sauerstoff und NADPH für die Oxidation. In der Regel findet die Aktivierung von Häm gebundenen Sauerstoff durch sukzessive Übertragung von zwei Elektronen von NADPH über eine NADPH Cytochrom P450 Reduktase statt (Bak et al. 2011). Rösler et al. 1997 wiesen darüber hinaus nach, dass die PAL von Mais (*Zea mays*) neben Phenylalanin auch Tyrosin als Substrat akzeptieren und dieses ohne Umwege über die 4-Hydroxylierung direkt zu p-Cumarsäure umsetzen kann. Die Umsetzung von Tyrosin scheint besonders in Monokotyledonen ausgeprägt zu sein (Davies und Schwinn 2006). Ausgehend von der p-Cumarsäure führt eine erneute Hydroxylierung zur Bildung der Kaffeesäure. Modellstudien in *Brachypodium* und *Arabidopsis* von Barros et al. 2019 zeigten, dass es sich bei der p-Cumaryl-3-Hydroxylase (C3H), die die direkte

Hydroxylierung ermöglicht, um eine bifunktionelle cytosolische Ascorbinsäure-Peroxidase handelt. Alternativ existiert auch ein weiterer Syntheseweg, bei dem Kaffeesäure über den Shikimsäure- oder den Chinasäureester der Cumarsäure gebildet wird. Erst nach Veresterung erfolgt die Hydroxylierung zu den jeweiligen Kaffeesäureestern mittels p-Cumaryl-Shikimat/Quinat-Hydroxylase, einer P450-Monooxygenase (Schoch et al. 2001). Anschließend kann die Kaffeesäure durch eine Esterase freigesetzt werden (Vanholme et al. 2013). Je nach Pflanzenart sind die Stoffwechselwege unterschiedlich ausgeprägt. In der Studie von Barros et al. 2019 bevorzugte das monokotyle *Brachypodium* eher die direkte Hydroxylierung während in der dikotylen *Arabidopsis* der Umweg über die Ester für die Synthese der Kaffeesäure bevorzugt wurde. Die Bildung der weiteren Phenylpropanoide, Ferulasäure, 5-Hydroxyferulasäure und Sinapinsäure, im Anschluss, werden durch Methylierungen mit Hilfe von Methyltransferasen (S-Adenosyl-L-Methionin als Cosubstrat) sowie einer weiteren Hydroxylierung mittels Ferulasäure-5-Hydroxylase (P450 Monooxygenase) ermöglicht (Meyer et al. 1996; Barros et al. 2019). Lunkenbein et al. 2006b wiesen nach, dass in *Fragaria x ananassa* die O-Methyltransferase neben der Phenylpropanoide auch den Erdbeearomastoff HDMF als Substrat akzeptiert, also multifunktionell agiert und an verschiedenen Biosynthesen beteiligt ist. Die gebildeten Phenylpropansäuren sind Ausgangsstoffe für die Bildung von Monolignolen, Lignin und den Flavonoiden.

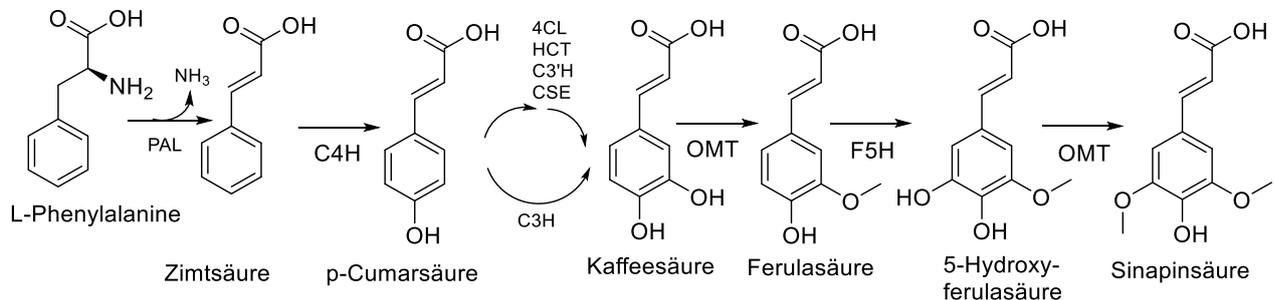


Abbildung 6: Phenylpropansäurebiosynthese - PAL: Phenylalanin-Ammoniak-Lyase, C3H: p-Cumarsäure-4-Hydroxylase, 4CL: p-Cumarsäure-CoA-Ligase, HCT: p-Cumaryl-CoA-Shikimat/Quinat-Transferase, C3'H: p-Cumaryl-Shikimat/Quinat Hydroxylase, CSE: Kaffeesäure/Chinasäure-Esterase, OMT: O-Methyl-Transferase, F5H: Ferulasäure-5-Hydroxylase, nach Barros et al. 2019

Unter Beteiligung von p-Cumaryl-CoA-Ligase (4CL) und der Zimtsäure-Reduktase (CCR) können die Phenylpropansäuren in ihre jeweiligen Aldehyde umgewandelt werden (Abbildung 7). Die Zimtalkohol-Dehydrogenase (CAD) ermöglicht die Bildung der Alkohole. Mittels Peroxidase (POD) kann im Anschluss die Lignifizierung in der Zellwand stattfinden. Alle genannten Enzyme wurden bereits in *Fragaria* identifiziert und charakterisiert (Yeh et al. 2014; Yeh 2012; Ring et al. 2013; Blanco-Portales et al. 2002).

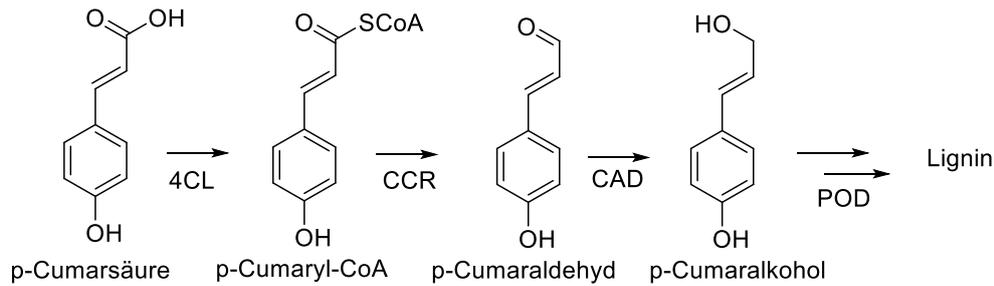


Abbildung 7: Monolignol- und Ligninbiosynthese am Beispiel p-Cumarsäure - 4CL: p-Cumaryl-CoA-Ligase, CCR: Zimtsäure-CoA-Reduktase, CAD: Zimtsäurealkohol-Dehydrogenase, POD: Peroxidase

1.2.1.3. Flavonoide

Die ersten Schritte bei der Flavonoid-Biosynthese werden durch die Enzyme Chalkonsynthese (CHS) und Chalkonisomerase (CHI) katalysiert. Dabei wird ein Phenylpropanoid mit drei Molekülen Malonyl-CoA zu der charakteristischen C15-Drei-Ring-Struktur der Flavonoide kondensiert (Abbildung 8 und Abbildung 9) (Schwab et al. 2009). In der Regel wird dabei p-Cumaryl-CoA verwendet.

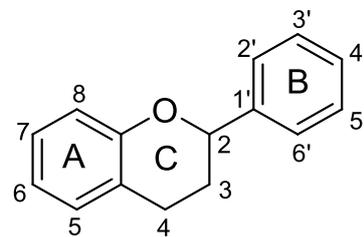


Abbildung 8: Flavonoid-Grundstruktur

In manchen Pflanzenarten, wie Kiefer (*Pinus sylvestris*) und Gerste (*Hordeum vulgare*), kann die Synthese auch mit anderen Phenylpropanoiden, wie Feruloyl-CoA, Caffeoyl-CoA und Cinnamoyl-CoA, durchgeführt werden (Fliegmann et al. 1992; Christensen et al. 1998). Die zentrale Bedeutung der CHS für die Polyphenylbiosynthese wird durch die Effekte einer Reduzierung der CHS-Transkripte in transgenen und agroinfiltrierten Erdbeerpflanzen deutlich. In beiden Experimenten wurden die Flavonoidgehalte deutlich zugunsten erhöhter Phenylpropanoidgehalte reduziert (Lunkenbein et al. 2006a; Hoffmann et al. 2006).

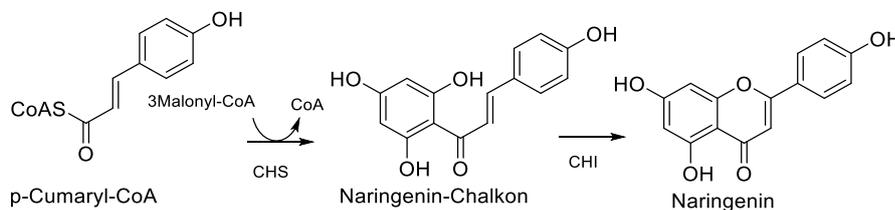


Abbildung 9: Flavonoidbiosynthese 1 - CHS: Chalkonsynthese, CHI: Chalkonisomerase

Innerhalb einer Flavonoid Gruppe, wie z.B. der Flavanone, kann die Struktur des B-Rings durch zusätzliche Hydroxygruppen variieren. Katalytisch aktiv sind hier die P450-Enzyme Flavonoid-3'-Hydroxylase (F3'H) und die Flavonoid-3',5'-Hydroxylase (F3'5'H) (Holton et al. 1993a). Des Weiteren sind auch Methylierungen der Hydroxygruppen durch eine O-Methyltransferase möglich (Kim et al. 2010). In der Erdbeere dominieren jedoch die jeweiligen 4'-Hydroxyflavonoide bzw. die 3'4'-Hydroxyflavonoide (Hanhineva et al. 2011).

Die durch die CHS gebildeten (2S)-Flavanone werden durch Flavanon-3-Hydroxyltransferasen (FHT) stereospezifisch zu den jeweiligen (2R, 3R)-Dihydroflavonolen umgesetzt (Abbildung 10) (Davies und Schwinn 2006; Lukačín et al. 2003). Bei den FHTs handelt es sich um Fe^{2+} -, O_2 - und 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenasen (2-OGDs) (Prescott 2000). Die Dihydroflavonole können katalysiert über NADPH-abhängige Dihydroflavonol-4-Reduktasen (DFR) stereospezifisch am C4 zu (2R, 3S, 4S)-Leucoanthocyanidinen reduziert werden (Davies und Schwinn 2006). Diese Enzyme gehören zu der Familie der Einzel-Domain-Reduktase/Epimerase/Dehydrogenase-Proteinen (REDs) (Labesse et al. 1994). Alternativ können die Dihydroflavonole über einen Seitenweg zu den Flavonolen reagieren. Katalytisch aktiv ist hier die Flavonolsynthese (FLS), eine 2-OGD (Holton et al. 1993b). In *Citrus unshio* wurde eine FLS identifiziert, die neben der FLS-Aktivität auch eine FHT-Aktivität aufweist, und so die Umsetzung der Flavanone ohne Beiteiligung eines weiteren Enzyms zu den Flavonolen ermöglicht (Lukačín et al. 2003). Ausgehend von den Leucoanthocyanidinen sind erneut zwei Synthesewege möglich. Zum einen können diese zu den Anthocyanidinen, katalysiert durch Anthocyanidin-Synthasen (ANS), reduziert werden, zum anderen ist auch die Reduktion zu den trans-Flavan-3-olen mittels Leucoanthocyanidin-Reduktase (LAR) möglich. Die LAR sind RED-Proteine, benötigen also NADPH als Cosubstrat (Davies und Schwinn 2006), während ANS von Fe^{2+} und 2-Oxoglutarat abhängig sind und zu den 2-OGDs zugeordnet werden können (Wilmouth et al. 2002). Weitere RED-Proteine der Flavonoid Biosynthese sind Anthocyanidin Reduktasen (ANR), die die Synthese der cis-Flavan-3-ole ausgehend von den Anthocyanen katalysieren (Bogs et al. 2005). Cis- und trans-Flavan-3-ole sind die Bausteine für die Bildung der oligomeren Proanthocyanidine bzw. kondensierten Tannine (He et al. 2008).

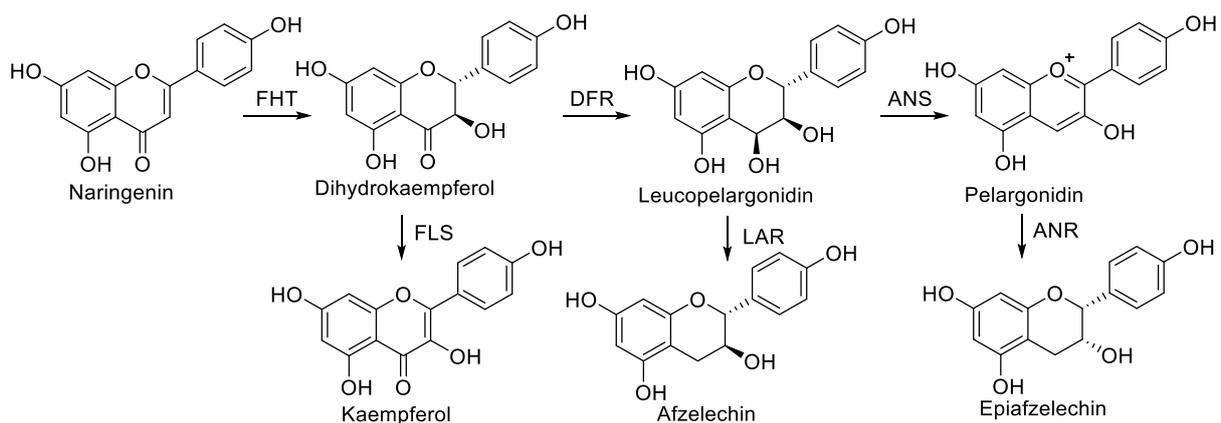


Abbildung 10: Flavonoidbiosynthese 2 - FHT: Flavanon-3-Hydroxyltransferase, FLS: Flavonol-Synthese, DFR: Dihydroflavonol-4-Reduktase, LAR: Leucoanthocyanidin-Reduktase, ANS: Anthocyanidin-Synthase, ANR: Anthocyanidin-Reduktase

1.2.1.4. Modifizierende Enzyme

Das Polyphenol-Grundgerüst kann, wie unter 1.2.1.2 und 1.2.1.3 beschrieben, durch Hydroxylierungen und Methylierungen variiert werden. Eine weitere Möglichkeit, um die Polyphenole zu verändern, ist die Verknüpfung mit Produkten des Primär- und des Sekundärstoffwechsels.

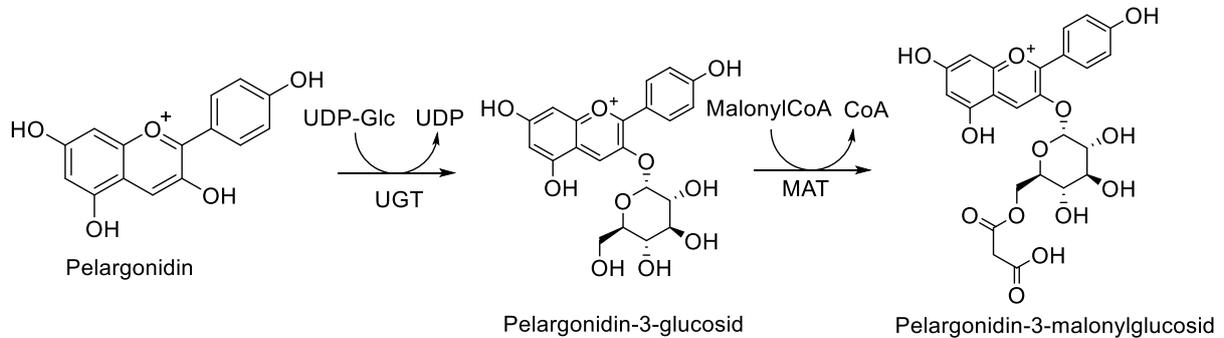


Abbildung 11: Modifizierung des Anthocyanidins Pelargonidin

Bei der Glycosylierung (Abbildung 11) handelt es sich um eine Verknüpfung mit Zuckern, Produkten des Primärstoffwechsels. Die Glycosylierung erhöht zum einen die Löslichkeit und die Stabilität ihrer Aglykone, verändert zum anderen aber auch die Bioaktivität und die Bioverfügbarkeit. Sie vereinfacht es der Pflanze die Metaboliten gezielt in Zellkompartimenten anzureichern und wirkt auch detoxifizierend (Gachon et al. 2005; Jones und Vogt 2001; Vetter 2000; Wang 2009). Die Enzyme, die die Verknüpfung mit Zuckern ermöglichen, werden Glycosyltransferasen (GTs) genannt. Die GTs im Sekundärmetabolismus verwenden bei der Übertragung einen Nukleotid-aktivierten Zucker. Es sind Uridin-Diphosphat (UDP)-abhängige Glycosyltransferasen (UGTs) (Ross et al. 2001). In der Erdbeere wurden bereits Glucoside, Glucuronide und Rutinoside, Xyloside, Rhamoside, Arabinoside und Sophoroside der Polyphenole nachgewiesen (Hanhineva et al. 2011). Allen pflanzlichen UGTs gemein ist ein hochkonservierter Proteinsequenzbereich, die PSPG (*plant secondary product glycosyltransferase*)-Box, bestehend aus 44 Aminosäuren (Hughes und Hughes 1994; Mackenzie et al. 1997). Im *Fragaria vesca* Genom konnten mehr als 100 putative UGTs identifiziert werden (Shulaev et al. 2011; Song et al. 2015). Song et al. 2015 charakterisierten acht dieser UGTs und konnten unterschiedliche Substratspezifitäten und -selektivitäten beobachten. UGT75T1 zeigte nur Aktivität für eines der getesteten Substrate, während die anderen UGTs eine Bandbreite an Substraten (u.a. verschiedene Flavonoide) akzeptierten. Die Bedeutung der Glycosylierung für den Metabolismus wird vor allem durch die Studie von Griesser et al. 2008 deutlich. Die Herunterregulierung der Transkriptmenge von *FaGT1*, das kodierte Protein, ist für die Bildung von Pelargonidin- und Cyanidinglucosid verantwortlich- in Erdbeerfrüchten resultierte in geringeren Anthocyangehalten, während die Konzentration an

Epiäpizelechin, das alternativ aus dem Anthocyanidin Pelargonidin mittels ANR gebildet werden kann, anstieg.

Eine andere Möglichkeit, um Polyphenole zu modifizieren, sind Acylierungen. Bei den übertragenen Acyl-Gruppen kann es sich sowohl um einfache aliphatische Säuren (Abbildung 11), aber auch um phenolische Säuren mit einer C6-C3- bzw. C6-C1-Struktur, wie *p*-Cumarsäure oder Gallussäure handeln. Acyltransferasen (ATs), die die Übertragung einer Acyl-Gruppe auf Polyphenol Akzeptor-Gruppen ermöglichen, können zwei Proteinfamilien zugeordnet werden. Die Familie der BAHD-ATs¹ verwenden Acyl-CoA-Thioester, während SCPL-ATs (*serine carboxy peptidase-like acyltransferases*) 1-O- β -Glucoseester als energiereiche Acyl-Donoren benötigen (Bontpart et al. 2015). Die bereits im Kapitel 1.2.1.1 erwähnten ATs, verwenden für die Synthese von PGG und den Gallotanninen β -Glucogallin, also einen 1-O- β -Glucoseester, und gehören somit zur SCPL-AT-Familie. SCPL-ATs zeigen eine sehr hohe Sequenz Homologie zu den Serin-Typ Carboxypeptidasen, haben aber keine Protease-Aktivität. Beiden Enzymklassen gemein ist eine katalytische Triade aus Serin, Histidin und Asparagin (Milkowski und Strack 2004). Bei den BAHD-ATs wurde ein sehr stark konserviertes HxxxD-Motiv und ein schwächeres DFGWG-Motiv in der Proteinsequenz als charakteristische Einheit identifiziert (Unno et al. 2007; D'Auria 2006; Bontpart et al. 2015). Mutationsstudien zeigten, dass eine Veränderung der Aminosäuresequenz in diesem Bereichen zu starken Aktivitätsverlusten führt (Bayer et al. 2004; Suzuki et al. 2003). Das HxxxD-Motiv ist wahrscheinlich an der Substratbindung beteiligt, während das DFGWG-Motiv vermutlich eher eine strukturelle Bedeutung hat (Unno et al. 2007; Bontpart et al. 2015). BAHD-ATs, die die Acylierung von Flavonoiden und Anthocyanen katalysieren, können in eine Subfamilie, den Anthocyan-Acytransferasen (AATs), geclustert werden. Die Acylgruppen werden dabei auf die Zucker der Flavonoid-Glycoside übertragen. AATs können zusätzliche konservierte Sequenzbereiche zugeordnet werden, wie das YFGNC-Motiv (Nakayama et al. 2003; Suzuki et al. 2003; Manjasetty et al. 2012). Suzuki et al. 2004b konnten jedoch auch eine für Anthocyane aktive AT identifizieren, die dieses Motiv nicht besitzt und strukturell eher einer anderen Subfamilie zugeordnet werden kann. Die Acylierung hat ähnliche Auswirkungen wie die Glycosylierung. Sie beeinflusst die Löslichkeit, die Stabilität (Kallam et al. 2017; Giusti et al. 1999), die Bioaktivität (Landry et al. 1995; Mugford et al. 2009) und die Aufnahmefähigkeit in die Vakuole (Zhao et al. 2011; Gomez et al. 2009). Gomez et al. 2009 identifizierten einen

¹Der Name der BAHD-ATs wurde aus den Anfangsbuchstaben der ersten vier für diese Proteinfamilie biochemisch charakterisierten Enzyme abgeleitet. Dabei handelt es sich um *benzylalcohol O-acetyltransferase* (BEAT) aus *Clarkia breweri*, *anthocyanin O-hydroxycinnamoyltransferase* (AHCT) aus *Gentiana trifloral*, *anthranilate N-hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase* (HCBT) aus *Dianthus caryophyllus* und *deacetylvindoline 4-O-acetyltransferase* (DAT) aus *Catharanthus roseus* (D'Auria 2006).

MATE Transporter im Wein (*Vitis vinifera*) der selektiv nur malonylierte Anthocyane transportieren kann.

1.2.1.5. Regulierung der Biosynthese

Die Biosynthese der Polyphenole wird durch endogene und exogene Faktoren beeinflusst.

Eines der Schlüsselprinzipien höherer Organismen, wie den Pflanzen, ist die Spezialisierung einzelner Zellgruppen zu Subkompartimenten, den Organen. So haben Wurzeln andere Aufgaben und Herausforderungen als Blätter, Blüten oder Samen. Aber auch innerhalb einzelner Organe lassen sich die Zellen in unterschiedliche Zellgewebe gliedern. Dementsprechend müssen die Zellen mit unterschiedlichem Material ausgestattet werden (Behrens et al. 2019). Die Basis dafür ist vor allem die regulierbare Expression einzelner Gene (Bailey-Serres 2013; Dersch et al. 2016; Galbraith und Birnbaum 2006). Almeida et al. 2007 untersuchten die Transkriptlevel verschiedener Gene der Polyphenolsynthese (*PAL*, *C4H*, *4CL*, vier *CHS*, *CHI*, *FHT*, *DFR*, *ANS*, *FLS*, *LAR*, *ANR*, *UGT* und *F3GT*) in Blättern, Blütenblättern, Wurzeln und den Früchten von *Fragaria × ananassa*. In den Blütenblättern zeigte sich dabei eine hohe Expression der Phenylpropanoid-Gene *FaPAL*, *FaC4H* und *Fa4CL*. In den reifen Früchten waren die Transkriptlevel der an der Anthocyan-Synthese beteiligten Flavonoid-Gene sehr hoch. Während die Wurzeln sich durch eine hohe *Fa4CL* und *FaLAR* Transkription auszeichneten. Des Weiteren wiesen die vier *CHS* Gene genspezifische Expressionsmuster in den verschiedenen Organen auf. *FaCH1* und *FaCH3* wurden in der reifen Frucht höher exprimiert, *FaCH2* und *FaCH5* in den Blütenblättern.

Die Genexpression und die Metaboliten-Konzentrationen hängen jedoch nicht nur von den Pflanzenorganen, sondern auch von ihrem Entwicklungsstadium ab. Der Fokus der Forschung liegt hier insbesondere auf den Veränderungen während der Fruchtreifung der Erdbeere (Almeida et al. 2007; Baldi et al. 2018; Moyano et al. 1998; Hossain et al. 2018; Okutsu et al. 2018; Carbone et al. 2009; Halbwirth et al. 2006). Die Fruchtentwicklung ist am Anfang durch die Vergrößerung des Fruchtbodens und der Bildung der Nüsschen geprägt (Nitsch 1950). Danach baut sich das Chlorophyll ab, die Frucht wird weiß (Martínez et al. 2001). Die Fruchtreifung wird durch das Erweichen der Textur, und der Bildung der roten Anthocyane abgeschlossen (Rosli et al. 2004; Fait et al. 2008). Das Phytohormon Auxin, das in den Nüsschen produziert wird induziert die Wachstumsphase (Nitsch 1950). Die finale Fruchtreifung ist durch Reduktion des Auxin-Gehaltes und durch steigende Abscisinsäure-Konzentrationen geprägt (Gicen et al. 1988; Jia et al. 2011; Kim et al. 2019). Es gibt Polyphenol-Synthese Gene, die primär am Anfang der Fruchtentwicklung (z.B. *ANR*) exprimiert werden, Gene die erst am Ende aktiv sind (z.B. *FGT*) und auch Gene mit Expressions-Spitzen am Anfang und Ende (z.B. *CHI*, *DFR*) (Baldi et al. 2018). Die

Zusammensetzung der Polyphenole der Erdbeerfrucht ist letztendlich nicht Ergebnis eines einzelnen Genexpressionsmusters, sondern die Summe der kontinuierlichen Veränderung während der Reifung. Die Genexpression wird dabei durch Pflanzenhormone, wie der Abscisinsäure, aber auch durch Transkriptionsfaktoren beeinflusst. Bekannte Transkriptionsfaktoren sind u.a. FaMYB1, FaMYB10 und FaPRE1 (Hossain et al. 2018; Medina-Puche et al. 2019; Vallarino et al. 2015; Zhao et al. 2018; Jia et al. 2011). FaMYB1 wirkt als Repressor der Anthocyan-Synthese (Aharoni et al. 2001). Überexpression in *Fragaria chiloensis* führte zu einer stärkeren Expression von *ANS*, jedoch einer Abschwächung von *ANR* und *LAR* und dadurch letztendlich zu signifikant höheren Anthocyangehalten und nicht mehr detektierbaren Flavan-3-ol Konzentrationen in der reifen Frucht (Salvatierra et al. 2013). FaMYB10 hingegen wirkt als Aktivator. Ein Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP) in FaMYB10 in weiß-fruchtigen *Fragaria vesca* Varietäten, wie 'Yellow Wonder', konnte letztendlich sogar als Ursache für die fehlende Anthocyan-Bildung postuliert werden (Hawkins et al. 2016). FaPRE1 ist ein Repressor, der ebenfalls bei der Fruchtreifung involviert ist. Seine Expression wird durch Auxin herunterreguliert und durch Abscisinsäure gesteigert. Eine Überexpression führte u.a. zu Herunterregulierungen von *FaMYB10*, *FaCAD* und *FaF3H*. (Medina-Puche et al. 2019)

Einer der für Pflanzen wichtigsten Umweltfaktoren ist das Licht. Zum einen ist es notwendig für die energieliefernde Photosynthese, andererseits kann es auch durch Induktion einer Radikalbildung zu Zellschädigungen führen. Auf Grund dieser zentralen Bedeutung reguliert Licht eine Vielzahl an Mechanismen in den Pflanzen, u.a. das Wachstum, die Blüte, die Keimbildung, den Lebensrhythmus, aber auch die Synthese der Polyphenole (Li et al. 2009; Chen und Chory 2011). Xu et al. 2018 zeigten, dass ein Lichtentzug bei der Fruchtreifung von *Fragaria vesca* zu einer signifikanten Erniedrigung von *FvMYB10* führte. Der Anthocyangehalt, sowie der Transkriptlevel der Flavonoid-Gene, wurden ebenfalls reduziert. Bei der Studie von Xu et al. 2017 führten Behandlungen mit niedrigen und mittleren UV-Dosen hingegen zu einer signifikanten Erhöhung der Polyphenolgehalte und der Transkriptlevel relevanter Gene, wie *CHS* und *CHI*.

Ein anderer für die Pflanze wichtiger exogener Faktor ist die Temperatur. Hohe Temperaturen (30 °C statt 20 °C) im frühen Stadium der Fruchtreifung führten bei Okutsu et al. 2018 zu reduzierten Anthocyangehalten und erniedrigten Genexpressionen. Eine Kältebehandlungen (4 °C statt 25 °C) durch Zhang et al. 2017 resultierten in erhöhten Anthocyanidin- und Procyanidin-Konzentrationen und erhöhter Expression von *ANS* und *FGT*. Eine erhöhte Genexpression von *MYB10* und eine erniedrigte von *MYB1* lassen eine Regulierung durch diese Transkriptionsfaktoren vermuten.

Weitere Umweltfaktoren, die sich auf die Synthese der Polyphenole auswirken sind insbesondere der Salzgehalt im Boden, sowie die Wasser- und die Nährstoffversorgung (Ramakrishna und Ravishankar 2011).

1.2.2. Pflanzenfunktion

Die Funktionen der Polyphenole in der Pflanze sind eng mit der Regulierung ihrer Biosynthese (vgl. 1.2.1.5) verbunden.

Im Allgemeinen wird ein hoher Gehalt an Polyphenolen mit einer verstärkten Stresstoleranz in Zusammenhang gebracht. Die Stress-Ursachen können dabei sehr vielfältig sein und umfassen intensives Licht, Temperaturextreme, Wasser- und Nähstoffmangel, hohe Schwermetallkonzentrationen, aber auch Infektionen und Schädigungen durch Herbivore (Gould und Lister 2006).

Exzessives Licht kann bei Pflanzen zu einer Photoinhibition, also zu einem charakteristischen Rückgang der Photosyntheseeffizienz, führen. Dieser Rückgang geht mit der Bleichung des Chlorophylls und einer Denaturierung der an der Photosynthese beteiligten Proteine, insbesondere der des Photosystems II, einher. Anthocyane absorbieren Licht im sichtbaren Bereich und können dadurch das Ausmaß der Photoinhibition reduzieren (Steyn et al. 2002; Gould und Lister 2006). Auch UV-Licht kann sich negativ auf die Pflanze auswirken. Einer der kritischen Effekte, ist die Schädigung der DNA. Polyphenole absorbieren auch Licht in diesem Bereich (Hatier und Gould 2009). Insbesondere acylierte Anthocyane zeigen hier eine große Absorptionskapazität (Giusti et al. 1999).

Stressfaktoren, wie UV-Licht, können zu der Bildung von reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) führen (Hatier und Gould 2009; Gould und Lister 2006). Zu hohe ROS-Gehalte bewirken Schäden an der DNA, an Phospholipiden und Proteinen in der Zelle (Alscher et al. 1997). Andererseits haben ROS auch eine wichtige Signal- und Regulierungsfunktion innerhalb der Pflanzen, weswegen ausgeglichene ROS-Gehalte in der Pflanze lebensnotwendig für sie sind (Gechev et al. 2006). Polyphenole sind antioxidativ wirksam, können ROS inaktivieren und tragen neben anderen wichtigen Antioxidantien, wie Glutathion und Ascorbinsäure, zu einem ROS-Gleichgewicht in der Pflanze bei (Huang et al. 2019).

Eine weitere Eigenschaft der Polyphenole ist ihre Fähigkeit Schwermetalle durch Chelatbildung zu komplexieren und somit zu deren Detoxifizierung und einer höheren Schwermetalltoleranz beizutragen (Keilig und Ludwig-Müller 2009; Amadi et al. 2019; Adhikari et al. 2018; Kidd et al. 2001).

Des Weiteren sind Polyphenole an der Pathogen- und Herbivoren-Abwehr beteiligt. Hohe Gehalte an Procyanidinen und anderer Flavonoide bewirken einen adstringierenden Geschmack der unreifen Erdbeerfrucht (Amil-Ruiz et al. 2011). Außerdem konnten Jersch et al. 1989 nachweisen, dass wässrige Extrakte unreifer Erdbeerfrüchte direkt antimykotisch auf die Grauschimmelfäule (*Botrytis cinerea*) wirken. Dafür sind vermutlich insbesondere die Procyanidine verantwortlich (Puhl und Treutter 2008; Hanhineva et al. 2009). Analog dazu schwächt Catechin in Erdbeerblättern die Anfälligkeit gegen *Alternaria alternata* (Yamamoto et al. 2000). Auch die Ellagtannine und Flavonole scheinen an der Pathogenabwehr beteiligt zu sein (Hukkanen et al. 2007; Fait et al. 2008; Amil-Ruiz et al. 2011; Nemeč 1976).

Neben der Rolle der Polyphenole bei der Stress- und Pathogenabwehr, haben diese auch eine wichtige Bedeutung bei der Fortpflanzung und Pflanzenentwicklung (Falcone Ferreyra et al. 2012).

Die Farbentwicklung der Anthocyane in der Frucht geht mit der Reifung einher und ist ein wichtiges Locksignal für den Verzehr durch Samenverbreiter (Willson und Whelan 1990). Nur der Verzehr der reifen Samen führt letztendlich zu einer Fortpflanzung und dadurch zum Vorteil für die Pflanze (Tiffney 2004). Eine rote Farbe, wie bei der Erdbeerfrucht, spricht dabei insbesondere Vögel und trichromatische Primaten an, da diese den Unterschied zwischen einer grünen und einer roten Frucht wahrnehmen können (Steyn 2009).

Des Weiteren konnte durch Muhlemann et al. 2018 gezeigt werden, dass die Entwicklung der Pollenschläuche der Tomate durch Flavonole positiv beeinflusst wird. Flavonole regulieren die ROS-Homöostase und ermöglichen dadurch die sexuelle Fortpflanzung, die ansonsten durch zu hohe ROS-Gehalte (induziert durch Stress) verhindert werden würde.

Darüber hinaus konnte auch ein Einfluss der Flavonoide auf den Transport des Pflanzenhormons Auxin nachgewiesen werden (Peer und Murphy 2007; Buer und Muday 2004). Auxin reguliert das Pflanzenwachstum und viele weitere Pflanzenentwicklungsprozesse (Palme und Gälweiler 1999; Guilfoyle und Hagen 2007; Nitsch 1950).

1.2.3. Effekte auf den Menschen

Einer der Gründe für die intensive Erforschung der Polyphenole sind die gesundheitlich positiven Wirkungen, die mit ihrem Verzehr assoziiert werden. Diverse *in vivo* und *in vitro* Studien weisen Polyphenolen eine entzündungshemmende, kardioprotektive, antikanzinogene, antidiabetische, gewichtsreduzierende, neuroprotektive, präbiotische und antimikrobielle Wirkung nach (Afrin et al. 2016; Alvarez-Suarez et al. 2014; Paquette et al.

2017; Seeram 2008; Kumar Singh et al. 2019; Krikorian et al. 2010; Xing et al. 2019; Tsuda 2012).

Als Basis für diese physiologischen Effekte wird insbesondere die antioxidative Eigenschaft der Polyphenole, die auch bei ihrer Funktion innerhalb der Pflanze eine wichtige Rolle spielt (vgl. 1.2.2), diskutiert (Toufektsian et al. 2008; Bornsek et al. 2012; Kolosova et al. 2004; Rossetto et al. 2002; Weisel et al. 2006). In der Erdbeerfrucht zeigen vor allem Anthocyane und Ellagsäure bzw. Ellagantannine ein stark antioxidatives Potential (Aaby et al. 2007; Zhang et al. 2008b). Als weitere möglicher Wirkmechanismus wird ein Einfluss auf Transkriptionsfaktoren und damit auf die Genexpression und die Proteinbildung diskutiert (Giampieri et al. 2014; Masella et al. 2005; Hou et al. 2004).

Die direkte Bioverfügbarkeit der Polyphenole im menschlichen Organismus, insbesondere die der Anthocyane, wird allerdings als eher gering eingeschätzt (Banaszewski et al. 2013; Felgines et al. 2003). Die Struktur der Polyphenole kann nach dem Verzehr unabhängig von dem humanen Phase II Metabolismus einer starken Veränderung unterliegen. Zum einen durch einen chemischen Zerfall, zum anderen auch durch die aktive Metabolisierung durch das Mikrobiom (Kay et al. 2017). Die Abbauprodukte tragen einen wesentlichen Teil zur gesamten Bioverfügbarkeit der Polyphenole (Czank et al. 2013; Ferrars et al. 2014) und letztendlich zu ihrer physiologischen Wirkung bei (Rafiei et al. 2019; Cassidy und Minihane 2017).

1.3. Allergene

Eine Nahrungsmittelallergie ist als eine wiederholt auftretende spezifische Immunantwort nach der Exposition gegenüber einem bestimmten Nahrungsmittel definiert, die nachteilige Auswirkungen auf die Gesundheit hat (Boyce et al. 2010). Die Symptome können dabei von Nesselsucht, Übelkeit, Erbrechen, Bauchschmerzen bis hin zu einer Anaphylaxie reichen und treten meistens innerhalb kurzer Zeit nach Verzehr des entsprechenden Lebensmittels auf (Fu et al. 2019a). Die Immunreaktion kann Immunoglobulin IgE vermittelt und/oder nicht-IgE vermittelt auftreten (Burks et al. 2012). Die Beteiligung des Immunsystems grenzt die Nahrungsmittelallergie von einer Nahrungsmittelunverträglichkeit ab (Boyce et al. 2010). In Europa leiden 0,3 bis 5,6 % der Bevölkerung unter einer Nahrungsmittelallergie. Die Prävalenz und die Auslöser der Allergien zeigen jedoch eine starke regionale Varianz (Lyons et al. 2019).

Bei den Allergie-auslösenden-Stoffen, den Allergenen, handelt es sich in der Regel um Proteine, teils aber auch um chemische Haptene (Boyce et al. 2010). Haptene sind niedermolekulare Stoffe, die im Gegensatz zu den Protein-Allergenen für eine Immunreaktion

zunächst eine Bindung mit makromolekularen Carriern, wie Proteinen, eingehen müssen (López-Puertollano et al. 2020).

Es wurden bereits mehr als 180 allergene Proteine in Lebensmitteln identifiziert. Jedoch gehören mehr als 90 % dieser Allergene zu nur acht Nahrungsmittelgruppen (Milch, Eier, Fisch, Krebstiere, Sojabohnen, Weizen, Erdnüsse und Nüsse) (Poms et al. 2004). In der Europäischen Union ist gemäß Artikel 21 in Verbindung mit Anhang II der VO (EU) Nr. 1169/2011 die Kennzeichnung dieser Stoffe (einschließlich Sellerie, Senf, Sesamsamen, Schwefeldioxid und Sulphite, Lupinen und Weichtiere) und der daraus gewonnen Erzeugnisse, sofern diese auch in veränderter Form Allergien oder Unverträglichkeiten auslösen können, verpflichtend. Die meisten Nahrungsmittelallergene können sowohl im rohen, gekochten oder verdauten Zustand eine Reaktion auslösen, einige Allergene, wie z.B. Allergene aus Obst oder Gemüse, verursachen jedoch überwiegend Symptome, wenn sie roh verzehrt werden (Burks et al. 2012).

1.3.1. Klassifizierung der Allergene

1986 wurde durch die WHO/ IUIS eine einheitliche Nomenklatur der Allergene eingeführt (Marsh et al. 1986; King et al. 1994; King et al. 1995). Zunächst erfolgt die Bezeichnung der Gattung (3 Buchstaben), gefolgt von einem einzelnen Buchstaben, der die Art beschreibt, und einer Nummer, die chronologisch in Reihenfolge der Identifizierung/Aufreinigung vergeben wird (Abbildung 12). Diese Bezeichnung kann dabei mehrere molekulare Formen eines Allergens umfassen. Isoallergene, sind Allergene einer Art, die in mehr als 67% der Primärstruktur übereinstimmen. Die Unterscheidung der Isoallergene ist bei der Allergen-Nomenklatur durch zwei zusätzliche Nummern möglich. Zwei weitere Nummern beschreiben die polymorphen Isoformen oder Varianten eines Allergens, die in der Regel eine Sequenzidentität von mehr als 90% aufweisen (Chapman et al. 2007). Spiric et al. 2015 konnten 18 verschiedene Isoallergene und Varianten des Birkenpollenallergens Bet v 1 identifizieren. Die Isoform und Variante des Allergens kann das allergene Potential beeinflussen. Analysen von Seutter von Loetzen et al. 2019 zeigten für acht rekombinante Isoformen und Varianten von Bet v 1 eine IgG Bindung von 51 % bis 135 % im Vergleich zu Bet v 1.0101, dem Hauptallergen der Birke.

Bet	<i>Betula</i> = Gattung
v	<i>verrucosa</i> = Art
1	Allergen-Nummer
.01	Isoallergen-Nummer
01	Isoform-Nummer

Abbildung 12: Allergennomenklatur am Beispiel des Birkenpollenallergens Bet v 1.0101

Strukturell können Nahrungsmittelallergene pflanzlichen Ursprungs gemäß der Pfam-Proteindatenbank in nur 31 Proteinfamilien klassifiziert werden (Fu et al. 2019b). 60 % dieser Allergene gehören jedoch zu nur vier Proteinfamilien, der Prolamin Superfamilie (Samenspeicherproteine), der Cupin Superfamilie (multifunktionelle Proteine), den Profilinen (cytosolische Proteine involviert in der Reorganisation von Mikrofilament) und der Bet v 1 Superfamilie (Radauer und Breiteneder 2007; Hauser et al. 2008; Breiteneder und Radauer 2004). Die Bet v 1 Superfamilie kann in die Familie der Latexproteine und Reife-induzierte-Proteine, sowie Norcochlorin-Synthasen, Cytokinin-bindende Proteine und der PR-10 Proteine unterteilt werden (Radauer und Breiteneder 2007). Mitglieder dieser Familie sind aus 153-160 Aminosäuren aufgebaut und besitzen ein durchschnittliches Molekulargewicht von ca. 17 kDa (Seutter von Loetzen et al. 2012). Das Birkenpollenallergen Bet v 1 gehört zu den PR-10 Proteinen (Breiteneder et al. 1989). Bei dieser Proteinfamilie handelt es sich um durch Pathogene und abiotischen Stress induzierte Proteine (Fernandes et al. 2013; Sinha et al. 2014).

Die strukturelle Ähnlichkeit von Allergenen ist von entscheidender Bedeutung, da diese für das Auftreten sogenannter Kreuzallergien verantwortlich ist (Jenkins et al. 2005). Patienten, die unter einer bestimmten Allergie leiden, können auch eine Allergie mit einem strukturverwandten Allergen entwickeln (Vieths et al. 2002; Biedermann et al. 2019). Das Auftreten von Kreuzallergien überschreitet dabei auch Arten- und Familiengrenzen ihres pflanzlichen Ursprungs (Ebner et al. 1995; Gall et al. 1994). Auf Grund der strukturellen Ähnlichkeit von Allergenen in Nahrungsmitteln mit dem Birkenpollenallergen Bet v 1 kann es zu der Entwicklung einer sogenannten Pollen-assoziierten Nahrungsmittelallergie kommen (Gall et al. 1994).

1.3.2. Effekte der Bet v 1 Homologe auf den Menschen

Eine Birkenpollenallergie ist mit einer Prävalenz von etwa 8-16 % in der europäischen Bevölkerung relativ häufig (Biedermann et al. 2019). Wiederum 50-90 % der Patienten, die gegen Bet v 1, dem Hauptbirkenpollenallergen, allergisch sind, entwickeln eine Pollen-assoziierten Nahrungsmittelallergie (Erdmann et al. 2005; Dreborg 1988; Geroldinger-Simic et al. 2011; Seutter von Loetzen et al. 2012).

Die Basis dafür ist, dass IgE-Antikörper wegen der strukturellen Ähnlichkeit auch andere Bet v 1 Homologe binden können (Ebner et al. 1995). Bet v 1 Homologe umfassen Proteine aus diversen Pflanzenarten und -familien, u.a. auch Fra a 1 aus der Erdbeere (Tabelle 1).

1. Einleitung

Tabelle 1: Bet v 1 Homologe (Allergome 2020)

Allergen	Quelle	Botanischer Name	Familie
Act c 8	Gelbe Kiwi	<i>Actinidia chinensis</i>	Actinidiaceae
Act d 11	Grüne Kiwi	<i>Actinidia deliciosa</i>	Actinidiaceae
Act d 8	Grüne Kiwi	<i>Actinidia deliciosa</i>	Actinidiaceae
Api g 1	Sellerie	<i>Apium graveolens</i>	Apiaceae
Dau c 1	Karotte	<i>Daucus carota</i>	Apiaceae
Aln g 1	Schwarz-Erle	<i>Alnus glutinosa</i>	Betulaceae
Bet v 1	Birke	<i>Betula verrucosa</i>	Betulaceae
Car b 1	Hainbuche	<i>Carpinus betulus</i>	Betulaceae
Cor a 1	Haselnuss	<i>Corylus avellana</i>	Betulaceae
Ost c 1	Hopfenbuche	<i>Ostrya carpinifolia</i>	Betulaceae
Ara h 8	Erdnuss	<i>Arachis hypogaea</i>	Fabaceae
Gly m 4	Sojabohne	<i>Glycine max</i>	Fabaceae
Vig r 1	Mungobohne	<i>Vigna radiata</i>	Fabaceae
Vig r 6	Mungobohne	<i>Vigna radiata</i>	Fabaceae
Cas s 1	Esskastanie	<i>Castanea sativa</i>	Fagaceae
Fag s 1	Blutbuche	<i>Fagus sylvatica</i>	Fagaceae
Que a 1	Weiss-Eiche	<i>Quercus alba</i>	Fagaceae
Que i 1	Stein-Eiche	<i>Quercus ilex</i>	Fagaceae
Que m 1	Mongolische Eiche	<i>Quercus mongolica</i>	Fagaceae
Jug r 5	Walnuss	<i>Juglans regia</i>	Juglandaceae
Fra a 1	Erdbeere	<i>Fragaria x ananassa</i>	Rosaceae
Mal d 1	Apfel	<i>Malus domestica</i>	Rosaceae
Pru ar 1	Aprikose	<i>Prunus armeniaca</i>	Rosaceae
Pru av 1	Kirsche	<i>Prunus avium</i>	Rosaceae
Pru p 1	Pfirsich	<i>Prunus persica</i>	Rosaceae
Pyr c 1	Birne	<i>Pyrus communis</i>	Rosaceae
Rub i 1	Himbeere	<i>Rubus idaeus</i>	Rosaceae
Sola l 4	Tomate	<i>Solanum lycopersicon</i>	Solanaceae

Bei der Entwicklung der Allergie findet zunächst eine Sensibilisierung des Patienten statt (Anvari et al. 2019). Die Aufnahme des Allergens führt über eine Signalkaskade zu der Bildung spezifischer IgE Antikörper (Averbeck et al. 2007). Da die PR-10 Proteine als sehr instabil gegenüber Hitze und Verdauung gelten, wird angenommen, dass die Sensibilisierung zunächst überwiegend mittels Bet v 1 oder anderen homologen Pollenallergenen stattfindet,

die über die Schleimhaut der Atemwege in den Körper gelangen (Hauser et al. 2008; Breiteneder und Mills 2005).

Im Anschluss an die Sensibilisierung können bei erneutem Kontakt mit dem Allergen an Mastzellen gebundene IgE Antikörper diese in einem so genannten Antigen-Antikörper-Komplex binden (Sofortreaktion) (Valenta 2002). Daraufhin folgt in den Mastzellen die Freisetzung von Entzündungsmediatoren, wie Histamin oder Leukotrienen (Amin 2012). Diese können unmittelbare Symptome wie eine Rhinitis, Bindehautentzündung oder Asthma auslösen (Visco et al. 1996).

Mache Patienten können zusätzlich erst zwei Stunden bis zwei Tagen nach der Exposition Symptome einer Spätreaktion, wie Ödeme, Schmerzen, Rötungen oder Verengungen der Atemwege aufweisen (Galli et al. 2008). Bei der Spätreaktion sind neben den Mediatoren der Mastzellen auch noch andere Zellen, wie die T-Zellen, involviert (Galli et al. 2008; Huston 2019)

1.3.3. Bet v 1 Homologe der Erdbeere

In Erdbeeren konnten bereits Allergene der Bet v 1 Superfamilie (Fra a 1), der Familie Lipidtransferproteine (Prolamine) (Fra a 3) und der Profiline (Fra a 4) nachgewiesen werden (Zuidmeer et al. 2006; Karlsson et al. 2004). Studien belegen jedoch, dass Fra a 3 für die Erdbeerallergie kaum eine Rolle spielt (Zuidmeer et al. 2006; Andersen et al. 2011).

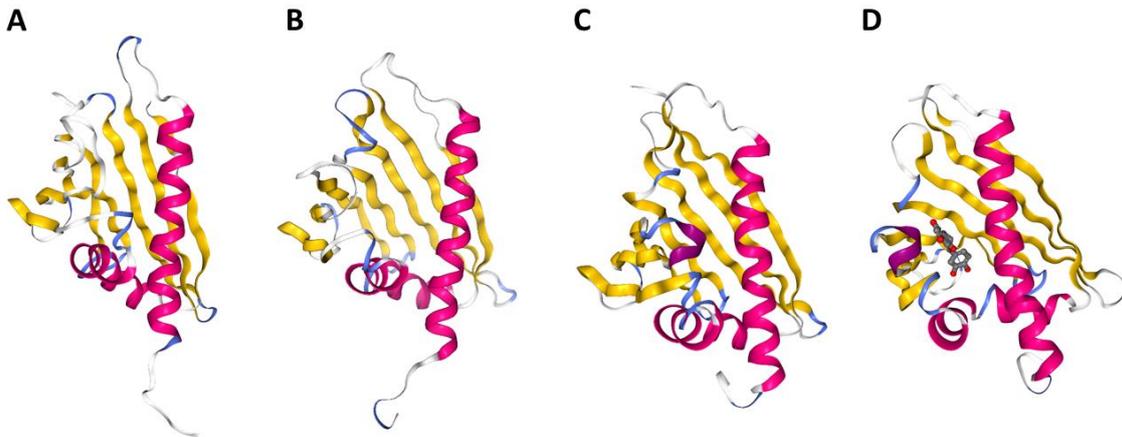


Abbildung 13: Proteinstruktur A) Bet v 1.01 (1B6F) B) Fra a 1.01E (2LPX) C) Fra a 1.02 (6ST8) D) Fra a 1.03-Catechin Komplex (4C94) (Protein Data Bank (PDB) 2020)

Fra a 1 gehört, wie Bet v 1, zu den PR-10 Proteinen (Karlsson et al. 2004). Auf Grund der strukturellen Ähnlichkeit beider Allergene kann eine Pollen-assoziierte Erdbeerallergie entstehen. Bisher wurden 30 verschiedene Fra a 1 Allergene identifiziert (Ishibashi et al. 2018; Musidowska-Persson et al. 2007; Karlsson et al. 2004; Franz-Oberdorf et al. 2016; Hjernø et al. 2006). Diese Allergene teilen eine Sequenzhomologie von 73-99 % (Ishibashi et al. 2018).

Bei Vergleich der Kristallstrukturen von Fra a 1.01E und Bet v 1.01 wird die hohe Übereinstimmung von Fra a 1 und Bet v 1 deutlich (Abbildung 13) (Seutter von Loetzen et al. 2012; Schweimer et al. 1999; Gajhede et al. 1996). Beide Proteine bestehen aus einem sieben-strängigen antiparallelen β -Faltblatt, sowie zwei kurzen v-förmig angeordneten α -Helices und einer langen α -Helix, die einen hydrophoben Hohlraum umschließen. Eine weitere Gemeinsamkeit ist eine Glycin-reiche Schleife (AS 46-51). Jedoch ist bei Fra a 1.01E mit 2500 Å das Volumen des hydrophoben Hohlraums im Gegensatz zu 1600 Å bei Bet v 1 deutlich größer. Auch der Eingang zu diesem ist durch eine andere Orientierung der C-terminalen Helix und eine Umlagerung der Aminosäuren im N-Terminus der Helix deutlich größer. Orozco-Navarrete et al. 2020 konnten jedoch zeigen, dass auch zwischen den Isoallergenen Varianzen in der 3D-Struktur zu beobachten sind. Fra a 1.02 und Fra a 1.03 haben nur eine Taschengröße von 1671 Å bzw. 1646 Å und ähneln dadurch im Volumen mehr Bet v 1.01. Die größten Unterschiede zwischen den Isoallergenen liegen im Bereich der flexiblen Schleifen am Eingang zum Hohlraum und in der α -Helix.

Die Fra a 1 Isoformen sind in den Pflanzenorganen unterschiedlich vertreten (Muñoz et al. 2010). Das *Fra a 1.01E* Gen wird hauptsächlich in den Wurzeln exprimiert, während *Fra a 1.02* insbesondere im späten Reifestadium der Frucht exprimiert wird. *Fra a 1.03* zeigt eine Hochregulierung in der Blüte.

Der Fra a 1 Gehalt der Erdbeere hängt jedoch auch vom Genotyp und den Umweltbedingungen ab (Alm et al. 2007; Kurze et al. 2018; Franz et al. 2013; Franz-Oberdorf et al. 2017a; Ishibashi et al. 2019; Tulipani et al. 2011; Kaiser et al. 2016; Besbes et al. 2019b).

Durch einen basophilen Aktivierungstest konnte insbesondere für die Isoallergene Fra a 1.02 und Fra a 1.03 ein hohes allergenes Potential nachgewiesen werden (Franz-Oberdorf et al. 2016). Im Zusammenhang mit einer deutlich höheren *Fra a 1.02* Expression in der reifen Erdbeerfrucht ist es möglich Fra a 1.02 als Hauptallergen der Erdbeere zu klassifizieren.

1.3.4. Pflanzenfunktion der Bet v 1 Homologe

Bet v 1 und Fra a 1 gehören zu den PR-10 Proteinen. PR-Proteine sind als Proteine definiert, die durch Pathogene und abiotischen Stress induziert werden (Fernandes et al. 2013). Die Struktur und Funktion dieser Protein-Gruppe kann sich auf Grund dieser weitgefächerten Definition sehr unterscheiden (Sinha et al. 2014). Die PR-Proteine können entsprechend ihrer Primärsequenzhomologie und ihrer Funktionen in 17 verschiedene Protein-Familien unterteilt werden (van Loon et al. 2006). In der Erdbeere konnten bereits Proteine aus zehn dieser Familien identifiziert werden (Amil-Ruiz et al. 2011). Diese umfassen Enzyme wie β -1,3-Glucanasen (PR-2) (Kahn 2002), Chitinasen (PR-3) (Casado-Díaz et al. 2006), Lipid-Transfer-

Proteine (PR-14) (Yubero-Serrano et al. 2003; Zuidmeer et al. 2006), aber auch Proteinase-Inhibitoren (PR-6) (Martinez et al. 2005) und Proteine der PR-10 Gruppe (Karlsson et al. 2004), deren exakte Funktion in Pflanzen trotz intensiver Erforschung bisher nicht genau identifiziert werden konnte.

Es wurde jedoch bereits für diverse PR-10 Proteine der Erdbeere nachgewiesen, dass diese durch eine Infektion mit *Verticillium dahliae* in Blättern, Stängel und Wurzeln verstärkt exprimiert werden (Besbes et al. 2019b). Die Veränderung der Expression ist dabei abhängig von dem Pflanzenorgan und dem jeweiligen PR-10 Protein. Die Einflüsse von Standort und Jahreszeit auf den Fra a 1-Gehalt der Erdbeerfrucht belegen auch den Einfluss von abiotischen Faktoren auf die PR-10 Proteine der Erdbeere (Alm et al. 2007; Ishibashi et al. 2019).

Durch Besbes et al. 2019a konnte bereits eine Phosphorylierungs-abhängige RNase-Aktivität von rekombinanten Fra a 1.04 - Fra a 1.08 festgestellt werden. Erst durch Dephosphorylierung der phosphorylierten Fra a 1.04, Fra a 1.05, Fra a 1.07 und Fra a 1.08 war eine RNase-Aktivität zu beobachten.

Eine Studie von Muñoz et al. 2010 ergab hingegen insbesondere eine Reduzierung von Phenylpropanoiden und Anthocyanen durch transientes Silencing von Fra a 1 Genen in Erdbeerfrüchten mittels ihpRNA-Konstrukt. Parallel dazu konnte auch eine Reduzierung der FaPAL und FaCHS Transkripte beobachtet werden. Dies lässt auch eine Involvierung in die Polyphenolbiosynthese vermuten. Diese Hypothese wird durch Casañal et al. 2013 verstärkt, die die Bindungen zwischen Fra a 1 Proteinen und Flavonoiden mittels Isothermaler Titrationskalorimetrie und Röntgenkristallographie nachweisen konnten. Interessanterweise ergaben sich außerdem für unterschiedliche Isoallergene verschiedene Bindungs-Spezifitäten. Fra a 1.01E kann Quercetin-3-glucuronid binden, während Fra a 1.02 Myricetin und Fra 1.03 Catechin bindet (Abbildung 13). Analog dazu konnte auch für Bet v 1 eine Isoallergen-abhängige Bindung von Flavonoid-Liganden festgestellt werden (Seutter von Loetzen et al. 2015; Seutter von Loetzen et al. 2014). Muñoz et al. 2010 und Casañal et al. 2013 postulieren auf Grund der Bindung der Fra a 1 Proteine von Flavonoiden eine Funktion beim Transport der Zwischenprodukte der Flavonoid-Biosynthese oder der finalen Produkte, wie den Anthocyanen zur Vakuole, oder als Signalkomponente, die durch die Bindung mit Flavonoiden den Metabolitenfluss reguliert.

Des Weiteren konnte eine Bindung der Fra a 1 Isoformen mit einem Fra a 1 assoziierten Protein (FaAP) nachgewiesen werden (Franz-Oberdorf et al. 2017b). Fra a 1.02 und Fra a 1.03 binden FaAP monomer, während Fra a 1.01E eine Dimer-Bindung aufweist. Analog dazu wurde zuvor auch im Apfel ein Bindung des PR-10 Proteins Mal d 1 mit MdAP beobachtet

(Puehringer et al. 2003). Die Bindung der PR-10 Proteine mit diesen assoziierten Proteinen könnte der Beleg sein, dass diese in ein Proteinnetzwerk integriert sind und dass die assoziierten Proteine entscheidend für ihre biologische Funktion sind (Franz-Oberdorf et al. 2017b).

1.4. Aufgabenstellung

Der Klimawandel und die Globalisierung sind eine Herausforderung für die europäische Nahrungsmittelproduktion. Der Klimawandel führt zu sich verändernden, immer extremer werdenden Wetterlagen, die insbesondere für den Anbau von pflanzlichen Lebensmitteln problematisch sind. Es kann zu Ernteaussfällen und Qualitätsverlusten kommen. Pflanzen sind jedoch die Basis der gesamten Lebensmittelproduktionskette und daher ist deren verlässliche Produktion unabdingbar. Auf Grund des globalen Handels unterliegen die Anbauer zusätzlich einer weltweiten Konkurrenz um den Absatz ihrer Produkte. Wünschenswert wären also Pflanzen, die auch extreme Umweltbedingungen bewältigen können und deren Erzeugnisse sich zudem mit einer besonderen Qualität auszeichnen. Um dies zu erreichen ist jedoch ein genaueres Verständnis der Regulierung des Pflanzenmetabolismus unerlässlich.

Erdbeeren sind ein beliebtes Obst und werden weltweit produziert. Polyphenole und das Erdbeerallergen *Fra a 1.02* sind Teil des Pflanzen-Verteidigungssystems der Kulturerdbeere *Fragaria x ananassa*. Auf Grund der Farbgebung und den gesundheitlich positiven Wirkungen, die mit ihrem Verzehr assoziiert werden, gelten hohe Polyphenolgehalte als Zeichen einer guten Fruchtqualität, während es im Gegenteil wegen des allergenen Potentials von *Fra a 1.02* erstrebenswert ist, Früchte mit einem möglichst niedrigen Gehalt zu produzieren.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Untersuchung des Effekts des Genotyps und der Umwelt auf den Polyphenol- und Allergengehalt der Erdbeere, sowie der genaueren Charakterisierung des Metabolismus in Abhängigkeit relevanter Gene der Polyphenol-Biosynthese und des Erdbeerallergens *Fra a 1.02*.

Zunächst wurde mittels LC-MS das Polyphenolprofil einer französischen-Erdbeerkreuzungspopulation, sowie der GoodBerry-Erdbeerkreuzungspopulation charakterisiert. Da die GoodBerry-Population an fünf verschiedenen klimatisch unterschiedlichen europäischen Standorten (Spanien, Italien, Frankreich, Polen und Deutschland) angebaut wurde, konnte hier auch der Einfluss der Umwelt betrachtet werden. Darüber hinaus wurde der *Fra a 1.02*-Gehalt der GoodBerry-Population auf Umwelt- und Genotypen-Effekte mit indirekt kompetitiven ELISA untersucht.

Mittels Klonierung und einem Aktivitäts-Assay der rekombinanten Proteine konnten Unterschiede in den Anthocyan-Malonyltransferasen der „GoodBerry“-Elternsorten identifiziert werden.

Auch die Veränderung des Polyphenolprofils nach Herunterregulierung der Flavonol-Synthase *FaFLS* und des Erdbeerallergens *Fra a 1.02* in transgenen Erdbeeren wurde analysiert.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Pflanzliches Material

2.1.1.1. GoodBerry-Erdbeerkreuzungspopulation

Eine Kreuzungspopulation aus den *Fragaria x ananassa* Varietäten 'Candonga' und 'Senga Sengana' wurde durch Hansabred GmbH & Co. KG erzeugt. Die sich ergebenden F1 Generation, sowie die Elternlinien, wurden an fünf verschiedenen Standorten in Europa (Deutschland, Polen, Frankreich, Spanien und Italien) für zwei Jahre angebaut (Tabelle 2 und Abbildung 14). Pro Genotyp und pro Standort wurden zehn Pflanzen kultiviert.

Auf Grund von Vermehrungsproblemen konnten im ersten Anbaujahr nur 37 von 117 Genotypen angebaut werden. Des Weiteren standen nicht immer zehn Pflanzen pro Genotyp zur Verfügung. Außerdem gab es an einzelnen Standorten vereinzelt Ausfälle einzelner Genotypen.

Tabelle 2: Standorte der GoodBerry-Kreuzungspopulation

Projekt-partner	Hansabred	INHORT	Ciref	IFAPA	UPM
Land	Deutschland	Polen	Frankreich	Spanien	Italien
Lage	51°8'42"N	51°95'N	44°85'N	37°12'22"N	43°31' N
Erdtyp	sandiger Lehm auf Kiesboden	pseudo-podsolischer Boden mit leichtem Lehm	erdlos	sandig	40% Ton, 25% Sand und 35% Schluff; 9 % aktiver Kalk
Boden pH	4,9	6,5-7,0	6,8	6,5-7,0	7,9
Anbaubedingung	offenes Feld	offenes Feld	erdlos, unter Tunnel	Plastiktunnel, Plastikmulch, Erddamm	Plastikmulch, Erddamm
Bewässerung	Beregnung	Tröpfchenbewässerung	Tröpfchenbewässerung	Tröpfchenbewässerung	Tröpfchenbewässerung
Schutz vor Frostschäden	je nach Wetterlage ein Antifrost-Fleece	nein	nein	ab Mitte November	nein

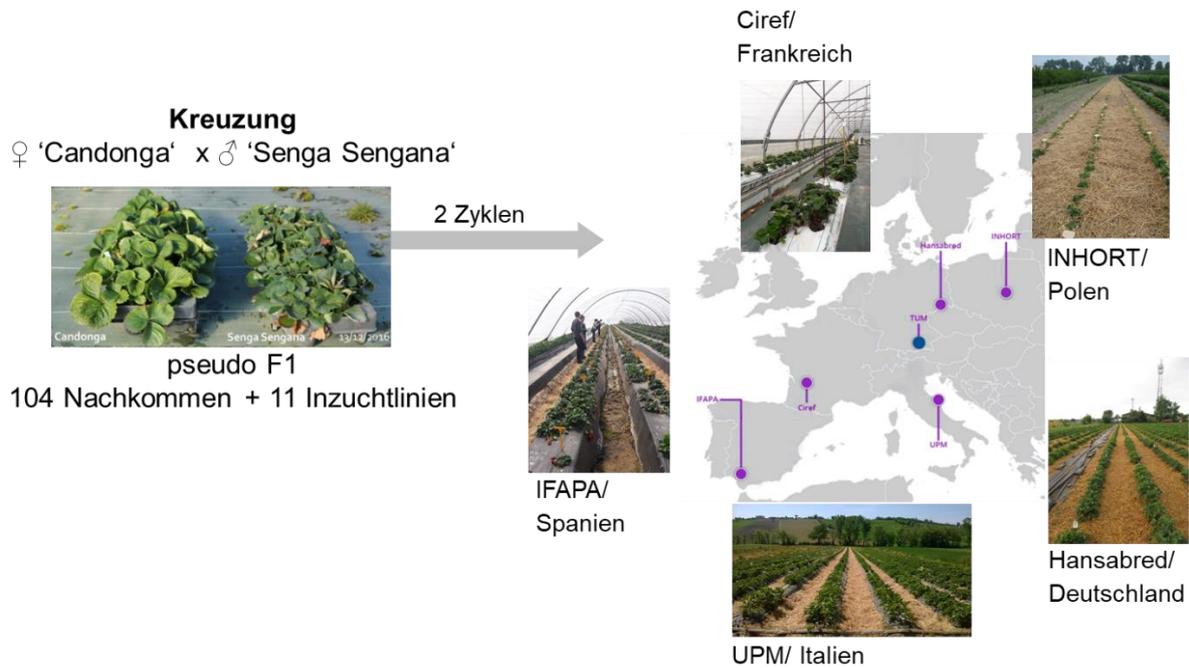


Abbildung 14: Standorte der GoodBerry-Kreuzungspopulation

Die reifen Früchte wurden nach der Ernte und dem Entfernen der Calyx in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert. Da der Ertrag der unterschiedlichen Genotypen unklar war und eine Vielzahl an verschiedenen Analysen innerhalb des GoodBerry-Projekts geplant waren, wurde die gesamte Ernte eines Genotyps zunächst zusammen zu einer Bulk-Probe kombiniert. Erst nach vollendeter Ernte wurde nach grobem Homogenisieren der ganzen oder halbierten Früchte eine Unterteilung in drei gleich große biologische Replikate durchgeführt.

Das Mörsern erfolgte, mit Ausnahme der Proben aus Deutschland (Hansabred), durch die für den Anbau zuständigen Projektpartner. Während des Mörserns wurden die Erdbeeren, sowie alle benutzten Geräte, mit flüssigem Stickstoff gekühlt. Das Fruchtpulver wurde bis zur Analyse bei -80°C gelagert. Der Transport zum Analysenstandort erfolgte auf Trockeneis. Die Proben von Hansabred wurden als intakte Erdbeeren auf Trockeneis geschickt und vor Ort gemörsert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Hälfte aller vorhandenen GoodBerry-Genotypen analysiert, alle weiteren Genotypen, sowie die Elternsorte 'Senga Sengana' deren Daten im Weiteren auch mit einbezogen werden, wurden von Annika Haugeneder bearbeitet.

2.1.1.2. Französische Erdbeerkreuzungspopulation

Bei der hier analysierten französischen Kreuzungspopulation handelt es sich um eine Auswahl von 48 Nachkommen einer Kreuzung der Erdbeersorten 'Capitola' und 'CF1116'. Das bereits gemörserte Fruchtmaterial wurde von Béatrice Denoyes (INRA) geliefert. Hierfür wurden Tray-Pflanzen in einer erdlosen Kultur angebaut und die Früchte 2017 geerntet. Der Transport zur TUM erfolgte auf Trockeneis. Die Lagerung fand bei -80°C statt. Die französische

Kreuzungspopulation der Erntejahre 2009, 2010 und 2011 wurden bereits von Ludwig Ring analysiert (Ring 2013).

2.1.1.3. Transgenes Pflanzenmaterial

In Rahmen dieser Arbeit wurde Probenmaterial von siFaFLS- und siFra a 1.02-Pflanzen sowie ihren jeweiligen Kontrolllinien analysiert (Tabelle 3).

Tabelle 3: Übersicht des analysierten transgenen Pflanzenmaterials

Probengruppe	Linie	Pflanzenmaterial	Ursprung
siFaFLS-Pflanzen	'Senga Sengana' Kontrolle siFaFLS F29	5 Fruchtstadien, Blüten, 2 Blattstadien, Wurzeln	Dürnast, Deutschland
siFra a 1.02-Pflanzen	'Senga Sengana' Kontrolle siFra F184	5 Fruchtstadien (2 Jahre), Blüten, 2 Blattstadien, Wurzeln	Dürnast, Deutschland
spanische siFra a 1.02-Früchte	pBIN4 (Kontrolle 1) pBIN4 (Kontrolle 2) Fra 4 Fra 5 Fra 6	reife Früchte	Spanien

Jeweils 15 Pflanzen der 'Senga Sengana' Kontrolllinie und der siFaFLS F29 Linie wurden in Töpfen im Gewächshauslaborzentrum Dürnast (GHL) der TUM kultiviert. Um das Risiko der Ansteckungen mit Pflanzenpathogenen zu reduzieren wurde für jede Pflanze eine separate Topfbewässerung installiert (Abbildung 15). Die Bestäubung erfolgte per Hand, die Probennahme 2018. Es wurden Blätter (jung und alt), Blüten, fünf Fruchtstadien (klein grün, groß grün, weiß, weiß/rot und rot) und Wurzeln beprobt. Von jeder Pflanze einer Linie wurde in etwa die gleiche Anzahl an



Abbildung 15: Kultivierung der FLS-Senga Sengana Kontrolle

Proben genommen. Nach der Probennahme wurde das Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in drei biologische Replikate eingeteilt. Die Wurzeln wurden zuvor mittels Mullbinden und Wasser von der restlichen Erde befreit. Bei den Früchten wurde der Calyx (Blütenkelch) entfernt. Zudem wurde vor dem Einfrieren das Fruchtgewicht der reifen Früchte bestimmt. Es folgten das Mörsern des gefrorenen Fruchtmaterials mit dem Personal Blender PB 250 unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff. Die Blüten wurden auf Grund des geringen Ertrags mittels Mörser und Pistill zerkleinert. Bis zur weiteren Aufarbeitung wurde das Probenmaterial bei -80 °C gelagert.

Die Kultivierung der siFra 1.02-Pflanzen, sowie deren Kontrolle ('Senga Sengana') erfolgte analog der siFLS-Pflanzen. Allerdings wurden diese Linien zusätzlich ein zweites Jahr (2019) kultiviert, um noch zusätzliche Fruchtproben entnehmen zu können. In diesem Jahr erfolgte keine manuelle Bestäubung. Auf Grund eines starken Mehltau-Befalls konnten keine weiteren Blüten-, Blatt- und Wurzelproben entnommen werden. 2018 wurden 15 Pflanzen der Kontrolle und 16 Pflanzen der der siFra 1.02-Linie beprobt, 2019 jeweils 10 Pflanzen.

Darüber hinaus wurde auch Probenmaterial reifer Früchte transgener siFra 1.02 durch Victoriano Valpuesta Fernández (UMA) aus Spanien erhalten. Ausgangsmaterial für diese Studie war die Erdbeersorte 'Camarosa'. Der Transport des gemörserten Fruchtmaterials (inklusive biologischer Replikate) erfolgte auf Trockeneis.

2.1.2. Messkontrollstandards

Die Messungen einiger Datensets dauerte teils mehrere Monate. Um über diesen längeren Zeitraum hinweg vergleichbare Messwerte gewährleisten zu können, wurden für die jeweiligen Methoden Standards eingeführt. Diese Standards ermöglichten zum einen die Kontrolle der Messstabilität, zum anderen die Option, die Ergebnisse zu normalisieren, wenn deutliche Messschwankungen zwischen Sub-Messsets auftraten.

Ausgangsmaterial der Messkontrollstandards waren Erdbeeren, die bei einem lokalen Supermarkt erworben wurden. Nach Entfernen der Calyx wurden diese Erdbeeren in flüssigem Stickstoff schockgefroren, und chargenweise mit einem Mixer, unter ständiger Kühlung durch flüssigen Stickstoff, zu feinem Pulver gemörsert. Das Pulver wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

2.1.2.1. Allergen-Standard

Bei jeder Aufarbeitung und ELISA-Messung der zu analysierenden Proben wurden drei Aliquote des Erdbeerkontrollstandards mitgeführt.

2.1.2.2. LC-MS Erdbeerstandard

Die Polyphenolextraktion für den LC-MS Erdbeerstandard erfolgte gemäß der Extraktion der Proben (vgl. 2.3.1.1), jedoch in einem größeren Maßstab. 218 g Erdbeerpulver wurden in zehn 50 ml Zentrifugenröhrchen eingewogen. Jeweils 10 ml Interner Standard (0.2 mg/ml Biochanin A in Methanol) wurden zugefügt. Nach Homogenisieren mittels Vortexer erfolgte die Zugabe von 10 ml Methanol. Anschließend wurde die Suspension 1 min gevortext und 10 min im Ultraschallbad behandelt. Die durch Zentrifugation (20 min, 4 °C, 10000 g) gewonnenen Überstände wurden in einem 2 L Rundkolben gesammelt. Die Rückstände wurden zweimal erneut, wie beschrieben, mit je 20 ml Methanol extrahiert.

Die vereinigten Überstände wurden am Rotationsverdampfer bis zur Entfernung des Methanols eingengt. Vollständiges Trocknen erfolgte mittels einer Gefriertrocknungsanlage über Nacht. Zum Rücklösen wurden 14 ml MQ-Wasser hinzugefügt. Es folgte eine Ultraschallbadbehandlung für 10 min. Die Suspension wurde zentrifugiert und der Überstand anschließend bei -80 °C eingefroren. Für die Messung an der LC-MS wurden Aliquote à 40 – 60 µl in Mikroensätze überführt. Die Aliquote wurden bis zur Messung bei -20 °C gelagert. Der LC-MS Standard wurde zusammen mit Annika Haugeneder erstellt.

2.1.3. Chemikalien

Tabelle 4: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Agarose, BioReagent for molecular biology	Sigma-Aldrich, Steinheim
Aktivkohle, p.a..	Roth, Karlsruhe
Aluminiumsulfat Hexadecahydrat ≥ 95 %, p.a.	Roth, Karlsruhe
Ameisensäure 98% p.a.	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	BioRad, Taufkirchen
Ampicillin Natriumsalz ≥ 97 % für die Molekularbiologie und Biochemie	Roth, Karlsruhe
Biochanin A	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Brilliant Blue G, for microscopy (Coomassie Blau)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Calciumchlorid Dihydrat, p.a. ≥ 99 %	Merck, Darmstadt
Chloramphenicol ≥ 98 %	Roth, Karlsruhe
Cyanidin-3-glucosid-chlorid	Extrasynthese, Genay
L-Cysteine	Roth, Karlsruhe
Di-Kaliumhydrogenphosphat ≥ 99 %, p.a.	Roth, Karlsruhe
N,N-Dimethylformamid (DMF)	Roth, Karlsruhe

2. Material und Methoden

Chemikalie	Hersteller
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
(Dinatrium)-5-Brom-4-chlor-3-oxindolylphosphat (BCIP)	Roth, Karlsruhe
Di-Natriumphosphat Dihydrat $\geq 99,5\%$, p.a.	Roth, Karlsruhe
Ellagsäure, 95 %	Sigma-Aldrich, Steinheim
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Fisher Scientific, Schwerte
Ethanol, absolute	VWR, Fontenay-sous-Bois
Ethylenediamintetraessigsäure Dinatriumsalz $\geq 99\%$ (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Glutathion red., $\geq 97\%$	Roth, Karlsruhe
Glycerin, $\geq 99,5\%$	Roth, Karlsruhe
Glycin, $\geq 99\%$, p.a.	Roth, Karlsruhe
Harnstoff, $\geq 99,5\%$	Roth, Karlsruhe
HDMF-glucosid	inhouse production (Rafal Jonczyk)
Hefeextrakt pulv. für die Bakteriologie	Roth, Karlsruhe
Imidazol, $>99\%$, zur Synthese	Merck, Darmstadt
Isopropanol	VWR, Fontenay-sous-Bois
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid $\geq 99\%$ (IPTG)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaempferol-3-glucosid	Carbosynth, Berkshire
Kaliumchlorid $\geq 99,5\%$	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat, $\geq 98\%$	Roth, Karlsruhe
2 x Laemmli Sample Buffer	BioRad, Taufkirchen
Magnesiumchlorid-Hexahydrat, p.a. $\geq 99\%$	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat, p.a., $\geq 98\%$	Fluka, Buchs
Malonyl-CoA, $\geq 90\%$	Sigma-Aldrich, Steinheim
2-Mercaptoethanol, 99 %, p.a.	Roth, Karlsruhe
Methanol "Baker HPLC Analyzed"	Fisher Scientific, Schwerte
Methanol "LC-MS Chromasolv"	Sigma-Aldrich, Steinheim
Milchpulver, Blotting grade	Roth, Karlsruhe
N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamin (TEMED), 99% für Elektrophorese	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat Trihydrat, $\geq 99,5\%$, p.a.	Roth, Karlsruhe
Natriumcarbonat Anhydrat	Riedel de Haën, Taufkirchen
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid $\geq 99,9\%$	Roth, Karlsruhe

2. Material und Methoden

Chemikalie	Hersteller
Natriumdiethyldithiocarbaminat Trihydrat, p.a. (DiECA)	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat Anhydrat	Fluka, Buchs
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat, ≥ 99.0 %, p.a.	Fluka, Buchs
Natriumhydroxid, ≥ 99 %	Roth, Karlsruhe
Natriumlaurylsulfat ≥ 99 % für Biochemie (SDS)	Roth, Karlsruhe
Nickeldichlorid	Fluka, Buchs
Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT)	Roth, Karlsruhe
Stickstoff (flüssig)	Linde, München
Orange G	Fluka, Buchs
Pelargonidin-3-glucosid-chlorid	Carbosynth, Berkshire
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phosphorsäure	Fluka, Buchs
Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP)	AppliChem, Darmstadt
Quercetin-3-glucosid	Roth, Karlsruhe
Quercetin-3-acetylglucosid	Extrasynthese, Genay
Rotiporese® Gel 30: 30 % Acrylamidlösung mit 0,8%	Roth, Karlsruhe
Biacrylamid	
Roti-Quant, 5x concentrate	Roth, Karlsruhe
Roti-Safe Gel Stain	Roth, Karlsruhe
Salzsäure 32 %	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure 96%	Roth, Karlsruhe
TMB-ELISA „1-Step™ Ultra“	Fisher Scientific, Schwerte
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) Pufferan ® ≥ 99,3 %, Buffer grade	Roth, Karlsruhe
Trizma Base	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypton/ Pepton aus Casein, für Mikrobiologie	Roth, Karlsruhe
Tween®20	Roth, Karlsruhe
X- β-Gal	Roth, Karlsruhe

2.1.4. Medien, Puffer und Lösungen

Tabelle 5: Medien

Medium	Herstellung
LB-Medium	10 g/L Natriumchlorid 10 g/L Trypton 5 g/L Hefeextrakt 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)

Tabelle 6: Puffer und Lösungen

Puffer/ Lösung	Herstellung
Glycerin für Cryostocks	32,5 ml Glycerin 0,6019 g Magnesiumsulfat 0,1514 g Tris auf 50 ml mit MQ-Wasser auffüllen pH 8,0
Reibungspuffer	100 mM Calciumchlorid 90 mM Magnesiumchlorid 40 mM Natriumacetat pH 5,5
50x TAE Puffer	242 g Tris 57,1 ml Essigsäure 100 ml 0.5 M EDTA pH 8,0 mit MQ auf 1 L auffüllen bei Bedarf 1:50 verdünnen
10x Orange Färbelösung	0,21 % Orange G 0,1 M EDTA (pH 8) 50 % Glycerol

2. Material und Methoden

Puffer/ Lösung	Herstellung
Für die Proteinaufreinigung von Fra a 1.02 rek (mit His-Tag)	
Rückfaltungspuffer	30 mM Tris 500 mM Natriumchlorid 15 mM Imidazol pH 7,5
Denaturierungspuffer	30 mM Tris 500 mM Natriumchlorid 15 mM Imidazol 8 M Harnstoff pH 7,5
Elutionspuffer	30 mM Tris 300 mM Natriumchlorid 250 mM Imidazol
Regenerationslösung His-Tag Resin	
<i>0,2 M Phosphat-Puffer</i>	L1: 0,2 M Di-Natriumhydrogenphosphat L2: 0,2 M Natriumdihydrogenphosphat L1 mit L2 auf pH 7,5 einstellen
<i>Natriumchlorid-Lösung</i>	3 M Natriumchlorid
<i>EDTA-Lösung</i>	0,5 M EDTA pH 8,0
<i>Lösung 2</i>	70 % Ethanol
<i>Lösung 3</i>	25% 0,2 M Phosphat-Puffer 10% 3 M Natriumchlorid pH 8,0
<i>Lösung 4</i>	50 mM Natriumacetat 0,3 M Natriumchlorid
<i>Lösung 5</i>	0,2 M Nickeldichlorid
<i>Carbonat-Puffer</i>	Lsg 1: 10 mM Natriumhydrogencarbonat Lsg 2: 10 mM Natriumcarbonat Lsg 1 mit Lsg 2 auf pH 9,0 einstellen
für die Proteinaufreinigung von rekombinanten Malonyltransferasen (mit GST-Tag)	
10x GST Wasch-/Bindepuffer	43 mM Di-Natriumhydrogenphosphat 14,7 mM Kaliumdihydrogenphosphat 1,37 M Natriumchlorid 27 mM Kaliumchlorid pH 7,3

2. Material und Methoden

Puffer/ Lösung	Herstellung
10x GST Elutionspuffer	100 mM Glutathion red. 500 mM Tris/HCl pH 8,0
Für SDS PAGE	
10 x Oberpuffer	0,25 M Tris 1,92 M Glycin 34,7 mM SDS bei Bedarf 1:9 mit MQ-Wasser verdünnen
Collaidal Coomassie	5 % Aluminiumsulfat 20 % Ethanol 0,1 % Coomassie Blau 2 % Phosphorsäure
Coomassie Staining	0,33 g Coomassie Blau 120 ml Methanol 24 ml Essigsäure 120 ml Wasser
Entfärbelösung	70 ml Essigsäure 100 ml Methanol auf 1 L mit Wasser auffüllen mit Aktivkohle regenerieren
für den Western-Blot	
Semidry Blotting Puffer	25 mM Tris 200 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol
Blockierpuffer	3 % Milchpulver in Waschpuffer
Waschpuffer	20 mM Tris 140 mM Natriumchlorid 0,1 % Tween 20
NBT	5 % Nitroblautetrazoliumchlorid in 70 % DMF
BCIP	135 mM (Dinatrium)-5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
Für das Malonyltransferase-Assay	
Assay-Puffer	100 mM Kaliumdihydrogenphosphat 100 mM Di-Kaliumhydrogenphosphat 10 mM EDTA pH 7,0 100 mM β -Mercaptoethanol

2. Material und Methoden

Puffer/ Lösung	Herstellung
Für die Analyse von Fra a 1.02 aus Erdbeeren	
Extraktionspuffer für die Proteinextraktion	200 mM Kaliumdihydrogenphosphat 200 mM Di-Kaliumhydrogenphosphat 100 mM DiECA 20 mM EDTA 5 % PVPP 0,5 % Tween-20
10 x PBS-Puffer	100 mM Natriumdihydrogenphosphat 100 mM Di-Natriumhydrogenphosphat 1,5 M Natriumchlorid
PBS-Puffer für ELISA	Lsg 1: 10 mM Di-Natriumhydrogenphosphat 150 mM Natriumchlorid Lsg 2: Natriumdihydrogenphosphat Lsg 1 mit Lsg 2 auf pH 7,4 einstellen
PBST-Puffer	0,05 % Tween 20 in PBS-Puffer für ELISA

2.1.5. SDS-PAGE-Gel

Tabelle 7: Herstellung des SDS-PAGE Gels

Gel	Herstellung
12 % Trenngel	4,9 ml Wasser 6 ml 30 % Acrylamid 3,8 ml 1,5 M Tris (pH 8,8) 150 µl 10 % SDS 150 µl 10 % APS 6 µl TEMED (kurz vor dem Gießen hinzufügen)
7 % Sammelgel	3,7 ml Wasser 1,4 ml 30 % Acrylamid 750 µl 1,5 M Tris (pH 8,8) 60 µl 10 % SDS 60 µl 10 % APS 10 µl TEMED (kurz vor dem Gießen hinzufügen)

Das Trenngel wurde nach dem Gießen mit 1 ml Isopropanol überschichtet. Nach dessen Polymerisation folgte das Gießen des Sammelgels auf das Trenngel. Dabei wurden für die spätere Probenaufgabe Probenkämme in die Gießhalterung eingesetzt.

Das fertige Gel wurde direkt für die SDS-PAGE verwendet oder in Oberpuffer bei 4 °C gelagert.

2.1.6. Agarose-Gel

Für ein 1 % Agarose-Gel wurden 1,4 g Agar in 140 ml TAE-Puffer zu einer klaren Lösung in der Mikrowelle erhitzt. Zu der lauwarmen Lösung wurden 6 µl RotiSafe zugefügt. Das Gel wurde in die Elektrophorese-Halterung gegossen. Für das spätere Auftragen der Proben wurden Kämme eingesetzt. Nach dem Abkühlen und dem Entfernen der Kämme wurde das Gel für die Agarose-Gelelektrophorese verwendet.

2.1.7. Bakterienstämme, Vektoren, Enzyme, Antikörper, Kits und Sonstiges

Tabelle 8: Bakterienstämme

Bakterienstamm	Hersteller
<i>E. coli</i> BL21	New England Biolabs, Frankfurt am Main
<i>E. coli</i> BL21 pGEX-4T-1	inhouse Bakterienstamm
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS	Promega, Mannheim
<i>E. coli</i> BL21(DE3) pLysS pQE-70 Fra a 1.02	inhouse Bakterienstamm
<i>E. coli</i> DH 10-beta p9U10-FRAAP	inhouse Bakterienstamm
<i>E. coli</i> NEB 10-beta Fraa1.02 Silencing p9U10	inhouse Bakterienstamm
<i>E. coli</i> XL1-Blue	Agilent Technologies, Waldbronn
<i>E. coli</i> NEB10-beta pGEX-4T-1	inhouse Bakterienstamm

Tabelle 9: Vektoren

Vektor	Hersteller
pGEM®-T Easy	Promega, Mannheim
pGEX-4T-1	GE Healthcare, München
pQE-70	Quiagen GmbH, Hilden

Tabelle 10: Enzyme

Enzym	Bezeichnung	Konzentration	Hersteller
DNA Polymerase	PhusionTM	2 U/µl	Finnzymes, Espoo
DNA Polymerase	Q5® High-Fidelity DNA Polymerase	2 U/µl	New England Biolabs, Frankfurt am Main
RNase	RNase A	-	AppliChem, Darmstadt
Restriktionsenzym	FastDigest NotI	-	Thermo Scientific, Vilnius
Restriktionsenzym	FastDigest BamHI	-	Thermo Scientific, Vilnius
Alkaline Phosphatase	FastDigest AP	1 U/µl	Thermo Scientific, Vilnius

2. Material und Methoden

Enzym	Bezeichnung	Konzentration	Hersteller
DNA Ligase	T4 DNA Ligase	1 U/μl	Thermo Scientific, Vilnius

Tabelle 11: Primer

Primer	Sequenz	Hersteller
Verifizierung des Einbaus des silencing Konstrukts in F182 und F184		
SMYEV35S-fw2	5'-AAACCTCCTCGGATTCCATT-3'	Microsynth, Balgach
FraAP rv BAMHI	5'-CGGGATCCACCTCCTCCGCTTG-3'	Microsynth, Balgach
Fraa2_RNAinv_r2	5'-GATCGAGCTCCACACCAAAGGTGACGTGGAGATCA-3'	Microsynth, Balgach
Sortenverifizierung		
BDB-(CA) ₇	5'-BDBCACACACACACACA-3'	Metabion, Planegg
Klonierung der FaMAT Kandidaten		
Gene04261_f_untr	5'-CTGGTTCAATCTCTAGTCTGTCTCTCCA-3'	Metabion, Planegg
Gene04261_r_untr	5'-GCAACAACATTAACACCATTATTATTGCT-3'	Metabion, Planegg
Gene04261_f_ATG	5'-ATGGCACATCCAAACTCACTTGAAATG-3'	Metabion, Planegg
Gene04261_r_ATG	5'-TCAAAGGTTTTCAAGACCTTTGGCAAATTGTG-3'	Metabion, Planegg
Gene04262_f_untr	5'-CATTTTCTATCTCTTTGCTCCTTCGTAAGTA-3'	Metabion, Planegg
Gene04262_r_untr	5'-GTTTCTCTGGTCCATAATCTCAATC-3'	Metabion, Planegg
Gene04262_f_ATG	5'-ATGGCAAACCTATCAGTGAAGAAAGTTGAGG-3'	Metabion, Planegg
Gene04262_r_ATG	5'-CTAATGCACTAGGCTAGCAAAGAGAGCA-3'	Metabion, Planegg
Gene03835_f_untr	5'-AGTTTCAATCAATTCAGCATCATCTCCA-3'	Metabion, Planegg
Gene03835_r_untr	5'-ATTGGGCCTTGGTGTACATATGGCT-3'	Metabion, Planegg
Gene03835_f_ATG	5'-ATGGCATCTCCAAACTCATCTGCAAGAG-3'	Metabion, Planegg
Gene03835_r_ATG	5'-TCAATTTCCCTTGAGACCTTCGGCAAATAG-3'	Metabion, Planegg
Gene29347_f_untr	5'-CTTCTTCTAATCTTCTTCTCCCA-3'	Metabion, Planegg
Gene29347_r_untr	5'-ATAGGGCTTTTCTCAACTCCTCTCAC-3'	Metabion, Planegg
Gene29347_f_ATG	5'-ATGGAGCAACCAAGCTCGGTGAAACTGG-3'	Metabion, Planegg
Gene29347_r_ATG	5'-TCAGTGTTTTCCAAAACCTTTAGCAAATAGAG-3'	Metabion, Planegg
Gene04266_f_untr	5'-CAAGTTTCTTCCAATTGATCATCTCTA-3'	Metabion, Planegg
Gene04266_f_ATG	5'-ATGGCTTTCCGAAACTCAACTACAAAAGTGG-3'	Metabion, Planegg
Gene04266_r_ATG	5'-TCAAGCTGGAGCCGATACCTCCCAGGCGTTTTTGACCTCGCG-3'	Metabion, Planegg
C1-f	5'-ATGGATCCATGGCACATCCAAACTCACTTG-3'	Metabion, Planegg
C1-r	5'-ATGCGGCCGCTCAAAGGTTTTCAAGGCCTTTG-3'	Metabion, Planegg
C2-f	5'-ATGGATCCATGGCAAACCTATCAGTGAAGAAAG-3'	Metabion, Planegg
C2-r	5'-ATGCGGCCGCTAATGCACTAGGCTAGCAAAG-3'	Metabion, Planegg
C3-f	5'-ATGGATCCATGGCATCTCCAAACTCATCTG-3'	Metabion, Planegg
C3-r	5'-ATGCGGCCGCTCAGCCTTGACTAAACAAACCC-3'	Metabion, Planegg
C4-f	5'-ATGGATCCATGGAGCAACCAAGCTCGG-3'	Metabion, Planegg

2. Material und Methoden

Primer	Sequenz	Hersteller
C4-r	5'-ATGCGGCCGCTCAGTGTTTTCCAAAACCTTTAG-3'	Metabion, Planegg
S1-f	5'-ATGGATCCATGGCACATCCAAACTCACTTG-3'	Metabion, Planegg
S1-r	5'-ATGCGGCCGCTCAAAGGTTTTCAAGGCCTTTG-3'	Metabion, Planegg
C5-f	5'-ATGGATCCATGGCTTCCGAAACTCAACTAC-3'	Metabion, Planegg
C5-r	5'-ATGCGGCCGCTCAAATCCTAGAATGGTTTTGAG-3'	Metabion, Planegg

Tabelle 12: Antikörper

Antikörper	Charakteristika	Konzentration [mg/ml]	Hersteller
KUR-FRA (IgE)	Spezifischer AK aus Kaninchen polyklonal	0,90	Davids Biotechnologie, Regensburg
Anti-Kaninchen-HRP (IgE)	Sekundär-AK polyklonal	1,00	Roth, Karlsruhe
Anti-Kaninchen-AP (IgE)	Sekundär-AK polyklonal	1,00	Promega, Mannheim

Tabelle 13: Kits

Verwendung	Bezeichnung	Hersteller
Aufreinigung PCR Produkt	Nucleo Spin® Gel and PCR Clean up	Macherey-Nagel, Düren
A-Tailing	Taq DNA Polymerase with Thermo Pol® Buffer	New England Biolabs, Frankfurt am Main
DNA Extraktion	DNeasy® Plant Mini Kit	Quiagen, Hilden
Plasmid Aufreinigung	Pure Yields Plasmid Miniprep System	Promega, Mannheim
Ligation in pGEM®-T	pGEM®-T Easy Vector System	Promega, Mannheim

Tabelle 14: Sonstiges

Verwendung	Bezeichnung	Hersteller
dNTPs für PCR	Set of dATP, dCTP, dGTP, dTTP (100 mM)	Promega, Mannheim
DNA-Lader	Quick Load® Purple 1 kb DNA Lader	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Protein-Lader	PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, Vilnius

2. Material und Methoden

Verwendung	Bezeichnung	Hersteller
His-Tag Resin	Profinity™ IMAC Ni-charged Resin	Bio-Rad, Hercules
GST-Tag Resin	GST Bind™ Resin	Merck, Darmstadt
PCR Puffer	5 x Phusion® GC	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Ligations-Puffer	Ligation Buffer	Thermo Scientific, Vilnius

2.2. Geräte

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

Tabelle 15: LC-MS Bauteile und Einstellungen

HPLC System	Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, Californien, USA)
Pumpe	Quaternary pump G1311A (Agilent)
Injektor	Sample injector G1313A (Agilent)
Injektionsvolumen	5 µl
Trennsäule	Luna 3 u C18(2) 100 Å, 150 x 2 nm (Phenomenex, Aschaffenburg)
Vorsäule	Security Guard Cartridges C18 4 x 2 mm (Phenomenex)
Säulentemperatur	25 °C
Fließmittel	A: 0,1 % Ameisensäure in Wasser B: 0,1 % Ameisensäure in Methanol
Flussrate	0,2 ml/min
Gradient 1 (Polyphenole)	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
Gradient 1 (FaMAT Assay)	10 – 50 % B für 7 min 50 – 100 % B in 3 min 100 % für 5 min 100 – 10 % in 5 min 10 % für 10 min Laufzeit: 30 min
DAD	Diodenarray Detector G1315B (Agilent) 190-600 nm
MS	Bruker Daltonics esquire 3000^{plus} Ionenfalle (Bruker Daltonics, Bremen)
Spraygas	Stickstoff (30,0 psi)

2. Material und Methoden

Trockengas	Stickstoff (330 °C, 9 l/min)
Auflösung	13000 m/z/s
Scanbereich	m/z 50 – 975
Polarität	positiv/negativ alternierend
ICC Target	30000 (positiv) oder 10000 (negativ)
Max. Akkumulationszeit	200 ms
Zielmasse (SPS)	m/z 400
Kapillarenspannung	± 4000 V
Endplattenspannung	± 3500 V
MS/MS	Auto-tandem MS
Kollisionsgas	Helium 5.0 (4,21 x 10 ⁻⁶ mbar)
Kollisionsspannung	1,0 V
Einstellung Ionenfalle:	
Skimmer	± 40,0 V
Cap Exit	± 121 V
Oct 1 DC	± 12,0 V
Oct 2 DC	± 1,7 V
Trap Drive	45,6
Oct RF	112,2 Vpp
Lens 1	± 5,0 V
Lens 2	± 60,0 V

2.2.2. Sonstige Geräte

Tabelle 16: Sonstige Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Agrosegelelektrophorese-Apparatur	MIDI	Roth, Karlsruhe
Agrosegelelektrophorese-Apparatur	MAXI	neoLab, Heidelberg
Analytische Waage	SCALTEC SPB61	SCALTEC Instruments, Heiligenstadt
Analytische Waage	Scout Pro SP U4001	Ophaus, Pine Brook
Autoklav	Fedegari	IBS Tecnomara, Fernwald
Blotting-Kammer	Semi Dry Blotter	Biostep GmbH, Jahnsdorf
Elektroporator	MicroPulser™	BioRad, Taufkirchen
Gefriertrockner	Savant ModylyoD	ThermoFisher Scientific, Waltham
Kühlzentrifuge	Eppendorf 5415R	Eppendorf, Hamburg
Laborschüttler	Polymax 1040	Heidolph Instruments, Schwabach
Magnetrührer	MR2002	Heidolph Instruments, Schwabach
Magnetrührer	Variomag, Multiposition magnetic stirrer Poly 15	neoLab, Heidelberg

2. Material und Methoden

Gerät	Modell	Hersteller
Microplate reader	CLARIOstar	BMG Labtech, Ortenberg
Milli-Q Wasseranlage	Purelab® Classis UVF MK2	ELGA Labwater, Celle
Mixer	Personal Blender PB 250	Tribest Corporation, Anaheim
NanoDrop®	ND1000 Spectrophotometer	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
PCR Gerät	Primus 96 advanced	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
PCR Gerät	SensoQuest labcycler	SensoQuest, Göttingen
pH Meter	pH 50+ DHS	XS Instruments, Carpi
Präzisionswaage	TP 214	Denver Instrument, Bohemia
Rotationsmischer	Rotary Mixer	A. Hartenstein, Würzburg
Rotations-	RVC 2-18	Martin Christ, Osterode am Harz
Vakuumkonzentrator		
Rotationsverdampfer	LABOROTA 4000 - efficient	Heidolph Instruments, Schwabach
SDS-PAGE Kammer	MINI-Vertical Electrophoresis Unit	Roth, Karlsruhe
Spannungsgenerator	consort E835, CV245	Consort nv, Turnhout
Spannungsgenerator	PowerPac 200	BioRad, Taufkirchen
Spectrophotometer	Nanodrop 1000	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Sterilbank	Hera Safe	Heraeus Holdung, Hanau
Taumelmischer	ENDURO™ MiniMix™	Labnet, Corning
Thermoblock	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallbad	Sonorex Super	BANDELIN electronic, Berlin
UV-Transilluminator	G:BoX	Syngene, Cambridge
Vortexer	Vortex-Genie 2 G-560E	Scientific Industries, Bohemia
Wasserbad	Julabo HC5/7	JULABO, Seelbach
Wasserbad	Sonorex RK103H	BANDELIN electronic, Berlin
Zentrifuge	Sigma 4K15C	Sigma-Aldrich, Weilheim

2.3. Methoden

2.3.1. Polyphenol Analytik

Die Analyse der Polyphenole erfolgte analog der Methode von Ring et al. 2013.

2.3.1.1. Polyphenolextraktion

500 mg Pflanzenmaterial wurden in ein 1,5 ml Eppendorf-Zentrifugenröhrchen eingewogen. Für die Analyse der Blüten wurde auf Grund von geringer Probenmenge eine reduzierte Einwaage von 300 bis 400 mg verwendet. Zu dem Pflanzenmaterial wurden 0,25 ml methanolische Lösung des Internen Standards Biochanin A (0,2 mg/ml) zugefügt. Das Gemisch wurde kurz mittels Vortexer homogenisiert. Nach Zugabe von 0,25 ml Methanol und

Homogenisieren (1 min vortexten) folgte eine Behandlung im Ultraschallbad (5 min, mit Eis gekühlt). Die Suspension wurde zentrifugiert (16000 g, 20 min, 4 °C) und der dadurch gewonnene Überstand, wurde in ein 2 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Danach wurde der Rückstand erneut zweimal mit je 0,5 ml Methanol gemäß der ersten Extraktion extrahiert. Die vereinigten Überstände der drei Extraktionen wurden in einem Rotations-Vakuumkonzentrator bis zur Trockne eingengt. Anschließend wurde das Extrakt mit 35 µl MQ-Wasser rückgelöst. Die Suspension wurde 1 min gevortext und 10 min im Ultraschallbad behandelt. Es folgte eine Zentrifugation (16000 g, 20 min, 4 °C). Der sich dadurch ergebende klare Überstand wurde für die Messung mit der LC-MS in ein 200 µl Insert in einem 2 ml Braunglasfläschchen überführt. Bei trübem Überstand wurde erneut zentrifugiert. Für jeden Genotyp wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

2.3.1.2. Identifizierte Metaboliten

Die Identifizierung der Metaboliten wurde mit Hilfe des Programms DataAnalysis durchgeführt. Es wurden Retentionszeit, UV-Absorption, *m/z* Werte und Fragmentierungsmuster betrachtet. Die Zuordnung der Peaks erfolgte mittels einer internen Datenbank, Literaturvergleich (Hanhineva et al. 2011; Hanhineva et al. 2008; La Barbera et al. 2017; Gasperotti et al. 2013; Aaby et al. 2012; Kårlund et al. 2014; Oszmiański et al. 2011; Dias et al. 2015; Kårlund et al. 2017) oder Referenzmaterial.

Tabelle 17: Metaboliten

RT [min]	Metabolit	+ <i>m/z</i>	- <i>m/z</i>	+MS2	-MS2
2,7	Äpfelsäure		133 [M-H] ⁻		115
3,5	Ascorbinsäure		175 [M-H] ⁻		115
4,0	Glutathion red.	308 [M+H] ⁺	306 [M-H] ⁻	179, 162, 233, 116	254, 272, 288, 179
4,8	Citronensäure		191 [M-H] ⁻		191, 111, 173, 129
6,4	Chelidonsäure		183 [M-H] ⁻		183, 139, 111, 95
9,5	Glutathion ox.	613 [M+H] ⁺	611 [M-H] ⁻	484, 355	306, 482, 338
10,8	Phenylalanin	166 [M+H] ⁺	164 [M-H] ⁻	120	
13,2	(Epi)catechin-(epi)catechin Isomer 1		865 [M-H] ⁻		695, 577, 575, 739, 847, 287
14,4	(Epi)afzelechin-(epi)catechin		849 [M-H] ⁻		577, 559, 287
16,0	(Epi)catechinhexosid		451 [M-H] ⁻		289, 245, 161
16,0	HDMF-glucosid	129 [M-Glc+H] ⁺ 313 [M+Na] ⁺		185, 151, 285	
16,6	Tryptophan	205 [M+H] ⁺	203 [M-H] ⁻	188	
17,3	Galloyl-HHDP-glucose		633 [M-H] ⁻		633, 301, 481, 275

2. Material und Methoden

RT [min]	Metabolit	+m/z	-m/z	+MS2	-MS2
17,3	Procyanidin B3		577 [M-H] ⁻		425, 559, 451, 407, 287, 289
18,0	Procyanidin B3+B1		577 [M-H] ⁻		425, 407, 451, 559, 287
18,4	(Epi)catechin-(epi)catechin-(epi)catechin		865 [M-H] ⁻		425, 449, 451, 407, 289, 245
18,7	(Epi)catechin-(epi)catechin-(epi)catechin Isomer 2		865 [M-H] ⁻		695, 577, 575, 739, 847, 287
18,9	Procyanidin B1		577 [M-H] ⁻		425, 559, 451, 407, 287, 289
19,4	(Epi)catechin-(epi)catechin-(epi)catechin Isomer 3		865 [M-H] ⁻		695, 577, 575, 739, 847, 287
19,7	HHDP-galloyl-glucosid		633 [M-H] ⁻		301, 463
20,2	HDMF-malonylglucosid 1	377 [M+H] ⁺ , 399 [M+Na] ⁺		129, 341, 285	
20,5	(Epi)afzelechin-(epi)catechin Isomer 1		561 [M-H] ⁻		289, 543, 407, 435, 271, 245, 164
20,5	Catechin	291 [M+H] ⁺	289 [M-H] ⁻	123, 139, 165, 273	245
21,0	Digalloyl-chinasäure		495 [M-H] ⁻		343, 325, 191, 169
21,1	Kaffeesäure-glucoseester/glc		341 [M-H] ⁻		179 161 203
21,5	(Epi)catechin-(epi)catechin Isomer		577 [M-H] ⁻		425, 407, 451, 559, 289
21,6	Epiafzelechin-(4a→8)-pelargonidin-3-O-glucosid	705 [M] ⁺		543, 525, 407, 313	
21,8	HDMF-malonylglucosid 2	377 [M+H] ⁺ , 399 [M+Na] ⁺		341, 129, 231	
22,0	(Epi)afzelechin-(epi)afzelechin-(epi)catechin Isomer 1		833 [M-H] ⁻		543, 561, 707, 815, 679, 469, 435, 417, 289, 271
22,0	Digalloyl-hexose		483 [M-H] ⁻		271, 467, 331, 313, 211, 169
22,3	HDMF-malonylglucosid 3	377 [M+H] ⁺ , 399 [M+Na] ⁺		129, 341, 231	
22,5	Cyanidin-3-glucosid	449 [M] ⁺		287	
22,8	p-Cumaryl-glucoseester		325 [M-H] ⁻		325, 163, 119
23,4	Digalloyl-HHDP-glucose		785 [M-H] ⁻		615, 301
23,7	Galloyl-bis-HHDP-glucose Isomer		935 [M-H] ⁻		633, 451, 301

2. Material und Methoden

RT [min]	Metabolit	+m/z	-m/z	+MS2	-MS2
23,8	(Epi)afzelechin- (epi)afzelechin- (epi)catechin Isomer 2		833 [M-H] ⁻		543, 561, 707, 815, 679, 407, 469, 435, 417, 289, 271, 790
24,0	Ferulasäure-glucoseester/- glucosid		355 [M-H] ⁻		193, 217, 175
24,1	(Epi)afzelechin- (epi)catechin Isomer 2		561 [M-H] ⁻		289, 543, 407, 435, 271, 245, 164
24,3	Pelargonidin-3-glucosid	433 [M] ⁺		271	
24,8	Pelargonidin-3-rutinosid	579 [M] ⁺		271, 433	
25,1	Trigalloyl-glucose/hexose		635 [M-H] ⁻		465
25,9	Ellagtannin		937 [M-H] ⁻		767, 301, 993, 841, 785, 741, 713, 635, 617, 489, 571, 553, 483, 465, 419, 313, 275
27,3	Kaempferol- hexoseglucuronid		623 [M-H] ⁻		461, 447, 285, 327, 503, 605
27,7	Tetragalloyl- glucose/hexose		787 [M-H] ⁻		617, 635, 573, 465
29,0	(Epi)afzelechin- (epi)afzelechin- (epi)catechin Isomer 3		833 [M-H] ⁻		543, 561, 707, 815, 679, 469, 435, 417, 289, 271
29,1	Cyanidin-3- malonylglucosid	535 [M] ⁺		287	
29,5	Pelargonidin-3- malonylglucosid	519 [M] ⁺		475, 433, 271	
30,2	Zimtsäureglucoseester	333 [M+Na] ⁺	355 [M+HCOO] ⁻	185	309, 207, 147
31,6	Quercetin-pentose- glucuronid	611 [M+H] ⁺	609 [M+H] ⁻	479, 303	301, 177
32,3	Kaempferol-dihexose	625 [M+H] ⁺	623 [M-H] ⁻	463, 287	285, 337
33,6	Quercetin-3-pentosid	435 [M+H] ⁺	433 [M-H] ⁻	303	301
33,7	Quercetin-3-glucosid	465 [M+H] ⁺	463 [M-H] ⁻	303	301
34,1	Kaempferol-pentose- glucuronid	595 [M+H] ⁺	593 [M+H] ⁻		285, 307, 429
34,4	Quercetin-3-glucuronid	479 [M+H] ⁺	477 [M-H] ⁻	303	301
34,9	Ellagsäure		301 [M-H] ⁻		301
36,4	Kaempferol-3-glucosid		447 [M-H] ⁻		447, 327, 285, 255
36,5	Kaempferol-glucuronid	463 [M+H] ⁺	461 [M-H] ⁻	287	285
36,6	Quercetin-3- malonylglucosid		505 [M- CO ₂ -H] ⁻	303	301
36,6	Quercetin-3-acetylglucosid	507 [M+H] ⁺	505 [M-H] ⁻	303	301
37,6	Dicaffeoyl-cumaryl- spermidin	616 [M+H] ⁺	614 [M-H] ⁻	454, 470, 436	

2. Material und Methoden

RT [min]	Metabolit	+m/z	-m/z	+MS2	-MS2
37,8	Kaempferol-3-malonylglucosid	535 [M+H] ⁺	533 [M-H] ⁻	287	285
37,9	Caffeoyl-dicumaryl-spermidin	600 [M+H] ⁺	598 [M-H] ⁻	438, 420	478, 550, 436, 358
38,1	Kaempferol-3-malonylglucosid		489 [M-CO ₂ -H] ⁻	287	285
38,1	Kaempferol-3-acetylglucosid	491 [M+H] ⁺	489 [M-H] ⁻	287	285
38,6	Kaempferol-3-cumarylglucosid	595 [M+H] ⁺	593 [M-H] ⁻	285, 447, 547	285, 447, 547
38,8	Dicumaryl-hexose	495 [M+Na] ⁺	471 [M-H] ⁻		307, 427, 163, 453, 325, 291, 163, 187, 145
41,0	Biochanin A (Interner Standard)	285 [M+H] ⁺	283 [M-H] ⁻	285	283

2.3.1.3. Quantifizierung

Die Quantifizierung der Metaboliten erfolgte über die MS1 Spur mittels des Programms QuantAnalysis. Für Anthocyane, Aminosäuren und Peptide wurde die positive, für alle weiteren Metaboliten die negative Spur herangezogen.

Es wurde jeweils eine relative Konzentration in Bezug auf den internen Standard Biochanin A berechnet.

$$c_{rel} = \frac{F(\text{Analyt})/F(\text{IS})}{E} \cdot m(\text{IS})$$

c_{rel} [ppm Equ. IS]: relative Konzentration in ppm Equivalenten an Internem Standard

$F(\text{Analyt})$: Fläche des Analyten – Signals

$F(\text{IS})$: Fläche des Internen Standard – Signals

E [g]: Probeneinwaage

$m(\text{IS})$ [µg]: Menge an zugefügtem Internem Standard

2.3.1.4. Ungerichtete Analyse

Für die ungerichtete Analyse wurden die Massenspektren zunächst mittels DataAnalysis in positive und negative Spuren getrennt. Es folgte die Auswertung durch XCMS (R). Die resultierenden Massenlisten wurden von Isotopen befreit. Die quantitativen Werte wurden gemäß 2.3.1.3 berechnet.

2.3.2. Grundlegende Molekularbiologische Methoden

2.3.2.1. DNA-Extraktion

Für die DNA-Extraktion wurden 50 mg homogenes Probenmaterial (Früchte bzw. junge Blätter) verwendet. Die Aufarbeitung erfolgte gemäß der Anleitung des DNeasy® Plant Mini

Kits. Die Elution erfolgte mit zweimal 100 µl Elutionspuffer für frisches Blattmaterial und mit 50 µl für Fruchtproben.

2.3.2.2. Polymerase-Kettenreaktion

Ein Mastermix für die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde erstellt:

- 10,5 µl MQ-Wasser
- 1 µl dNTPs (1:10 verdünnt)
- 4 µl GC-Puffer
- 0,5 µl Polymerase
- 2 µl Primer (forward) (1:10 verdünnt)
- 2 µl Primer (reverse) (1:10 verdünnt)

Je 20 µl Mastermix wurden in PCR- Zentrifugenröhrchen vorbereitet. 4 µl DNA-Extrakt wurden als Template verwendet.

Anschließend erfolgte die PCR nach folgendem Schema:

Tabelle 18: Parameter der PCR

	Temperatur	Zeit	Cycles
Initialtemperatur	94 °C	5 min	1
Denaturierung	94 °C	30 sec	40
Annealing	62-67 °C	30 sec	
Elongation	72 °C	30 sec per kb	
Finale Elongation	72 °C	5 min	1
Ende	4 °C	∞	1

2.3.2.3. Aufreinigung des PCR-Produkts

Für die Aufreinigung des PCR-Produkts wurde das Kit „Nucleo Spin® Gel and PCR Clean up“ verwendet. Die Aufarbeitung erfolgte gemäß der Anleitung.

2.3.2.4. A-Tailing

Der Ansatz des A-Tailings war folgendermaßen:

- 21 µl PCR-Produkt
- 0,6 µl dATP (1:10 verdünnt)
- 3 µl Taq-DNA-Polymerase 10 x Reaction Buffer
- 3 µl Taq-DNA-Polymerase

- 2,4 µl MQ-Wasser

Die Lösung wurde 30 min bei 70 °C inkubiert.

2.3.2.5. Ligation

Die Ligation wurde mit aufgereinigtem (vgl. 2.3.2.3) PCR-Produkten durchgeführt.

2.3.2.5.1. Ligation in pGEM-T Vector

Für die Ligation in den pGEM-T Vector wurde das pGEM®-T Easy Kit verwendet. Gemäß der Empfehlung des Herstellers wurde ein molares Verhältnis Fragment zu Insert von 1:3 eingehalten. Die Ligation wurde über 3 Tage bei 4°C durchgeführt.

2.3.2.5.2. Ligation in pGEX-4T-1 Vector

Zunächst wurde *E. coli* NEB10-beta pGEX-4T-1 über Nacht in LB-Medium bei 37 °C inkubiert. Aus der Flüssigkultur konnte mittels Plasmid-Aufreinigung (vgl. 2.3.2.10) der pGEX-4T-1 Vektor extrahiert werden. Es folgten Restriktion und Dephosphorylierung des Vektors nach folgendem Ansatz:

- 4,1 µg pGEX-4T-1
- 6 µl 10x FastDigest Green Buffer
- 3 µl NotI (FD)
- 1 µl BamHI (FD)
- 2 µl Fast AP
- MQ-Wasser auf 60 µl auffüllen

Das Reaktionsgemisch wurde 45 min bei 37°C und anschließend 5 min bei 80°C inkubiert. Nach Auftrennung im Agarose-Gel (vgl. 2.3.2.9) wurde der linearisierte und dephosphorylierte Vektor aufgereinigt (vgl. 2.3.2.3) und anschließend für die Ligation verwendet.

Für die Vorbereitung des Templates wurde 300 ng PCR-Produkt ebenfalls mit NotI und BamHI geschnitten. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 15 min gefolgt von 5 min bei 80 °C. Die geschnittene DNA wurde aufgereinigt (vgl.2.3.2.3).

Daraufhin wurde die Ligation nach folgendem Schema durchgeführt:

- 40 ng Template
- 50 ng Vector
- 1 µl 10 x T4 Ligation Buffer
- 1 µl 10 x T4 DNA Ligase
- mit MQ-Wasser auf 10 µl auffüllen

Es folgte eine Inkubation von 3 h bei Raumtemperatur.

2.3.2.6. Herstellung kompetenter Zellen

Eine Cryo-Kultur wurde auf eine LB-Agar-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Agar-Platte wurde bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert. 20 ml LB-Medium wurden mit einer Einzelkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 150 rpm inkubiert.

2.3.2.6.1. Chemo-kompetente Zellen

Pro 100 ml LB-Medium wurden zum Animpfen 1 ml der Übernachtskultur verwendet. Die Sekundärkultur wurde unter gleichen Bedingungen bis zu $OD_{600} = 0,5$ inkubiert. Nach dem Herunterkühlen auf Eis für 30 min folgte eine Zentrifugation (10000 g, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen. Der Rückstand wurde mit 40 ml pro 100 ml Primärkultur Reibungspuffer gewaschen. Dafür wurde dieser zunächst mit Reibungspuffer resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands wurde der Rückstand mit 10 ml pro 100 ml Primärkultur Reibungspuffer rückgelöst. Für die Lagerung bei -80 °C wurden Aliquots à 186 µl erstellt, zu denen zusätzlich 14 µl Glycerin zugefügt wurde.

2.3.2.6.2. Elektrokompente Zellen

300 ml LB -Medium wurden mit 0,3 ml Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C und 150 rpm bis zu $OD_{600} = 0,6-0,9$ inkubiert. Die Bakterien wurden daraufhin auf Eis für 30 min gekühlt und anschließend zentrifugiert (10000 g, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden in 200 ml 10 %-Glycerin resuspendiert. Es folgte eine erneute Zentrifugation (10000 g, 10 min, 4 °C) und das Verwerfen des Überstandes. Die Resuspension, sowie die Zentrifugation wurde fünf- bis sechsfach wiederholt. Am Schluss wurden die Bakterien mit 3 ml 10 % Glycerin resuspendiert und anschließend als 200 µl-Aliquots bei -80 °C gelagert.

2.3.2.7. Plasmid Transformation

2.3.2.7.1. Transformation mit Hitzeschock

Die kompetenten Zellen und die Plasmide wurden zunächst auf Eis aufgetaut. Dann wurden 45 µl an kompetenten Zellen in ein vorgekühltes 15 ml Falcon pipettiert. Die Zugabe von je 2 µl Plasmid folgte. Nach vorsichtigem Homogenisieren wurde das Zell-Plasmid-Gemisch für 35 min auf Eis inkubiert. Die Transformation erfolgte mittels Hitze-Schock. Das Gemisch wurde für 45 sec in ein 42 °C warmes Wasserbad gehalten und anschließend sofort auf Eis gestellt und 500 µl SOC-Medium hinzugegeben. Daraufhin wurden die Zellen 1,5 h bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. Nach Aufkonzentrieren der Zellen mittels Zentrifugation (3000 g, 5 min, RT)

wurden 100 µl der Suspension auf eine LB-Agar-Platte (0,1 mg/ml Antibiotika) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.3.2.7.2. Transformation mit elektrokompetenten Zellen

Die Elektroporation wurde mit einem MicroPulser™ unter Verwendung des Programms Ec3 und einer 2 mm Spalt-Elektroporationsküvette durchgeführt. 40 µl auf Eis aufgetauter elektrokompetenter Zellen wurden mit 1 ng DNA versetzt und zusammen in die Elektroporationsküvette pipettiert. Es folgte eine Spannungszufuhr von 3,0 kV mittels MicroPulser™. Daraufhin wurde die Zellsuspension sofort mit 1 ml vorgewärmtem LB- oder SOC-Medium versetzt und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Reaktionsgefäß wurde 60 bis 90 min bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Im Anschluss wurden 50 µl der Zellsuspension auf eine LB-Agar-Platte (0,1 mg/ml Antibiotika) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.3.2.8. Colony PCR

Zunächst wurden 1 ml LB-Medium (0,1 mg/ml Antibiotika) mit einer Einzelkolonie angeimpft und bei 37 °C/ 150 rpm inkubiert.

Ein Mastermix für die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde erstellt:

- 11,5 µl MQ-Wasser
- 1 µl dNTPs (1:10 verdünnt)
- 4 µl GC-Puffer
- 0,5 µl Phusion-Polymerase
- 1,5 µl Primer (forward)
- 1,5 µl Primer (reverse)

Je 20 µl Mastermix wurden in PCR-Reaktionsgefäße vorbereitet. Als DNA-Substrat wurde die vorbereitete Flüssigkultur verwendet.

Anschließend erfolgte die PCR nach folgendem Schema:

Tabelle 19: Parameter der Colony PCR

	Temperatur	Zeit	Cycles
Initialtemperatur	95 °C	5 min	1
Denaturierung	95 °C	30 sec	35-40
Annealing	55-69 °C	30 sec	
Elongation	72 °C	30 sec per kb	
Finale Elongation	72 °C	10 min	1
Ende	4 °C	∞	1

2.3.2.9. Agarosegelelektrophorese

Die Produkte der PCR wurden mit je 2 µl Orange Dye versetzt.

Das Agarosegel wurde mit 5 µl Laddermix (Molekulargewichtsmarker) und je 20 µl Probenlösung beladen. Für die Elektrophorese wurde eine Spannung von 120 V angelegt.

2.3.2.10. Plasmid Aufreinigung

Die Plasmid-Aufreinigung erfolgte mittels „Pure Yield Plasmid Miniprep system“ von Promega. Es wurden jeweils 4 ml Bakterienkultur verwendet. Die Ausbeuten wurden mittels Spektrophotometrie bestimmt.

2.3.2.11. Bradford

Die Proteinlösung wurde 1:20 und 1:40 mit MQ-Wasser verdünnt. Drei Replikate à 50 µl wurden auf eine 96-Well Platte gegeben. Anschließend wurden 200 µl Roti-Nanoquant Arbeitslösung zugefügt. Nach 5 min folgte die Messung am Plate Reader bei 590 nm gegen 450 nm. Als Blank wurde MQ-Wasser verwendet. Die Kalibrierung erfolgte mittels Rinder Serum Albumin in einem Konzentrationsbereich von 0 bis 100 µg/ml.

2.3.2.12. SDS-PAGE

Für die SDS-PAGE wurde ein diskontinuierliches System bestehend aus Sammelgel (7% Acrylamid) und Trenngel (12% Acrylamid) verwendet (vgl. 392.1.5).

5 µg Protein wurden auf 26,5 µl mit MQ-Wasser verdünnt. Nach Zugabe von Lämmli-Puffer folgten ein kurzes Vortexen und ein Erhitzen auf 95 °C für 5 min. Nach Abkühlen wurde die Lösung in die Taschen der Gele gefüllt. Daraufhin erfolgte die Elektrophorese bei 100 V in Oberpuffer.

2.3.2.13. Gel-Färbung

Für die Färbung der SDS-PAGE-Gele wurden diese entweder 15 min in Schnell-Färbelösung (*Colloidal Staining*) inkubiert und anschließend über Nacht entfärbt oder alternativ über Nacht mit Colloidal Coomassie gefärbt und für 3 h in Entfärbelösung inkubiert.

2.3.2.14. Western-Blot

Ausgangsmaterial für den Western-Blot waren die entwickelten, aber ungefärbten SDS-PAGE-Gele. Diese wurden zunächst 10 min in Semidry Blotting Puffer inkubiert. Die Membran wurde 1 min mit Ethanol aktiviert und anschließend 5 min in Semidry Blotting Puffer equilibriert. Des Weiteren wurden vier Filterpapiere mit Semidry Blotting Puffer getränkt. Auf die Anode wurden

nacheinander zwei Filterpapiere, die Membran, das SDS-PAGE-Gel, zwei weitere Filterpapiere und zuletzt die Kathode aufgelegt. Die Proteinübertragung erfolgte bei einer angelegten Stromstärke von 39 mA (0.8 mA/cm^2) für 50 min. Anschließend wurde die Membran über Nacht in Blocking Puffer inkubiert (4 °C, 150 rpm). Am nächsten Tag wurde die Membran fünfmal für 5 min mit Waschpuffer gewaschen. Daraufhin folgte die Inkubation in 1 µg/ml Primärantikörper in Blockierpuffer (1 h, 4 °C, 150 rpm). Danach wurde die Membran erneut fünfmal für 5 min mit Waschpuffer gewaschen. Der nächste Schritt war die Inkubation mit 1,3 µg/ml Sekundärantikörper (Anti-Kaninchen-AP) in Blockierpuffer (1 h, 4 °C, 150 rpm). Es folgten fünfmal 5 min Waschen mit Waschpuffer und zweimal 5 min Waschen mit Detektionspuffer. Der Blot wurde anschließend in 20 ml Detektionspuffer, versetzt mit 50 µl NBT und 25 µl BCIP, bei Dunkelheit entwickelt. Nach Färbung der Banden wurde die Reaktion durch kurze Inkubation in Wasser gestoppt.

2.3.2.15. Proteinexpression

Eine Cryo-Kultur wurde auf eine LB-Agar-Platte (0,1 mg/ml Antibiotika) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Agar-Platte wurde bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert. Für die Primärkultur wurden 50 ml LB-Medium (0,1 mg/ml Antibiotika) mit einer Kolonie der Agar-Platte angeimpft. Die Primärkultur wurde über Nacht bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. Für die Sekundärkultur wurden 1 L LB-Medium (0,1 mg/ml Antibiotika) mit 10 ml Primärkultur angeimpft. Es folgte eine Inkubation bei 37 °C und 150 rpm bis zu $OD_{600} = 0,6$. Nach Abkühlen der Kultur wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 1 ml IPTG (1 M) induziert. Während der Proteinexpression wurde die Kultur für 24 h bei 18 – 20 °C und 200 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension zentrifugiert (5000 g, 10 min, 4 °C) und die Bakterienpellets bei -80 °C eingefroren. Der Überstand wurde verworfen.

2.3.3. Aktivitäts-Test von rekombinanten Malonyltransferasen

2.3.3.1. Herstellung des rekombinanten Proteins

2.3.3.1.1. Klonierung

DNA aus Fruchtmaterial von 'Senga Sengana' und 'Candongga' wurde gem. 2.3.2.1 extrahiert und anschließend mittels PCR amplifiziert. Nach Aufreinigung (vgl. 2.3.2.3) erfolgten ein A-Tailing (vgl. 2.3.2.4) und eine erneute Aufreinigung (vgl. 2.3.2.3) nach Auftrennung im Agarosegel (2.3.2.9). Im Anschluss konnte eine Ligation mittels pGEM®-T Easy Vector System durchgeführt werden (vgl. 2.3.2.5.1). Die daraus gewonnenen Plasmide wurden mittels Hitzeschock (vgl. 2.3.2.7.1) in *E. coli* BL21 XL1-Blue transformiert und auf eine LB-Agar-Platte (0,1 mg/ml Antibiotika; 0,5 M IPTG, 100 mg/ml X-β-Gal) ausplattiert. Diese wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Selektion der darauf gewachsenen Kolonien erfolgte über ein Blau-

Weiß-Screening, sowie einer Kolonie-PCR (vgl. 2.3.2.8). Zur weiteren Verifizierung wurden die Plasmide der Bakterien aus einer Flüssigkultur extrahiert (vgl. 2.3.2.10) und durch die Eurofins Genomics Germany GmbH sequenziert.

Für die Umklonierung wurden die Zielgene der Plasmide mittels PCR amplifiziert und nach Restriktion in den pGEX-4T-1 Vektor ligiert (vgl. 2.3.2.5.2). Es folgte eine Transformation in *E. coli* BL21 (vgl. 2.3.2.7.2). Die Verifizierung der Kolonien erfolgte mittels Kolonie-PCR (vgl. 2.3.2.8). Positive Kolonien wurden bis zur Verwendung als Cryo-Kultur bei -80°C gelagert.

2.3.3.1.2. Zellaufschluss

Die Proteinexpression erfolgte gemäß 2.3.2.15.

Das Bakterienpellet wurde auf Eis aufgetaut und mit 10 ml GST-Wasch-/Bindepuffer homogenisiert. Um Protease-Aktivität zu verhindern, wurden des Weiteren 10 µl einer 100 mM PMSF-Lösung zugefügt. Die Suspension wurde einer Ultraschallbehandlung (5x/ 30 sec/ 40 %/ Circle 5) unterzogen. Anschließend folgte eine Zentrifugation (10000 g, 20 min, 4 °C). Die darauffolgende Proteinaufreinigung wurde mit dem Überstand durchgeführt. Der Rückstand wurde verworfen.

2.3.3.1.3. Proteinaufreinigung mit GST-Tag

500 µl des GST Bind™ Resin in einer Gravity Column wurden mit zwei Säulenvolumen Wasch-/Bindepuffer konditioniert. Anschließend wurde der unter 2.3.3.1.2 gewonnene Proteinextrakt auf die Säule gegeben und zwei Stunden im Rotator bei 4 °C inkubiert. Die Flüssigkeit wurde entfernt und der Rückstand wurde mit 2,5 Säulenvolumen Wasch-/Bindepuffer gewaschen. Die Elution der Proteine erfolgte durch siebenfache Inkubation mit 300 µl GST-Elutionspuffer auf Eis. Die Eluate wurden getrennt aufgefangen. Zur Rekonditionierung des GST Bind™ Resins wurde dieses mit einem Säulenvolumen Wasch-/Bindepuffer gespült. Das Resin wurde anschließend bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C in 20 % Ethanol gelagert.

Um die Lagerstabilität der Proteine zu verbessern wurden die Eluate mit 150 µl Glycerin versetzt und anschließend bei -20 °C gelagert.

2.3.3.2. Malonyltransferase Aktivitäts-Assay

Die Reaktionsmischung des Malonyltransferase Aktivitäts-Assays bestand aus folgenden Komponenten:

- 2,5 µg Protein

- 2 µl 30 mM Substrat in DMSO
- 5 µl Reaktionspuffer
- 3 µl Malonyl-CoA (10 mM in MQ-Wasser)
- mit MQ-Wasser auf 50 µl auffüllen

Nach Homogenisieren wurde das Gemisch für 16 h bei 400 rpm und 30 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 100 µl Methanol gestoppt. Es folgte eine Zentrifugation (10 min, 4 °C, 16000 g). Für die Analyse mittels LC-MS wurden 50 µl des Überstands in ein Insert/ Vial pipettiert.

Die Assay Bedingungen wurden angelehnt an Luo et al. 2007 und Joshi et al. 2019.

2.3.4. Analyse von Fra a 1.02 aus Erdbeeren

Die Analyse des Erdbeerallergens Fra a 1 wurde analog der Methode von Kurze et al. 2018 durchgeführt.

2.3.4.1. Herstellung des rekombinanten Proteins

Die Proteinexpression erfolgte gemäß 2.3.2.15 mit *E. coli* BL21 (DE3) pLys_ FRAa-2 in pQE70. Jedem Medium wurden die Antibiotika Chloramphenicol und Ampicillin zugesetzt. Während des gesamten darauffolgenden Proteinaufschlusses wurden die Proteine entweder auf Eis oder bei 4 °C gelagert.

2.3.4.1.1. Zellaufschluss

Zunächst wurde das Bakterienpellet mit 10 ml Rückfaltungspuffer resuspendiert. Zur Stabilisierung der Proteine wurden 1 mM β-Mercaptoethanol und 1 mM PMSF zugefügt. Anschließend folgte eine Ultraschallbehandlung (3x /1 min/ 50 %/ Cicle 5). Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (10000 g, 20 min, 4 °C). Der sich dadurch ergebende Rückstand wurde beibehalten, während der proteinhaltige Überstand verworfen wurde.

2.3.4.1.2. Aufschluss Inclusion Bodies

Für den Aufschluss der Inclusion Bodies wurde der unter 2.3.4.1.1 gewonnene Rückstand mit 7 ml Solubilisationpuffer resuspendiert. Daraufhin wurde die Suspension über Nacht im Rotator bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag folgte eine Zentrifugation (13500 g, 30 min, 4 °C). Zum Rückfalten der Proteine wurde der Überstand über Nacht gegen Rückfaltungspuffer bei 4 °C dialysiert (MWCO 3500). Daraufhin folgte eine Zentrifugation des Dialysats (16000 g,

20 min, 4 °C). Der Überstand wurde abgetrennt. Es handelt sich hierbei um das Crude Protein der Inclusion Bodies. Der Rückstand wurde verworfen.

2.3.4.1.3. Proteinaufreinigung mit His-Tag

Zur Vorbereitung wurde das His-Tag-Resin (500 µl) zunächst zweimal mit je 10 ml Rückfaltungspuffer gewaschen. Dann wurde das Crude Protein auf das Resin gegeben und 2 h bei 4 °C im Rotator inkubiert. Im Anschluss folgte ein zweimaliges Waschen des Resins mit je 10 ml Rückfaltungspuffer. Für die Elution der Proteine wurde das Resin siebenmal mit je 300 µl Elutionspuffer auf Eis inkubiert. Die Elutionen wurden getrennt aufgefangen. Am Ende wurde das Resin mit 10 ml Rückfaltungspuffer gewaschen. Die Lagerung des Resins erfolgte auf 20 % Ethanol bei 4 °C.

2.3.4.1.4. Regeneration His-Tag-Resin

Nach vier Proteinaufreinigungen wurde das His-Tag-Resin regeneriert. Dafür wurde es zunächst 5 min bei Raumtemperatur mit Lösung 1 inkubiert. Es folgte erneutes Waschen mit 5 ml dieser Lösung. Danach wurde das Resin 20 min bei 4 °C in einem Rotator inkubiert. Es folgte ein Waschschritt mit 10 ml MQ-Wasser und 10 ml Lösung 3. Anschließend wurde das Resin 5 min bei Raumtemperatur mit Lösung 4 und darauf 15 min mit 3 ml Lösung 5 im Rotator bei 4 °C inkubiert. Als letztes folgten Waschschritte mit 5 ml Lösung 4, 10 ml MQ-Wasser und 5 ml Equilibrierungspuffer.

2.3.4.1.5. Endaufreinigung von Fra a 1.02 rek

Um die Protein-Eluate der His-Tag-Aufreinigung von dem im Elutionspuffer enthaltenen Imidazol zu reinigen, war ein zweiter Aufreinigungsschritt notwendig. Fraktionen, die deutliche Banden an rekombinanten Fra a 1.02 sowohl bei der SDS-PAGE (2.3.2.13) als auch im Western-Blot (2.3.2.14) zeigten, wurden zunächst vereinigt. Die vereinigten Eluate wurden über Nacht bei 4 °C gegen Carbonatpuffer dialysiert. Daraufhin wurde das Dialysat in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (13500 g, 20 min, 4 °C). Der Überstand wurde in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und über Nacht lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde bis zum Rücklösen bei -80 °C gelagert. Für die Verwendung wurde es mit 1 ml 1 mM Cystein rückgelöst. Aliquote à 100 µl wurden hergestellt und bei -20 °C gelagert. Bei Bedarf wurden die Aliquote auf Eis aufgetaut.

2.3.4.2. Proteinextraktion aus Erdbeeren

1 g Erdbeerpulver wurde in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen eingewogen. Nach der Zugabe von 2 ml Extraktionspuffer wurde das Gemisch kurz mittels Invertieren homogenisiert und anschließend 30 min im Rotator bei 4 °C inkubiert. Die Suspension wurde zentrifugiert (5100 g, 15 min, 4 °C) und der Überstand wurde über Nacht gegen PBS-Puffer dialysiert (MWCO 3500). Danach wurde das Dialysat erneut zentrifugiert (13000 g, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde am selben Tag für das ELISA verwendet und anschließend bei -20 °C gelagert.

2.3.4.3. Indirekt kompetitives ELISA

Zunächst wurde eine 96-Well-Platte mit Fra a 1.02 beschichtet. Dafür wurde diese über Nacht mit 100 µl/ Well mit 0,5 bzw. 1 ng/µl rekombinanten Fra a 1.02 in PBS bei 4 °C inkubiert. Für die Blanks wurde 100 µl/ Well PBS verwendet. Es folgte ein dreimaliges Waschen mit je 300 µl PBST-Puffer. Als Nächstes wurden durch eine zweistündige Inkubation auf einem Taumelmixer von 200 µl/ Well mit 1 % Milchpulver bei Raumtemperatur die freien Bindungsstellen der Wells blockiert. Danach wurde die Platte erneut dreimal mit je 300 µl/ Well PBST-Puffer gewaschen. 50 µl/ Well an PBS-Puffer (Blank), Proteinextrakt bzw. Standard wurden in die Wells pipettiert (Abbildung 16 und Abbildung 17). Als Standard für die Kalibrierung wurden Lösungen von 0,01 bis 50 µg/ml an rekombinanten Fra a 1.02 in PBS-Puffer verwendet. Des Weiteren wurden 50 µl/ Well an 2 bzw. 4 ng/µl Primärantikörper (KUR-FRA) zugefügt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	2 µg/µl AK		4 µg/µl AK		2 µg/µl AK		4 µg/µl AK		Leerwert				
B	2 µg/µl AK		4 µg/µl AK		2 µg/µl AK		4 µg/µl AK		0,01 ng/µl				
C	2 µg/µl AK		4 µg/µl AK		2 µg/µl AK		4 µg/µl AK		0,1 ng/µl				
D	2 µg/µl AK		4 µg/µl AK		2 µg/µl AK		4 µg/µl AK		0,3 ng/µl				
E	2 µg/µl AK		4 µg/µl AK		2 µg/µl AK		4 µg/µl AK		1 ng/µl				
F	2 µg/µl AK		4 µg/µl AK		2 µg/µl AK		4 µg/µl AK		3 ng/µl				
G	2 µg/µl AK		4 µg/µl AK		2 µg/µl AK		4 µg/µl AK		10 ng/µl				
H	2 µg/µl AK		4 µg/µl AK		2 µg/µl AK		4 µg/µl AK		50 ng/µl				

Coating mit
Coating mit
0,5 ng/µl rFra a1
1 ng/µl rFra a1

Abbildung 16: ELISA Pipettierschema Optimierungsplatte

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Leerwert			P 1.1. 1:2			P 1.2. 1:2			P 1.3. 1:2		
B	0,01 ng/µl			P 1.1. 1:4			P 1.2. 1:4			P 1.3. 1:4		
C	0,1 ng/µl			P 2.1. 1:2			P 2.2. 1:2			P 2.3. 1:2		
D	0,3 ng/µl			P 2.1. 1:4			P 2.2. 1:4			P 2.3. 1:4		
E	1 ng/µl			P 3.1. 1:2			P 3.2. 1:2			P 3.3. 1:2		
F	3 ng/µl			P 3.1. 1:4			P 3.2. 1:4			P 3.3. 1:4		
G	10 ng/µl			P 4.1. 1:2			P 4.2. 1:2			P 4.3. 1:2		
H	50 ng/µl			P 4.1. 1:4			P 4.2. 1:4			P 4.3. 1:4		

Abbildung 17: ELISA Pipettierschema Probenplatte

Die Platte wurde drei Stunden bei 4 °C auf einem Taumelmixer inkubiert und anschließend viermal mit je 300 µl/ Well PBST-Puffer gewaschen. Die Quantifizierung des indirekt kompetitiven ELISA basierte auf der photometrischen Bestimmung des Oxidationsprodukts von TMB, dessen Bildung durch die Merrettichperoxidase (HRP) katalysiert wird. Hierfür wurden anschließend 100 µl/ Well an 1 ng/µl Sekundärantikörper (Anti-Kaninchen-HRP) auf die Platte pipettiert und diese danach eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Taumelmixer inkubiert. Schließlich wurde die Platte fünfmal mit je 300 µl/ Well PBST-Puffer gewaschen. 100 µl/ Well TMB für ELISA wurden zugefügt und die Platte 25 min bei RT inkubiert. Die Enzymreaktion wurde durch die Zugabe von 100 µl/ Well 2 M Schwefelsäure gestoppt. Die Platte wurde bei 450 gegen 620 nm am Plate Reader vermessen. Bei jeder neuen Charge an rekombinanten Fra a 1.02 wurde die Konzentration an Blockierlösung und Primärantikörpern neu optimiert.

2.4. Software

Tabelle 20: Software

Name	Verwendung	Entwickler
ChemDraw Professional 16.0	Chemische Strukturen	Perkin Elmer, Waltham, USA
Chem3D 16.0	Chemische Strukturen	Perkin Elmer, Waltham, USA
DataAnalysis 6.2	Auswertung der Massen- und UV-Spektren, Auftrennen der positiven und negativen MS-Spuren	Agilent Technologies, Californien, USA
Excel 2016	Datenauswertung und Datentabellen	Microsoft, München
GeneiousTM Pro 5.67	DNA- und Proteinsequenzen	Biomatters, Auckland, Neuseeland

2. Material und Methoden

Name	Verwendung	Entwickler
Mars Data Analysis Software	Auswertung der Bioassays	BMG LABTECH
QuantAnalysis 6.2	Quantifizierung der Massenspektren	Agilent Technologies, Californien, USA
R	Statistische Auswertung, <i>Untargeted</i> Analysen	R Core Team (2019), Wien, Österreich

Tabelle 21: R-Pakete

Zusätzliche R-Pakete	Referenz
agricolae	Mendiburu 2020
corrplot	Wei und Simko 2017
DescTools	Signorell und et mult. al. 2020
dplyr	Wickham et al. 2019
dunn.test	Dinno 2017
exactRankTests	Hothorn und Hornik 2019
FSA	Ogle et al. 2020
ggfortify	Horikoshi und Tang 2016
ggplot2	Wilkinson 1999
ggpubr	Kassambara 2020
ggrepel	Slowikowski 2019
magrittr	Milton Bache und Wickham 2014
multcompView	Graves et al. 2019
PerformanceAnalytics	Peterson und Carl 2020
RColorBrewer	Neuwirth 2014
rcompanion	Mangiafico 2020
rgl	Adler et al. 2020
rlm	Yegorov 2016
sm	Bowman und Azzalini 2018
XCMS	Smith 2010

3. Ergebnisse

3.1. Validierungsparameter der verwendeten Analysemethoden

3.1.1. LC-MS-Screening der Sekundärmetaboliten

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der mittels LC-MS-Analysen detektierten Erdbeerfruchtmetaboliten wurden angelehnt an die Leerwertmethode der DIN 32645 bestimmt. Als Nachweisgrenze (LOD) ist die mittlere Blankkonzentration zuzüglich der dreifachen Standardabweichung (STD) definiert. Für die Bestimmungsgrenze (LOQ) gilt die Addition der zehnfachen Standardabweichung (STD) (Abbildung 18). Da es jedoch nicht möglich war eine Sekundärmetaboliten-freie Matrix zu evaluieren und auch keine absolute Quantifizierung durchgeführt wurde, die eine Kalibrierung zur Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen ermöglichen würde, beruhten die Berechnungen auf dem Hintergrundrauschen von Blank-Läufen an dem LC-MS, die zwischen den Probenläufen wiederholt gemessen wurden. Die Konzentrationsberechnung erfolgte mittels mittlerer Flächen des Internen Standards in den Probenläufen.

$$LOD = \bar{c}_{blank} \cdot 3STD_{blank}$$

$$LOQ = \bar{c}_{blank} \cdot 10STD_{blank}$$

Abbildung 18: Berechnung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die LOQs der untersuchten Metaboliten reichten von 0,1 ppm für (Epi)afzelechin-(epi)catechin bis hin zu 200 ppm für Pelargonidin-3-glucosid (Tabelle 22). Die deutlich höhere Nachweis- und Bestimmungsgrenze von Pelargonidin-3-glucosid im Vergleich zu den der anderen Metaboliten ist vermutlich auf die hohe Konzentration in den Extrakten, sowie das hohe Probenaufkommen zurückzuführen. Dies resultierte letztendlich in einem hohen Hintergrundsignal, das trotz täglichen Putzens des Spray-Shields und wiederholter Reinigung der Ionenoptik nicht vollständig vermieden werden konnte.

Tabelle 22: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der mittels LC-MS detektierten Metaboliten

Analyt	LOD [ppm Equ. IS]	LOQ [ppm Equ. IS]
(Epi)afzelechin-(epi)afzelechin-(epi)catechin 1	0,1	0,3
(Epi)afzelechin-(epi)afzelechin-(epi)catechin 2	0,2	0,5
(Epi)afzelechin-(epi)afzelechin-(epi)catechin 3	0,1	0,2
(Epi)afzelechin-(epi)catechin Isomer 1	1	3
(Epi)afzelechin-(epi)catechin Isomer 2	0,3	0,7
(Epi)afzelechin-(epi)catechin Dimer 1	0,2	0,5
(Epi)afzelechin-(epi)catechin Dimer 2	2	7
(Epi)afzelechin-(epi)catechin Dimer	1	3

3. Ergebnisse

Analyt	LOD [ppm Equ. IS]	LOQ [ppm Equ. IS]
(Epi)afzelechin-(epi)catechin-(epi)catechin	0,1	0,1
(Epi)catechin-(epi)catechin-(epi)catechin Isomer 1	1	3
(Epi)catechin-(epi)catechin-(epi)catechin Isomer 2	0,7	2
(Epi)catechin-(epi)catechin-(epi)catechin Isomer 3	2	7
(Epi)catechin-(epi)catechin-(epi)catechin Trimer	0,3	0,7
(Epi)catechin-hexosid	0,2	0,4
Äpfelsäure	1	3
Bis-HHDP-hexose	6	20
Caffeoyl-dicumaryl-spermidin	1	2
Catechin	0,7	2
Chelidonsäure	0,2	0,4
Citronensäure	5	20
Cyanidin-3-glucosid	8	20
Cyanidin-3-malonylglucosid	0,9	2
Dicaffeoyl-cumaryl-spermidin	2	6
Dicumaryl-hexose	0,9	2
Digalloyl-chinasäure	0,8	2
Digalloyl-hexose	0,3	0,6
Digalloyl-HHDP-glucose	0,7	2
Ellagsäure	1	3
Ellagtannin	0,6	2
Epiafzelechin-(4a->8)-pelargonidin-3-O-glucosid	0,2	0,5
Ferulasäure-glucoseester/glucosid	0,3	0,7
Galloyl-bis-HHDP-glucosid	1	4
Glutathion	5	10
Glutathion (reduziert)	4	10
Glutathion (oxidiert)	0,4	1,0
HDMF-glucosid	2	4
HHDP-galloyl-glucosid	0,5	1
Isorhamnetin-sophorose oder -dihexose	0,6	2
Kaempferol-3-cumarylglucosid	0,7	2
Kaempferol-3-malonylglucosid	0,2	0,6
Kaempferol-acetyl/malonylglucosid	2	5
Kaempferol-glucuronid	0,3	0,8
Kaempferol-glucosid	2	7
Kaempferol-hexose	0,2	0,4
Kaempferol-hexose-glucuronid	0,6	2
Kaempferol-pentose-glucuronid	1	3
Kaffeesäure-glucoseester/glucosid	0,6	2

3. Ergebnisse

Analyt	LOD [ppm Equ. IS]	LOQ [ppm Equ. IS]
p-Cumaryl-glucoseester	0,2	0,6
Pelargonidin-3-glucosid	70	200
Pelargonidin-3-malonylglucosid	5	10
Pelargonidin-3-rutinosid	9	20
Phenylalanin	1	3
Procyanidin B1	1	4
Procyanidin B1+B3	4	10
Procyanidin B3	0,3	0,7
Quercetin-3-glucosid	0,7	2
Quercetin-acetyl/malonylglucosid	0,9	2
Quercetin-glucosid	0,6	2
Quercetin-glucuronid	2	6
Quercetin-pentose-glucuronid	0,9	2
Quercetin-pentosid	10	40
Tetragalloyl-glucose	4	10
Trigalloyl-hexose	2	5
Tryptophan	0,3	0,7
Zimtsäure-glucoseester	3	7

Auf Grund einer Co-Elution mit einem unbekanntem Metaboliten desselben m/z Verhältnisses konnte Kaffeesäureglucoseester/glucosid trotz Identifizierung in den Erdbeerfrüchten nicht quantifiziert werden. Bezüglich Quercetin-3-acetyl/malonylglucosid und Kaempferol-3-acetyl/malonylglucosid konnte keine Differenzierung zwischen Malonyl und Acetyl gemacht werden, da die Malonyl-Form zu einer Decarboxylierung zu einer Pseudo-Acetyl-Form in der Ionenquelle des LC-MS neigte und beide Moleküle bei der verwendeten Methode nicht chromatographisch getrennt werden konnten.

Die Präzisionen der LC-MS-Methode wurden nur für die Fruchtmetaboliten ermittelt. Bei der Wiederholpräzision wurde dasselbe Fruchtmaterial dreifach mit jeweils einwöchigem Abstand aufgearbeitet. Für die Gerätepräzision wurde ein Fruchtextrakt dreifach injiziert.

Tabelle 23: Geräte- und Wiederholpräzision der LC-MS-Methode

Analyt	Gerätepräzision	Wiederholpräzision
(Epi)afzelechin-(epi)catechin Dimer 1	0,35	0,02
(Epi)afzelechin-(epi)catechin-(epi)catechin	0,24	0,11
(Epi)afzelechin-(epi)catechin Dimer 2	0,27	0,20
(Epi)catechin-(epi)catechin-(epi)catechin Isomer 1	0,32	0,21

3. Ergebnisse

Analyt	Gerätepräzision	Wiederholpräzision
(Epi)catechin-(epi)catechin-(epi)catechin Isomer 2	0,21	0,25
(Epi)catechin-(epi)catechin-(epi)catechin Isomer 3	0,24	0,16
Äpfelsäure	0,14	0,05
Ascorbinsäure	0,14	0,13
Catechin	0,19	0,06
Citronensäure	0,08	0,04
Cyanidin-3-glucosid	0,06	0,05
Cyanidin-3-malonylglucosid	0,08	0,03
Ellagsäure	0,18	0,06
Epiafzelechin-(4a->8)-pelargonidin-3-O-glucosid	0,13	0,32
Ferulasäure-glucoseester/glucosid	0,18	0,08
HDMF-glucosid	0,13	0,07
HHDP-galloyl-glucosid	0,16	0,07
Kaempferol-3-cumarylglucosid	0,14	0,14
Kaempferol-3-malonylglucosid	0,23	0,13
Kaempferol-acetyl/malonyl-glucosid	0,18	0,05
Kaempferol-glucosid	0,18	0,08
Kaempferol-glucuronid	0,26	0,15
p-Cumaryl-glucoseester	0,06	0,06
Pelargonidin-3-glucosid	0,07	0,07
Pelargonidin-3-malonylglucosid	0,02	0,04
Pelargonidin-3-rutinosid	0,05	0,09
Procyanidin B1	0,18	0,12
Procyanidin B3	0,20	0,10
Quercetin-acetyl/malonyl-glucosid	0,24	0,10
Quercetin-glucosid	0,15	0,22
Quercetin-glucuronid	0,11	0,05
Zimtssäure-glucoseester	0,18	0,20

Für annähernd alle Analyten ließen sich trotz des sehr weitgefächerten Metabolitenspektrums Präzisionen von unter 0,3 ermitteln. Die meisten Anthocyane wiesen sogar Präzisionen von unter 0,1 auf, was auf eine präzise Methode zurückschließen lässt. Im Allgemeinen tendierten die Gerätepräzisionen schlechter zu sein als die Wiederholpräzisionen. Da die Messung mancher Probensets jedoch weit mehr als drei Wochen in Anspruch nahm, wurden die Proben mittels eines Erdbeerkontrollstandards zwischen den Messreihen normalisiert (vgl. 2.1.2.2).

3.1.2. Quantifizierung des Allergengehaltes mittels indirekt kompetitiven ELISA

Jeder Proteinextrakt wurde in zwei Verdünnungen jeweils in Dreifachbestimmung analysiert. Drei Probenextrakte (Replikate) ergaben dadurch 18 Messungen pro Probe/ Genotyp. Für die Bestimmung der Präzision wurde ein homogenes Erdbeerpulver dreimal extrahiert und diese drei Extrakte gemäß der allgemeinen Probenanalyse quantifiziert.

Für die innere Platten-Präzision wurde das Erdbeerpulver dreimal separat in jeweils einer Dreifachbestimmung aufgearbeitet und auf derselben 96-Well-Platte analysiert. Es ergab sich eine mittlere Standardabweichung der Messwerte einer Probe von 0,35. Diese Messpräzision ist zwar nicht sehr hoch, kann jedoch durch die hohe Anzahl der Messungen ausgeglichen werden. Die Mediane der drei Probenquantifizierungen auf einer Platte wichen durchschnittlich um nur 15 % voneinander ab.

Für die Bestimmung der Inter-Platten Präzision wurden dieselben Extrakte auch auf einer zweiten 96-Well-Platte analysiert. Hier ergab sich eine Präzision von 0,33. Um diese Präzision zu optimieren wurde eine Normalisierung der Platten zueinander mittels wiederholt analysiertem Erdbeerstandard für die späteren Probenmessungen eingeführt.

Da bei dem ELISA keine lineare Korrelation, sondern ein sigmoider Kurvenverlauf das Verhältnis von Signal zu Konzentration bestimmt und somit auch keine direkte Umrechnung des normalverteilten Fehlers zu einer Konzentration möglich ist, wurde für den ELISA keine Nachweisgrenzen- und Bestimmungsgrenzen gem. DIN 32645 bestimmt (Schneider 2005).

3.2. Sekundärmetabolitenanalyse von Kreuzungspopulationen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die methanolischen Extrakte der Früchte zweier *Fragaria x ananassa* Kreuzungspopulationen mittels LC-MS untersucht, um die Vererbung von Fruchtqualitätsgenen in Folgestudien untersuchen zu können. Der Schwerpunkt lag auf der Bestimmung der Polyphenole. Da eine relative und keine absolute Quantifizierung der Metaboliten erfolgte, wurden jeweils immer nur die Konzentrationen eines Metaboliten miteinander verglichen.

3.2.1. Französische Kreuzungspopulation 'Capitola' x 'CF1116'

Bei der französischen Kreuzungspopulation handelt es sich um Abkömmlinge einer Kreuzung der Sorten 'Capitola' (Cap) und 'CF1116'. Die Metabolitengehalte von 50 Genotypen dieser Kreuzungspopulation inklusive der Elternsorten wurden mit Hilfe der LC-MS identifiziert und relativ als mg-interner Standardäquivalent pro kg Frischgewicht (ppm Equ. IS) quantifiziert und verglichen. Es konnten 31 Metaboliten relativ quantifiziert werden.

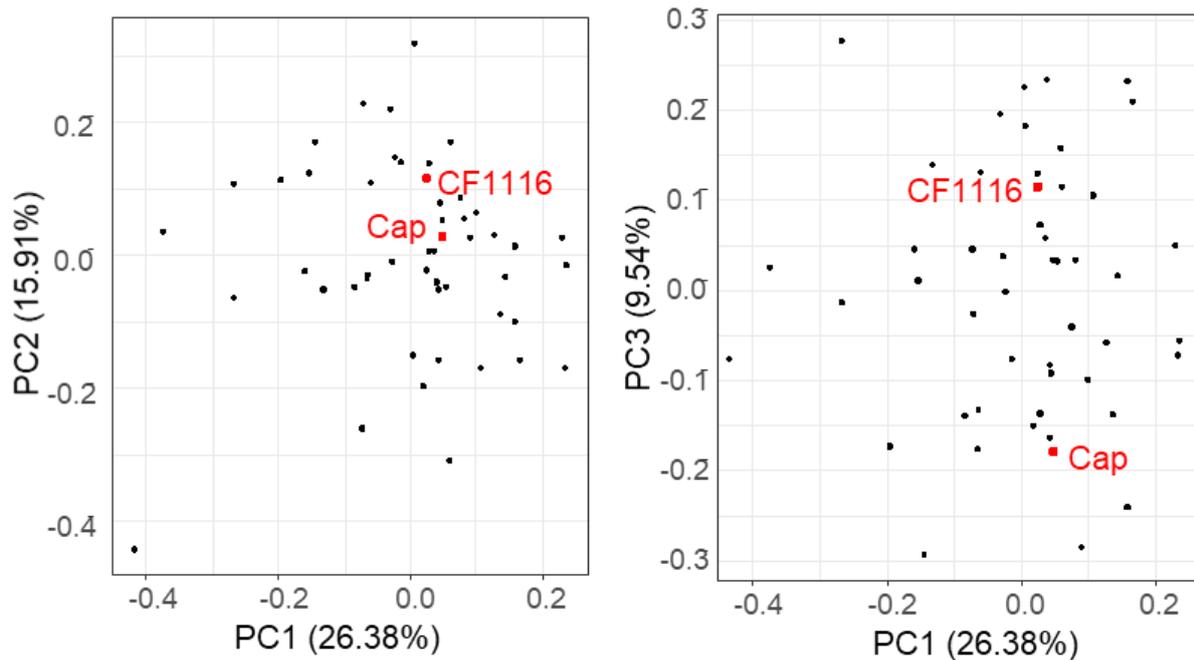


Abbildung 19: Hauptkomponentenanalyse (PCA) der mittleren Metabolitengehalte der Genotypen der französischen Kreuzungspopulation. Hervorgehoben sind die beiden Elternsorten *Capitola* (Cap) und CF1116.

Die Hauptkomponentenanalyse (PCA) der Gehalte der Inhaltsstoffe der einzelnen Genotypen zeigt, dass die beiden Elternsorten weitgehend in der Mitte der Population liegen (Abbildung 19). Das bedeutet, dass beide Elternsorten im Vergleich zur Gesamt-Population eine durchschnittliche Konzentration der untersuchten Metaboliten aufwiesen und diesbezüglich zu keinen Extremwerten neigten.

Die Gehalte einzelner Metaboliten, wie beispielsweise der Primärmetaboliten Citronensäure und der Äpfelsäure, variierten relativ wenig in den untersuchten Genotypen. Bei der Äpfelsäure reichten die Konzentrationen von $52,5 \pm 9,2$ ppm Equ. IS bei Genotyp 146 bis zu 102 ± 11 ppm Equ. IS bei 116, Citronensäure von 398 ± 65 ppm Equ. IS bei 117 bis 740 ± 89 ppm Equ. IS bei 109 (Abbildung 20). Bei den Flavanolen unterschieden sich die niedrigsten und höchsten Werte um den Faktor zwei bis sechs. Bei den Flavonolen lagen die Schwankungen mit Faktoren von vier bis sieben in einem ähnlichen Bereich. Einzelne Metaboliten stachen jedoch durch besonders hohe Differenzen zwischen den Genotypen hervor. Dies betraf u.a. das HDMF-glucosid. Der Genotyp mit der niedrigsten Konzentration, 036, hatte einen Gehalt von $6,0 \pm 1,2$ ppm Equ. IS, während Genotyp 150 eine Konzentration von $59,6 \pm 11,6$ ppm Equ. IS aufwies. Weitere extreme Schwankungen waren bei den malonylierten Anthocyanen Pelargonidin-3-malonylglucosid und Cyanidin-3-malonylglucosid zu erkennen. In beiden Fällen lagen die Konzentrationen einzelner Genotypen unter den Bestimmungsgrenzen der beiden Metaboliten von 10 bzw. 2 ppm Equ. IS während jedoch auch Gehalte bis hin zu

3. Ergebnisse

118 ± 21 ppm Equ. (036) an Pelargonidin-3-malonylglucosid und 22,1 ± 7,2 ppm Equ. IS (017) an Cyanidin-3-malonylglucosid bestimmt wurden.

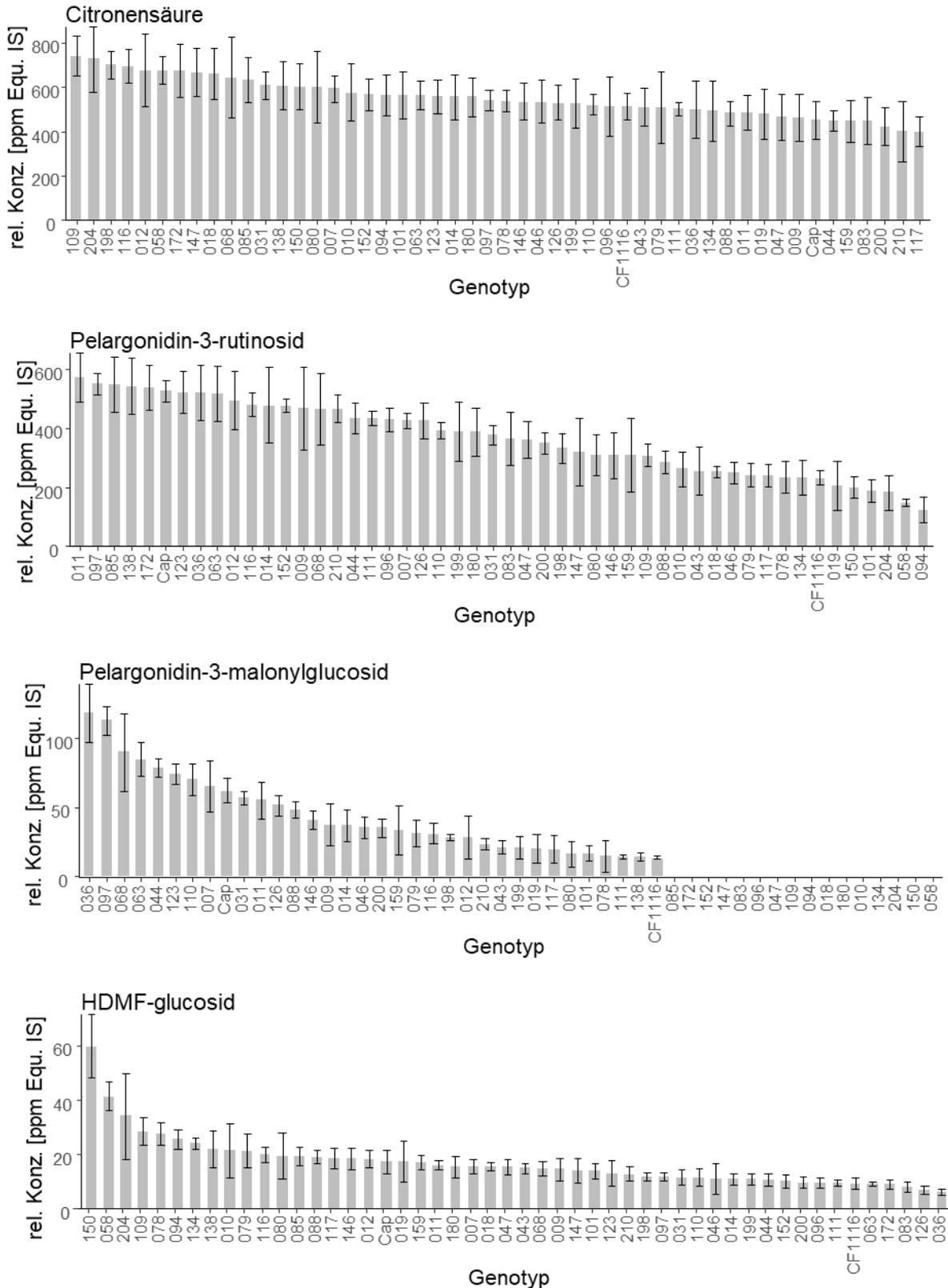


Abbildung 20: Relative Konzentrationen ausgewählter Metaboliten von Genotypen der französischen Kreuzungspopulation. Die relativen Konzentrationen sind in ppm Equ. IS angegeben. Bei fehlendem Balken befinden sich die Konzentrationen unter der Bestimmungsgrenze.

3. Ergebnisse

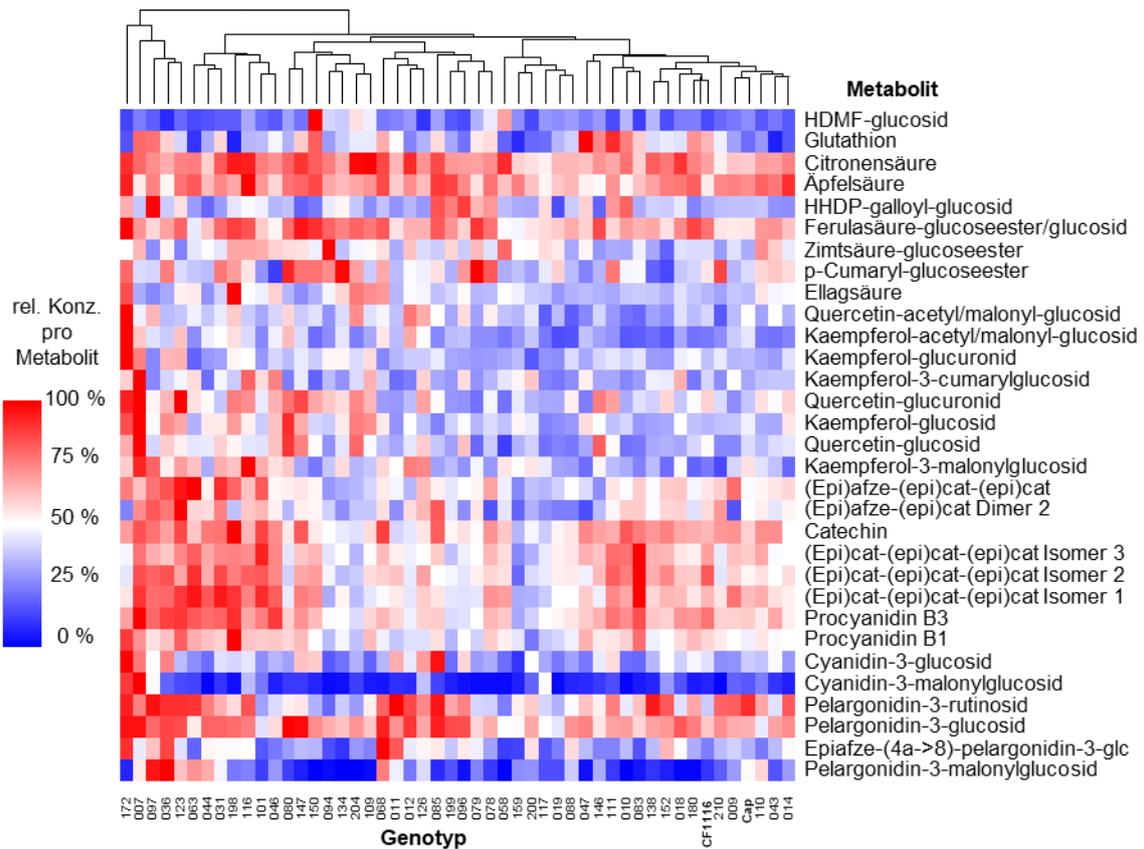


Abbildung 21: Heatmap der relativen Metabolitenkonzentrationen der Genotypen der französische Kreuzungspopulation. 100 % entspricht der höchsten relativen Konzentration eines Analyten im Datenset, 0 % entspricht 0 % dieses Wertes.

Darüber hinaus konnte auch zwischen den unterschiedlichen Metaboliten eine Tendenz bezüglich mancher Genotypen beobachtet werden (Abbildung 21). Genotypen, wie beispielsweise 123, die zu einem hohen Gehalt an dem Flavanol Catechin neigten, wiesen auch hohe Gehalte an den anderen untersuchten Flavanolen auf. Dabei war es unerheblich, ob es sich um Dimere (Procyanidin B1, Procyanidin B3, (Epi)catechin-(epi)afzelechin) oder Trimere ((Epi)catechin-(epi)catechin-(epi)catechin Isomere, (Epi)afzelechin-(epi)catechin-(epi)catechin) handelte. Ein ähnliches Verhalten der Genotypen, wenn auch nicht so ausgeprägt, zeigten auch die beiden Primärmetaboliten Citronensäure und Äpfelsäure. So akkumulierten Genotyp 85, 116 und 172 relativ hohe Gehalte an Citronensäure und Äpfelsäure. Bei den Flavonolen Quercetin-glucuronid, Kaempferol-glucosid und Quercetin-glucosid konnte dieses gemeinsame Verhalten ebenfalls beobachtet werden. Ein weiteres Metaboliten-Paar waren in dieser Hinsicht auch die Anthocyane Pelargonidin-3-glucosid und Pelargonidin-3-rutinosid.

3. Ergebnisse

Die Analyse der Korrelationen der Metabolitengehalte ist nützlich, um die Regulierung von Metaboliten-Flüssen innerhalb der Pflanze besser zu verstehen. Diese Korrelationen wurden mittels der Rangkorrelationsanalyse nach Spearman berechnet. Für die Auswertung wurden nur die Rangkorrelationskoeffizienten (r_{SP}) -Werte der Metaboliten-Paare miteinbezogen, für die eine Signifikanz besteht ($p \leq 0,05$) (Abbildung 22). Überwiegend bestanden zwischen den analysierten Metabolitengehalten positive Korrelationen. Wenn nicht explizit als negativ beschrieben, handelt es sich deswegen im Folgenden immer um positive Korrelationen.

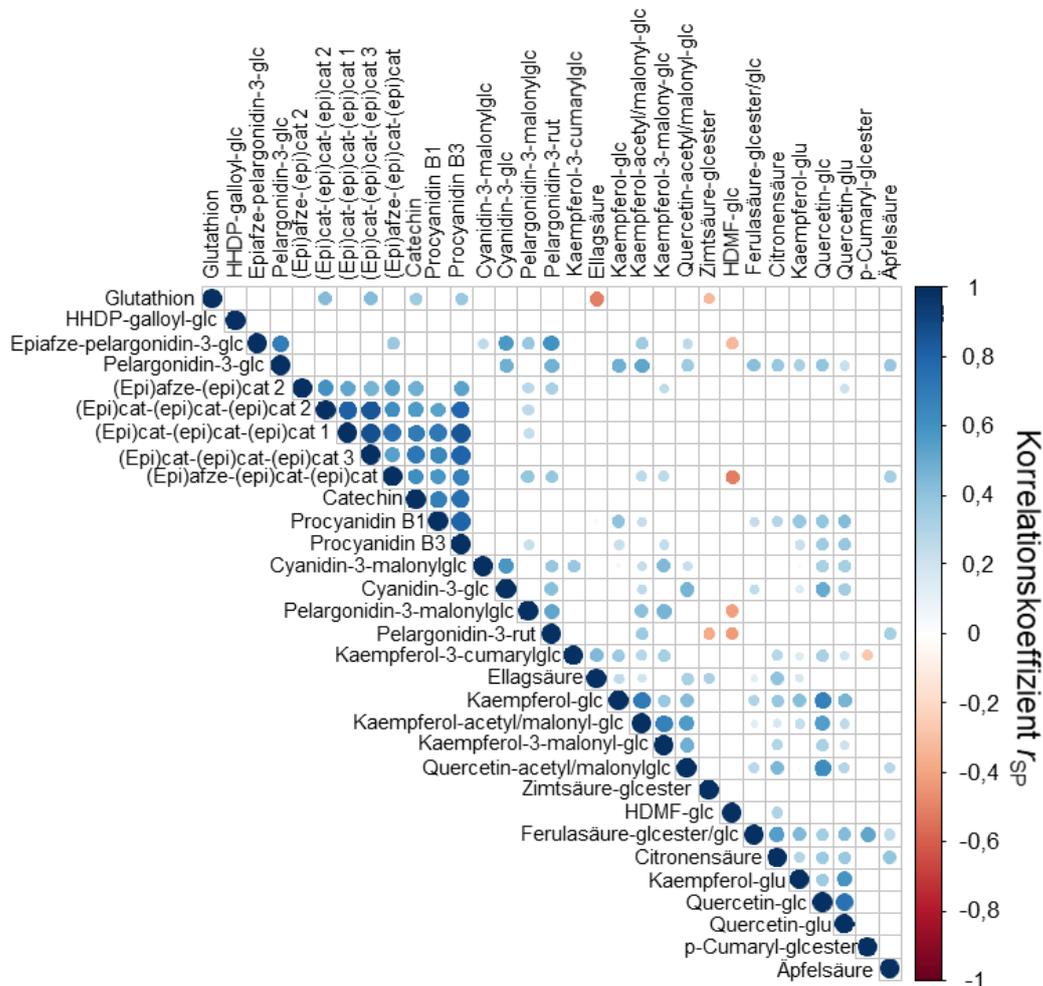


Abbildung 22: Korrelationsplot der Metabolitengehalte der Früchte der französischen Kreuzungspopulation nach Spearman. Die Punkte zeigen den Korrelationskoeffizienten r_{SP} zwischen zwei Metaboliten, rot: entgegengesetzte Korrelation, blau: direkte Korrelation. Je größer der Punkt und je dunkler die Farbe, desto stärker die jeweilige Korrelation. Weiß bedeutet keine signifikante Korrelation zwischen zwei Metaboliten ($p \geq 0,05$).

Wie bereits bei der Heatmap im vorherigen Abschnitt ersichtlich (Abbildung 21), wiesen die Konzentrationen aller Flavonole eine stark ausgeprägte Korrelation zueinander auf (Abbildung 22 und Abbildung 23). Diese war unabhängig vom Polymerisierungsgrad und den monomeren Einheiten. Auch die Konzentrationen der „Misch“-Polymere (Epi)afzelechin-(epi)catechin (Abbildung 22) und (Epi)afzelechin-(epi)catechin-(epi)catechin (Abbildung 22) korrelierten mit den Konzentrationen an Catechin, obwohl die Polymere neben (Epi)catechin auch aus

3. Ergebnisse

(Epi)afzelechin bestehen und im Gegensatz dazu zusätzlich kein Monomer, sondern ein Dimer bzw. Trimer sind.

Des Weiteren korrelierten erwartungsgemäß die Flavonolgehalte miteinander (Abbildung 22). Die einzigen Ausnahmen sind das Verhältnis von Kaempferol-glucuronid zu Kaempferol-malonylglucosid und von Kaempferol-glucuronid zu Quercetin-acetyl/malonylglucosid. Im Gegensatz zu den Flavanolen gab es deutliche Schwankungen der r_{SP} -Werte. Eine besonders stark ausgeprägte Korrelation war zwischen den Gehalten an Kaempferol-malonylglucosid und Kaempferol-malonyl/acetylglucosid zu sehen. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass es sich bei beiden Spuren hauptsächlich um dasselbe Ausgangsmolekül handelt. Kaempferol-malonylglucosid decarboxyliert während der Ionisation zu pseudo-Kaempferol-acetylglucosid. Da aber mit der verwendeten chromatographischen Methode nicht ausgeschlossen werden konnte, dass sich natives Kaempferol-acetylglucosid mit der pseudo-Kaempferol-acetylglucosid-Spur überlagert, wurde diese Spur separat als Kaempferol-

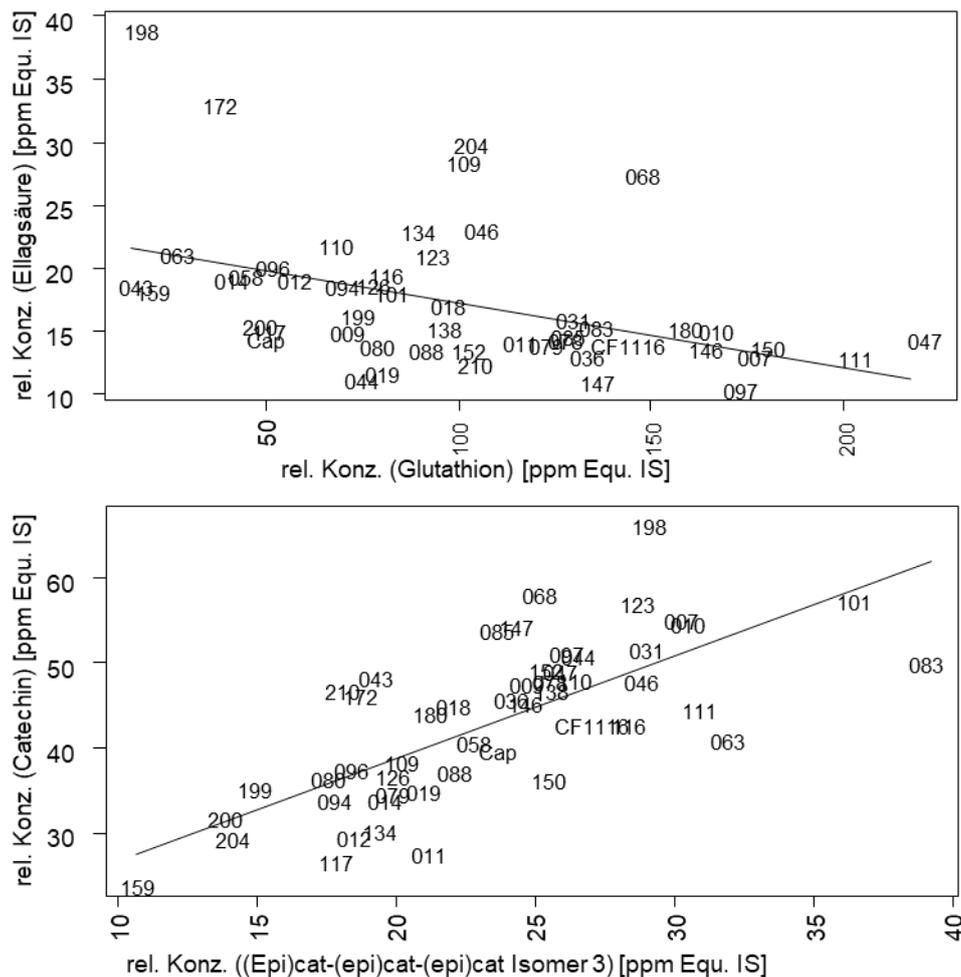


Abbildung 23: Korrelations-Scatterplots der Ellagsäure/Glutathion-Konzentrationen und der Catechin/(Epi)afzelechin-(Epi)catechin-(Epi)catechin-Konzentration der Genotypen der französischen Kreuzungspopulation. Die obere Abbildung zeigt eine negative, entgegengesetzte Korrelation, die untere eine positive, direkte Korrelation.

malonyl/acetylglucosid ausgewertet. Auch die Konzentrationen von Quercetin-glucosid und Kaempferol-glucosid korrelierten stark.

Obwohl Ellagsäure zur selben Metaboliten-Klasse wie HHDP-galloylglucosid gehört, war keine Korrelation zwischen den Gehalten feststellbar. Gleiches gilt für das Phenylpropanoid Zimtsäure-glucoseester, dessen Gehalte keine Korrelation mit den Gehalten beider weiteren Phenylpropanoide Ferulasäure-glucoseester/glucosid und p-Cumaryl-glucoseester zeigte.

Innerhalb der Anthocyane konnten Interaktionen berechnet werden. Überraschend gab es jedoch zwischen den Pelargonidin-3-malonylglucosid-Gehalten und den Cyandin-3-malonylglucosid-Gehalten keine signifikante Korrelation. Beide Moleküle haben eine vergleichbare Biosynthese. Für Cyandin-3-malonylglucosid wird nur eine zusätzliche Hydroxylierung am B-Ring mittels Flavonoid-3'-Hydroxylase benötigt. Auch zwischen den Gehalten an Pelargonidin-3-malonylglucosid und den Gehalten seines nicht-malonylierten biosynthetischen Vorläufers Pelargonidin-3-glucosid bestand keine signifikante Korrelation.

Allerdings gab es nicht nur Korrelationen der Gehalte innerhalb der Metaboliten-Gruppen, sondern auch zwischen den Gruppen. Die Gehalte der Ellagsäure wiesen eine negative Korrelation mit den Glutathion-Gehalten auf (Abbildung 23). Eine positive Korrelation bestand zwischen den Glutathion-Gehalten und den Gehalten der Flavanole, jedoch nicht immer signifikant für jedes Flavanol. Weitere negative Korrelationen gab es auch zwischen den Konzentrationen des HDMF-glucosids und eines Flavanol-Trimers. Mit den Gehalten anderer Flavanole waren diese auch zu erkennen, jedoch nicht signifikant.

Darüber hinaus korrelierten die Gehalte an HDMF-glucosid auch negativ mit den Gehalten der Pelargonidin-Derivate Pelargonidin-3-malonylglucosid, Pelargonidin-3-rutinosid und Epifzelechin-pelargonidin-3-glucosid (Abbildung 22). Die Anthocyane stehen in Beziehung mit den Flavonolen. Insbesondere der Pelargonidin-3-glucosid-Gehalt korrelierte mit annähernd allen Flavonolgehalten und die Pelargonidin-3-malonylglucosid-Konzentrationen zeigte Korrelationen mit den Konzentrationen der Flavonole Kaempferol-malonylglucosid und Kaempferol-acetyl/malonylglucosid. Darüber hinaus gab es auch eine positive Korrelation mit dem Gehalt des Anthocyanderivats Epifzelechin-pelargonidin-3-glucosid und mit dem Gehalt des Flavanol Monomers Catechin.

3.2.2. GoodBerry-Kreuzungspopulation 'Senga Sengana' x 'Candongga'

Die in dieser Arbeit analysierte Untergruppe der GoodBerry-Kreuzungspopulation umfasste 64 Genotypen inklusive der Elternsorten 'Senga Sengana' und 'Candongga'. Diese wurden an fünf verschiedenen Standorten in Europa (Spanien: IFAPA, Italien: UPM, Frankreich: Ciref, Deutschland: Hansabred und Polen: INHORT) für zwei Jahre angebaut. Auf Grund von

Vermehrungsproblemen der Pflanzen und Ernteauffällen konnten jedoch von beiden Jahren und allen Standorten nur Früchte von elf Genotypen flächendeckend analysiert werden (Datenset 17/18). Im zweiten Erntejahr betrug die Anzahl der Genotypen aller Standorte 48 (Datenset 18). Die 48 Genotypen umfassten auch sechs Inzuchtlinien von 'Candongga'. Die folgenden Kapitel beziehen sich abwechselnd auf beide Datensets.

3.2.2.1. Einfluss von Genotyp und Umwelt

Die Metabolitengehalte der 11 Genotypen der Kreuzungspopulation, die in 2017 und 2018 (Abbildung 24) und der 48 Genotypen, die mittels LC-MS im Erntejahr 2018 (Abbildung 25) relativ quantifiziert wurden, wurden einer PCA Analyse unterworfen, um den Einfluss des Genotyps und der Umwelt auf die Metabolitengehalte zu ermitteln. Bei der Auswertung der beiden Datensets mittels PCA fiel auf, dass vor allem der Genotyp eine Trennung der Proben bedingt. In Abbildung 24 und Abbildung 25 sind die Elternsorten stets voneinander getrennt angeordnet.

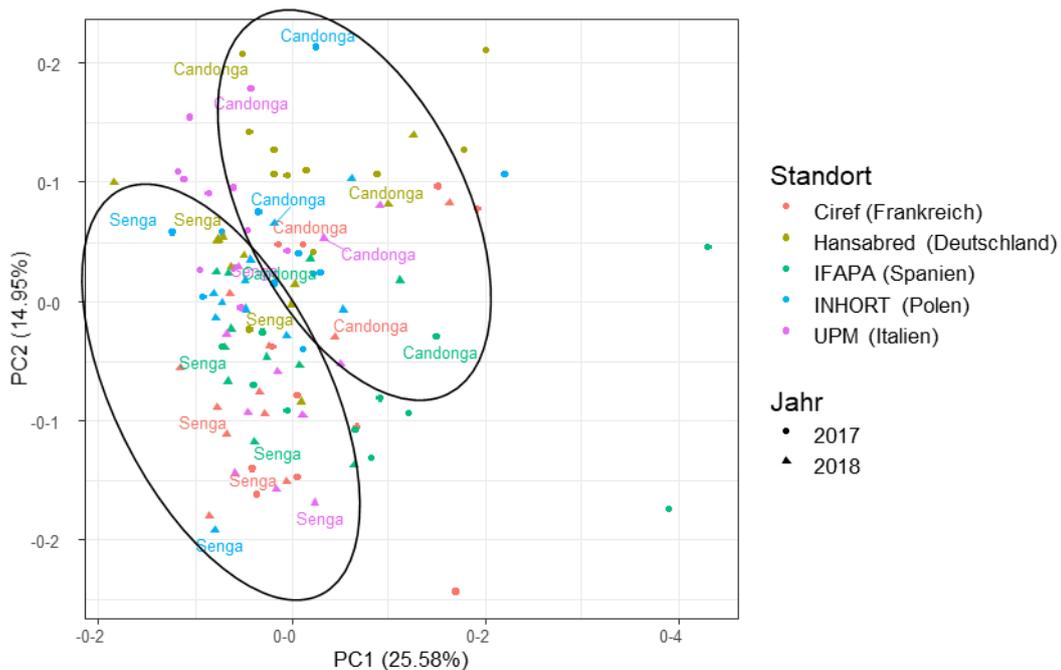


Abbildung 24: PCA der Metabolitengehalte ausgewählter Genotypen ($n=11$) der GoodBerry-Population in den Erntejahren 2017 und 2018 (Datenset 17/18). Die Symbole repräsentieren die verschiedenen Genotypen. Hervorgehoben sind die Elternsorten 'Senga Sengana' und 'Candongga'. Die Anfärbung ist abhängig vom Standort, die Form der Symbole ist abhängig vom Erntejahr.

Die 'Candongga'-Inzuchtlinien (Abbildung 25) streuen um die jeweiligen 'Candongga'-Werte. Sie neigen im Schnitt also zu extremeren Werten als 'Candongga', ihre Verbindung zu 'Candongga' ist aber im Vergleich zu 'Senga Sengana' deutlich zu erkennen. Neben dem Einfluss des Genotyps konnte aber auch ein Einfluss der Umwelt festgestellt werden, was an der Streuung der Metabolitengehalte für die jeweiligen Genotypen an den verschiedenen Standorten zu erkennen ist (Abbildung 25). Der Umwelteffekt zeigt sich auch beim Vergleich der

Metabolitengehalte der Genotypen in den Erntejahren 2017 und 2018 (Abbildung 24). Die unterschiedlichen Erntejahre führten zu veränderten Metaboliten-Konzentrationen eines Genotyps.

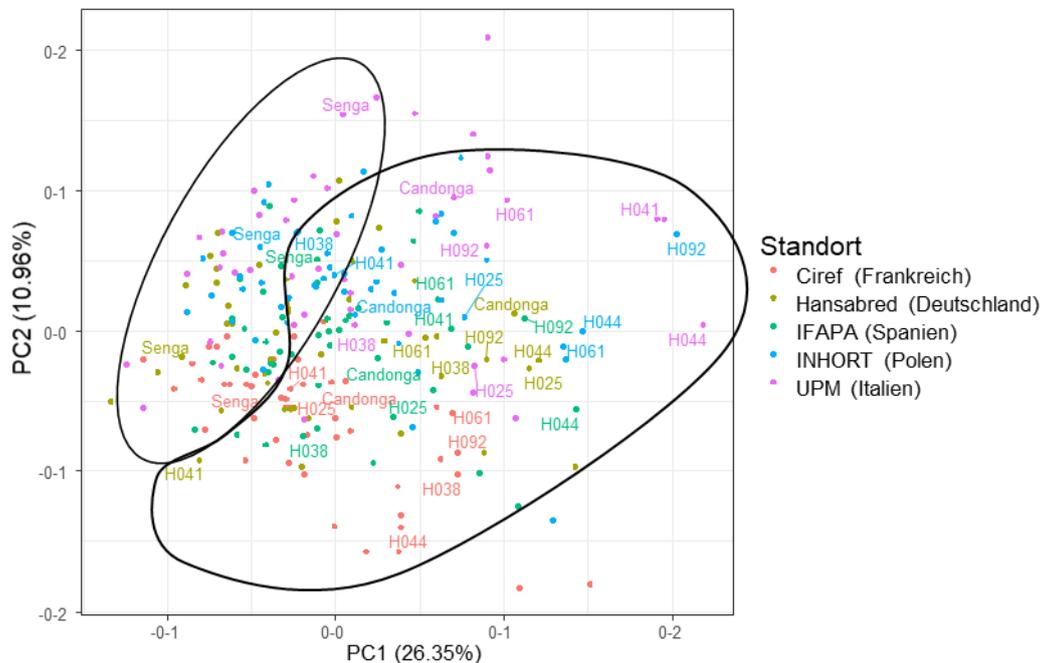


Abbildung 25: PCA der Metabolitengehalte verschiedener Genotypen ($n=48$) einschließlich der Elternlinien 'Senga Sengana' und 'Candonga' der GoodBerry-Kreuzungspopulation des Erntejahres 2018 (Datenset 18). Bei den Genotypen H025, H038, H041, H044, H061 und H092 handelt es sich um Inzuchtlinien von 'Candonga'. Die Punkte repräsentieren die verschiedenen Genotypen, die Farben die verschiedenen Standorte.

3.2.2.1.1. Genotypeneffekte

Um den Einfluss des Genotyps genauer zu betrachten wurden die aus allen Standorten gemittelten Metabolitenkonzentrationen betrachtet. Falls nicht explizit erwähnt, beziehen sich die Angaben auf das Datenset 18, das die Metabolitengehalte von 48 Genotypen enthält, die 2018 geerntet wurden. Die gemittelten Metabolitengehalte über alle Standorte wurden als Heatmap dargestellt (Abbildung 27). Hohe Konzentrationen der jeweiligen Metaboliten in den einzelnen Genotypen sind hier in roter Farbe ($> 50\%$ der höchsten relativen Konzentration) angegeben und niedrige Gehalte in blauer Farbe ($< 50\%$ der relativen Konzentration).

Besonders hohe Flavanolgehalte waren in den Genotypen H024, H044, H091 und H118 vorzufinden. Bezüglich der hohen Flavanolgehalte gab es jedoch eine Ausnahme, die die Ernte im Jahr 2017 betrifft. In Italien wiesen in diesem Jahr potenziell Flavanol-reiche Genotypen nur noch durchschnittliche Konzentrationen auf (Anhang Abbildung 4). Bei H044 handelt es sich um eine Inzuchtlinie von 'Candonga'. Interessanterweise zeigte 'Candonga' stets hohe Flavanolgehalte, während 'Senga Sengana' niedrigere Flavanol-Konzentrationen

3. Ergebnisse

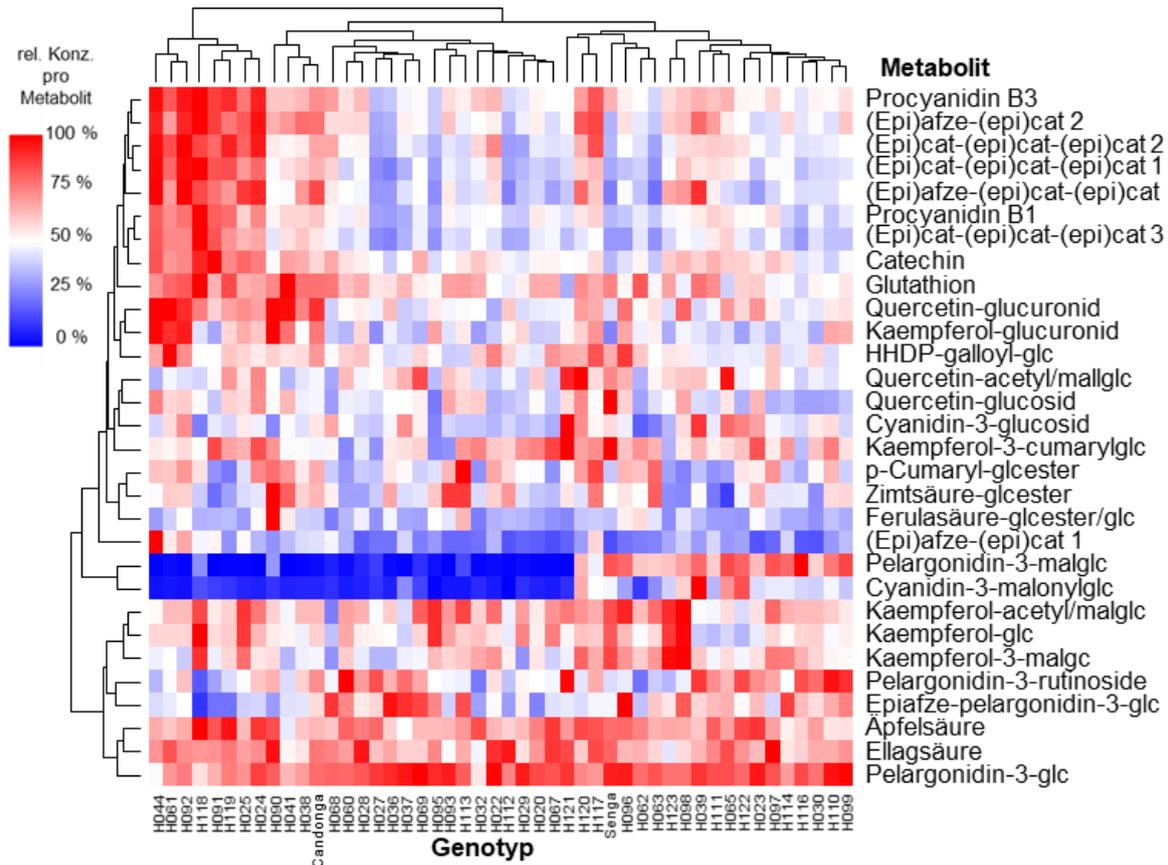


Abbildung 26: Heatmap der mittleren relativen Metabolitengehalte über alle Standorte, von 48 Genotypen, die 2018 geerntet wurden (Datenset 18). 100 % entspricht der höchsten relativen Konzentration eines Analyten im Datenset, 0 % entspricht 0 % dieses Wertes.

aufwies. Niedrige Gehalte waren darüber hinaus auch stets bei H027, H036 und H063 zu finden.

Auch die Phenylpropanoide wurden in den Genotypen oft in ähnlichen Mengen gefunden. H090 und H113 hatten stets hohe Gehalte sowohl an p-Cumaryl-glucoseester, Zimtsäure-glucoseester als auch an Ferulasäure-glucoseester/glucosid. Im Gegensatz zu den Flavanolen konnte hier jedoch bei den Eltern keine große durchgehende Differenz im Gehalt der Phenylpropanoide beobachtet werden.

Darüber hinaus gab es innerhalb der Flavonole und der Anthocyane auch für einzelne Genotypen Extremwerte. Die Tendenz dazu konnten jedoch im Gegensatz zu den schon erwähnten Stoffgruppen nicht auf die gesamte Flavonoid-Gruppe, sondern nur auf einzelne Metaboliten bzw. Metaboliten-Paare bezogen werden. H041, H044, H061, H090, H092 und 'Candonga' waren die sechs Genotypen mit den höchsten Gehalten an Kaempferol-glucuronid, aber auch an Quercetin-glucuronid. 'Senga Sengana' wies hingegen immer sehr niedrige Konzentrationen beider Metaboliten auf. Mit Ausnahme von H090 handelt es sich bei den H-Linien mit hohen Gehalten um Inzuchtlinien von 'Candonga'. Bezüglich Quercetin-acetyl/malonylglucosid und Kaempferol-acetyl/malonylglucosid wies H068 für beide Metaboliten im Mittel stets die niedrigsten Konzentrationen auf. Einer der am stärksten

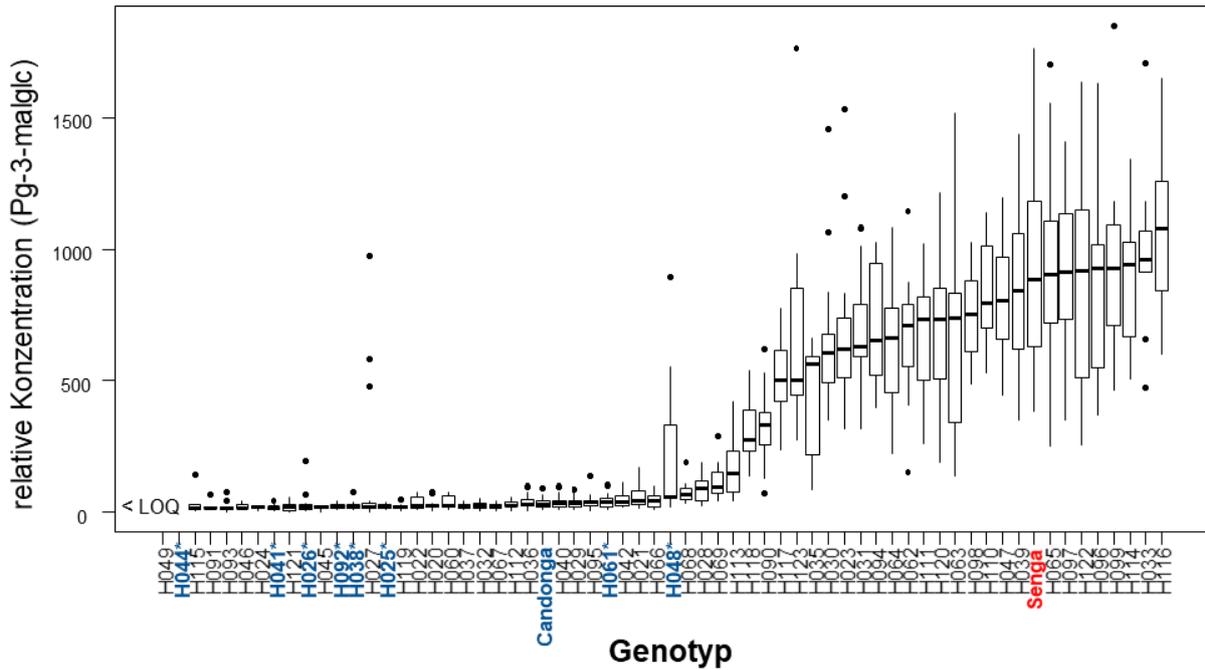


Abbildung 27: Boxplots der Pelargonidin-3-malonylglucosid Gehalte der Genotypen der GoodBerry-Population im Jahr 2018. Werte für die einzelnen Genotypen wurde über alle Standorte gemittelt; * = 'Candonga'-Inzuchtlinien und 'Candonga' sind in blau dargestellt. Senga Sengana (Senga) ist rot dargestellt. Zwei Genotypen haben Konzentrationen unter der Bestimmungsgrenze (LOQ).

sichtbaren Genotypen-Effekte betraf jedoch die Anthocyane, und zwar spezifisch die malonylierten Anthocyane Pelargonidin-3-malonylglucosid (Abbildung 27) und Cyanidin-3-malonylglucosid. Analog der französischen Kreuzungspopulation gab es auch hier Genotypen mit Konzentrationen unter der Bestimmungsgrenze (LOQ (Pelargonidin-3-malonylglucosid) = 10 ppm Equ. IS/ LOQ (Cyanidin-3-malonylglucosid) = 2 ppm Equ. IS). Der Unterschied zur französischen Kreuzungspopulation besteht jedoch in einer deutlich höheren Varianz auf Grund von auch deutlich höheren Konzentrationen innerhalb der Population.

Der höchste mittlere Gehalt an Pelargonidin-3-malonylglucosid betrug 1085 ± 156 ppm Equ. IS und der jeweilige Cyanidin-3-malonylglucosid-Gehalt war $116,6 \pm 17,1$ ppm Equ. IS. Ausgehend von der Bestimmungsgrenze bedeutet das einen Faktor von über 100 für Pelargonidin-3-malonylglucosid und von über 50 für Cyanidin-3-malonylglucosid zwischen dem Genotyp mit dem höchsten und niedrigsten Gehalt. Beim Betrachten der Verteilung der Pelargonidin-3-malonylglucosid-Konzentrationen in den Genotypen mittels eines Histogramms fiel eine Auftrennung in zwei Konzentrationspeaks auf (Abbildung 28). Im niedrigen Konzentrationsbereich befand sich 'Candonga' mit $37,5 \pm 17,2$ ppm Equ. IS, während 'Senga Sengana' mit 903 ± 246 ppm Equ. IS im hohen Konzentrationsbereich zu finden

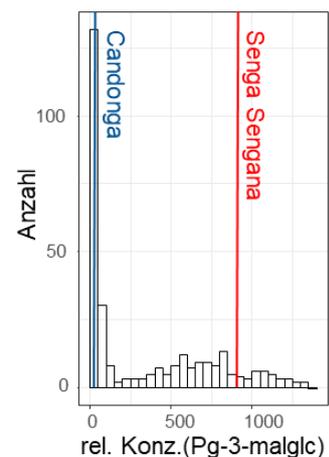


Abbildung 28: Histogramm der Pelargonidin-3-malonylglucosid-Konzentrationen der Genotypen der GoodBerry-Kreuzungspopulation im Erntejahr 2018 (Datenset 18). Gekennzeichnet sind die mittleren Konzentrationen der beiden Elternsorten.

war. Innerhalb der gesamten im Rahmen dieser Arbeit analysierten GoodBerry-Population konnte für 37 Genotypen, inklusive 'Candongga' und der 'Candongga'-Inzuchtlinien festgestellt werden, dass diese niedrige Gehalte an den malonylierten Anthocyanen in ihren Früchten enthielten (rel. Konz. an Pelargonidin-malonylglucosid < 200 ppm Equ. IS). 26 Genotypen inklusive 'Senga Sengana' zeigten höhere Gehalte an den malonylierten Anthocyanen. Abzüglich der 'Candongga'-Inzuchtlinien und der Eltern ergibt sich eine Aufspaltung der Kreuzungspopulation in 28:26. Also eine Aufspaltung von annähernd 1:1.

Auch für die anderen Anthocyane ließ sich eine Genotypen-Abhängigkeit feststellen, jedoch war diese bei Weitem nicht so stark ausgeprägt wie bei den malonylierten Anthocyanen. Im Fall von Pelargonidin-rutinosid betrug die höchste mittlere Konzentration 602 ± 168 ppm Equ. IS (H060) und die niedrigste 112 ± 43 ppm Equ. IS (H118). Der niedrigste relative Unterschied (Faktor 2) innerhalb der Anthocyane konnte bei Pelargonidin-3-glucosid festgestellt werden. Dies betraf die Genotypen H069 (2140 ± 233 ppm Equ. IS) und H044 (1054 ± 141 ppm Equ. IS), eine 'Candongga'-Inzuchtlinie. 'Candongga' akkumulierte verhältnismäßig niedrige Gehalte an Pelargonidin-3-glucosid während 'Senga Sengana' höhere Gehalt an Pelargonidin-3-glucosid enthielt.

3.2.2.1.2. Umwelteffekte

Da das Datenset 17/18 die Ernte der Erdbeerfrüchte zweier Ernteperioden eines Standorts umfasste, konnten mit Hilfe dieses Datensets die Umwelteffekte auf die Metabolitengehalte

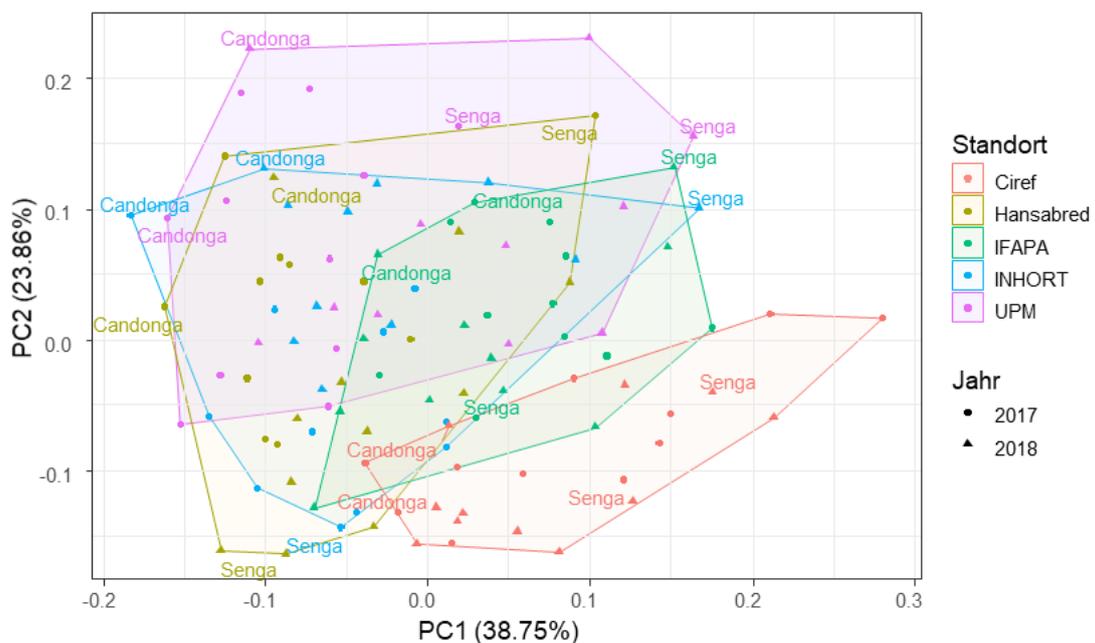


Abbildung 29: PCA der Flavonolgehalte einzelner Genotypen der GoodBerry-Kreuzungspopulation der Erntejahre 2017 und 2018 (Datenset 17/18). Die Punkte repräsentieren die verschiedenen Genotypen, die Farben die verschiedenen Standorte und die Symbole die beiden Jahre. Die Genotypen gruppieren sich aufgrund ihrer Flavonolgehalte zu den entsprechenden Standorten.

3. Ergebnisse

ermittelt werden. Bei der PCA-Analyse war eine deutliche Trennung der Proben nach Standort jedoch nur für die Flavonole zu sehen (Abbildung 29). In ihren Flavonolgehalten unterschieden sich vor allem die Genotypen die bei Ciref (Frankreich) bzw. bei INHORT (Polen) geerntet wurden. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Konzentration der Flavonole stark von der Umwelt beeinflusst wurde.

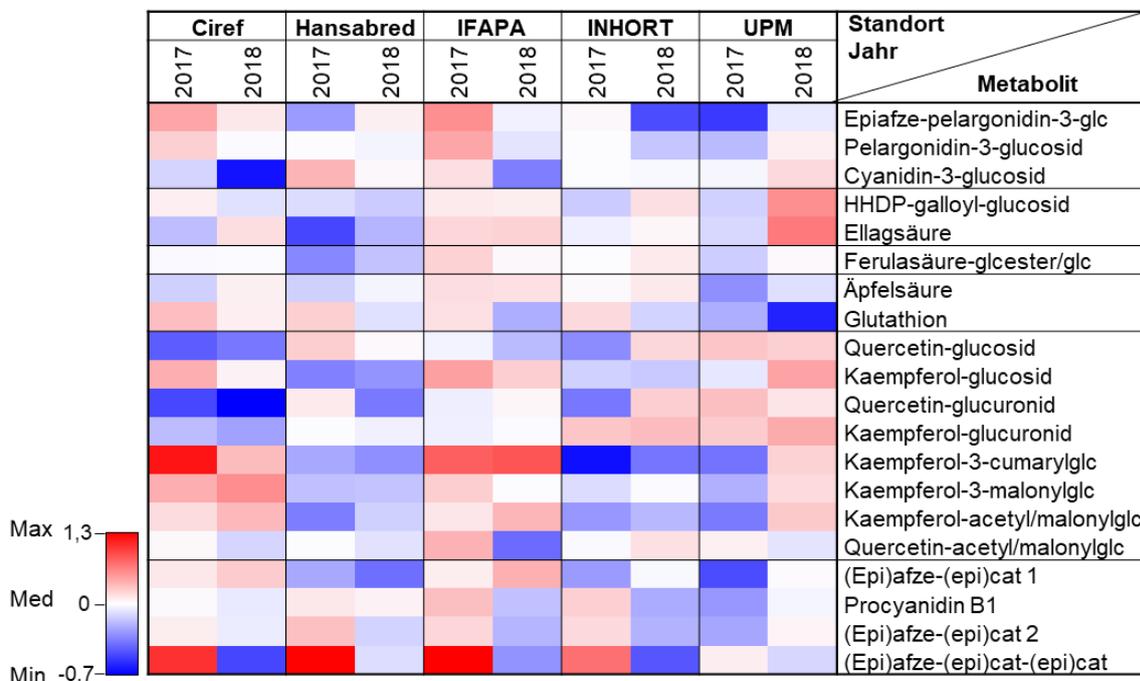


Abbildung 30: Heatmap der relativen Metabolitenkonzentration ausgewählter Genotypen an den einzelnen Standorten der Erntejahre 2017 und 2018 im Vergleich zum Gesamtmedian aller Proben (Datenset 17/18). Für jedes Erntejahr und jeden Standort wurde der Median der Metabolitengehalte über alle Genotypen bestimmt. Dargestellt sind nur die Metabolitengehalte mit signifikanten Unterschieden zwischen den Erntesets (Kruskal-Wallis $p \leq 0,05$).

Für die detailliertere Auswertung wurden die mittleren Metabolitgehalte aller Genotypen an einem Standort getrennt nach Erntejahr betrachtet (Abbildung 30). Dabei konnte erneut der Einfluss des Standorts auf die Gehalte der Flavonole bestätigt werden, da sich die Konzentrationen dieser Metaboliten in den Früchten stark zwischen den Standorten unterschied. So enthielten die Genotypen, die bei Ciref geerntet wurden, niedrige Gehalte an Quercetin-glucosid in beiden Erntejahren, während die Konzentrationen dieses Metabolits in Italien (UPM) stets signifikant höher waren (Abbildung 32). Ein gleiches Verhalten zeigte sich auch für Quercetin-glucuronid. Beide Metaboliten lagen in Früchten, die 2017 in Polen (INHORT) geerntet wurden in höheren Konzentrationen vor als 2018. Kaempferol-glucuronid ähnelte Quercetin-glucosid und Quercetin-glucuronid. In Polen waren in diesem Fall die Konzentrationen stets erhöht und wichen in beiden Erntejahren nicht stark voneinander ab. Bzgl. des Standorteffektes wiesen Kaempferol-glucosid (Abbildung 31), Kaempferol-malonylglucosid, Kaempferol-acetyl/malonylglucosid und Kaempferol-cumarylglucosid ein ähnliches Verhalten auf. Diese Metaboliten zeigten im Gegensatz zu Kaempferol-glucuronid, Quercetin-glucosid und Quercetin-glucuronid in den Erdbeerfrüchten aus Frankreich erhöhte

3. Ergebnisse

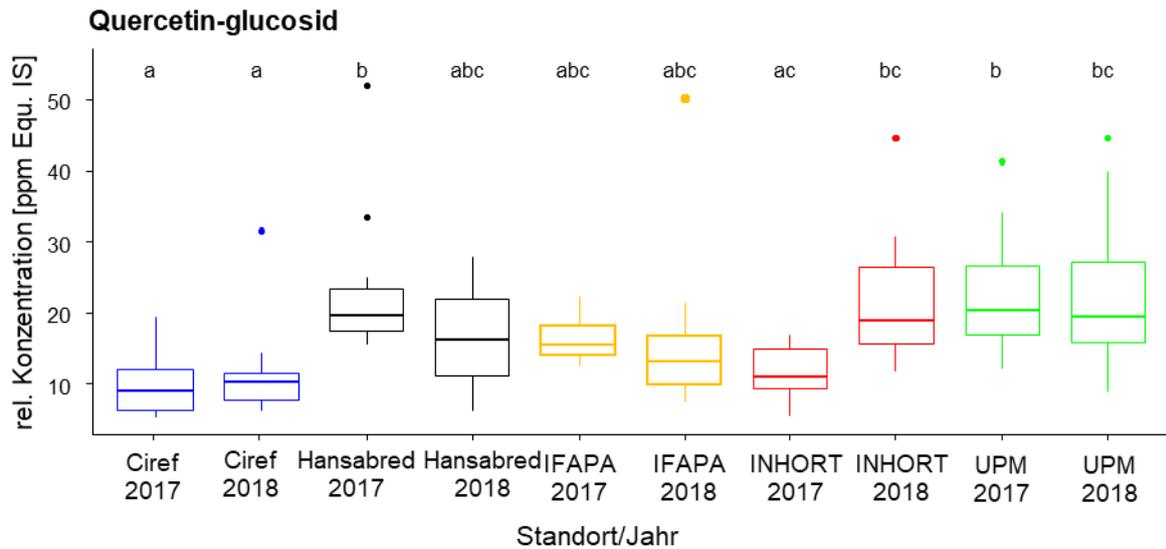


Abbildung 32: Gehalte an Quercetin-glucosid ausgewählter Genotypen anhängig von Standort und Erntejahr (Datenset 17/18). Die Buchstaben (a-c) symbolisieren signifikante Unterschiede (Dunn-Bonferroni-Test, $p \leq 0,05$). Die Farben repräsentieren unterschiedliche Standorte.

Konzentrationen. In Früchten, die in Spanien (IFAPA) geerntet wurden war die Konzentration, insbesondere für Kaempferol-cumarylglucosid erhöht. In Deutschland (Hansabred) und Polen (INHORT) waren, im Gegensatz dazu die Konzentrationen von Kaempferol-glucosid (Abbildung 31), Kaempferol-malonylglucosid, Kaempferol-acetyl/malonylglucosid und Kaempferol-cumarylglucosid erniedrigt. Früchte aus Italien (UPM) wiesen bezüglich der Konzentrationen dieser vier Analyten große Unterschiede zwischen beiden Erntejahren auf. Diese waren im Fall von Kaempferol-acetyl/malonylglucosid signifikant (Dunn-Bonferroni-Test, $p \leq 0,05$). Für Quercetin-acetyl/malonylglucosid gab es abgesehen von einem signifikanten Unterschied zwischen beiden Erntejahren in Spanien (IFAPA) keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Standorten.

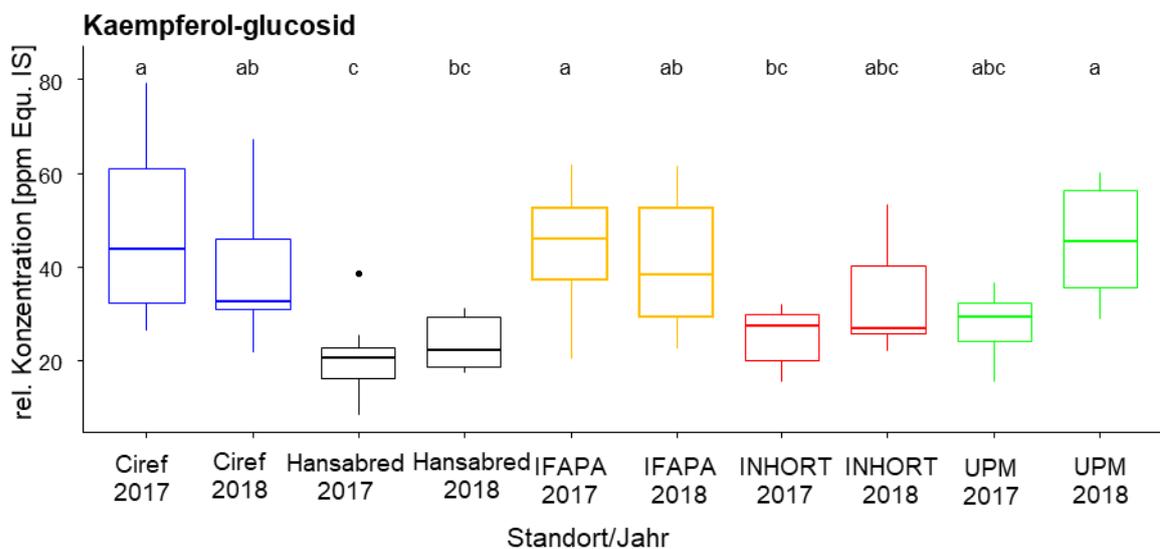


Abbildung 31: Gehalte an Kaempferol-glucosid ausgewählter Genotypen anhängig von Standort und Erntejahr (Datenset 17/18). Die Buchstaben (a-c) symbolisieren signifikante Unterschiede (Dunn-Bonferroni-Test, $p \leq 0,05$). Die Farben repräsentieren unterschiedliche Standorte.

Im Gegensatz zu den Flavonolen, war bei den Flavanolen kaum ein Unterschied zwischen den Standorten bzw. den Erntesets feststellbar (Abbildung 30). In Italien waren die Gehalte an den Flavanolen (Epi)afzelechin-(epi)catechin Dimer 1, (Epi)afzelechin-(epi)catechin Dimer 2 und Procyanidin B1 im ersten Erntejahr in den Früchten erniedrigt. Dies normalisierte sich im zweiten Erntejahr. In Deutschland konnte für (Epi)afzelechin-(epi)catechin Dimer 1 in beiden Erntejahren ein erniedrigtes Level in den Früchten festgestellt werden. Bezüglich (Epi)afzelechin-(epi)catechin-(epi)catechin fiel mit Ausnahme von Italien ein starker saisonaler Effekt auf. Davon abgesehen konnten bei fünf von neun analysierten Flavanolen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Erntesets festgestellt werden. Bei den Phenylpropanoiden wiesen in Deutschland (Hansabred) geerntete Früchte einen niedrigen Gehalt an Ferulasäure-glucoseester/glucosid auf. Bei dem Datenset 18 galt dies auch für alle anderen Phenylpropanoide. Bei dem Datenset 17/18 konnten bezüglich der p-Cumaryl-glucoseester und Zimtsäure-glucoseester-Gehalte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Standorten festgestellt werden.

Bezüglich der Anthocyane wurde in Früchten, die in Frankreich (Ciref) geerntet wurden tendenziell ein niedriger Gehalt an Cyanidin-3-glucosid nachgewiesen. Im Datenset 18 galt dies auch für Cyandin-3-malonylglucosid. Im Gegensatz dazu war der Gehalt an Epiafzelechin-pelargonidin-3-glucosid erhöht. Die Gehalte der Anthocyane wiesen an mehreren Standorten einen saisonalen Unterschied auf. Dies betraf beispielsweise die Gehalte an Cyanidin-3-glucosid, Epiafzelechin-pelargonidin-3-glucosid und Pelargonidin-3-glucosid in Spanien (IFAPA). Bei Pelargonidin-3-glucosid waren die Unterschiede signifikant.

In Früchten, die in Deutschland geerntet wurden, konnte ein im Vergleich zu dem Probenmedian stets erniedrigter Gehalt an HHDP-galloyl-glucosid und Ellagsäure nachgewiesen werden. In Italien waren die Konzentrationen beider Metaboliten in den Früchten im zweiten Erntejahr erhöht.

Die Standorteffekte im Datenset 17/18 waren in der Regel trotz der Inklusion vieler weiterer Genotypen der Population auch auf das komplette Datenset 18 übertragbar. Dies bestätigt die allgemeine Gültigkeit der oberen Aussagen bzgl. der Standorteffekte bzw. die Unabhängigkeit des Standorteffekts von dem einzelnen Genotyp.

3.2.2.2. Korrelationen

Wie unter 3.2.1 beschrieben, wurden die Korrelationen der Metabolitengehalte gemäß der Spearman-Methode in den Proben des Erntejahrs 2018 (Datensets 18) ermittelt. Es handelt sich bei den Metaboliten-Konzentrationen und auch bei dem Verhältnis der Metaboliten zueinander, nicht um ein starres System, sondern um ein dynamisches Netzwerk, dessen

3. Ergebnisse

Fluss auch von der Umwelt und dem Genotyp beeinflusst wird, wie unter 3.2.2.1 deutlich wird. Die Betrachtung der Metabolitenkonzentration-Korrelationen des gesamten Datensets 18 (Abbildung 33), spiegelt die über Genotypen und verschiedene Umwelteinflüsse hinweg am stärksten ausgeprägten Effekte wieder und steht nicht repräsentativ für den individuellen Genotyp, geprägt von einem Umweltsystem.

Trotz der erwähnten Dynamik zeigt sich für viele Metaboliten, dass diese sich unabhängig von Umwelt und Genotyp qualitativ gleich verhalten. Das bedeutet in diesem Fall, dass die Metabolitengehalte zueinander stets positiv oder stets negativ korrelieren. Eine positive Korrelation bedeutet, dass bei steigender oder sinkender Konzentration des einen Metaboliten, auch die Konzentration des zweiten Metaboliten dementsprechend steigt bzw. sinkt. Bei einer negativen Korrelation ist das Gegenteil der Fall. Steigt die Konzentration des einen Metaboliten, sinkt die des anderen und umgekehrt.

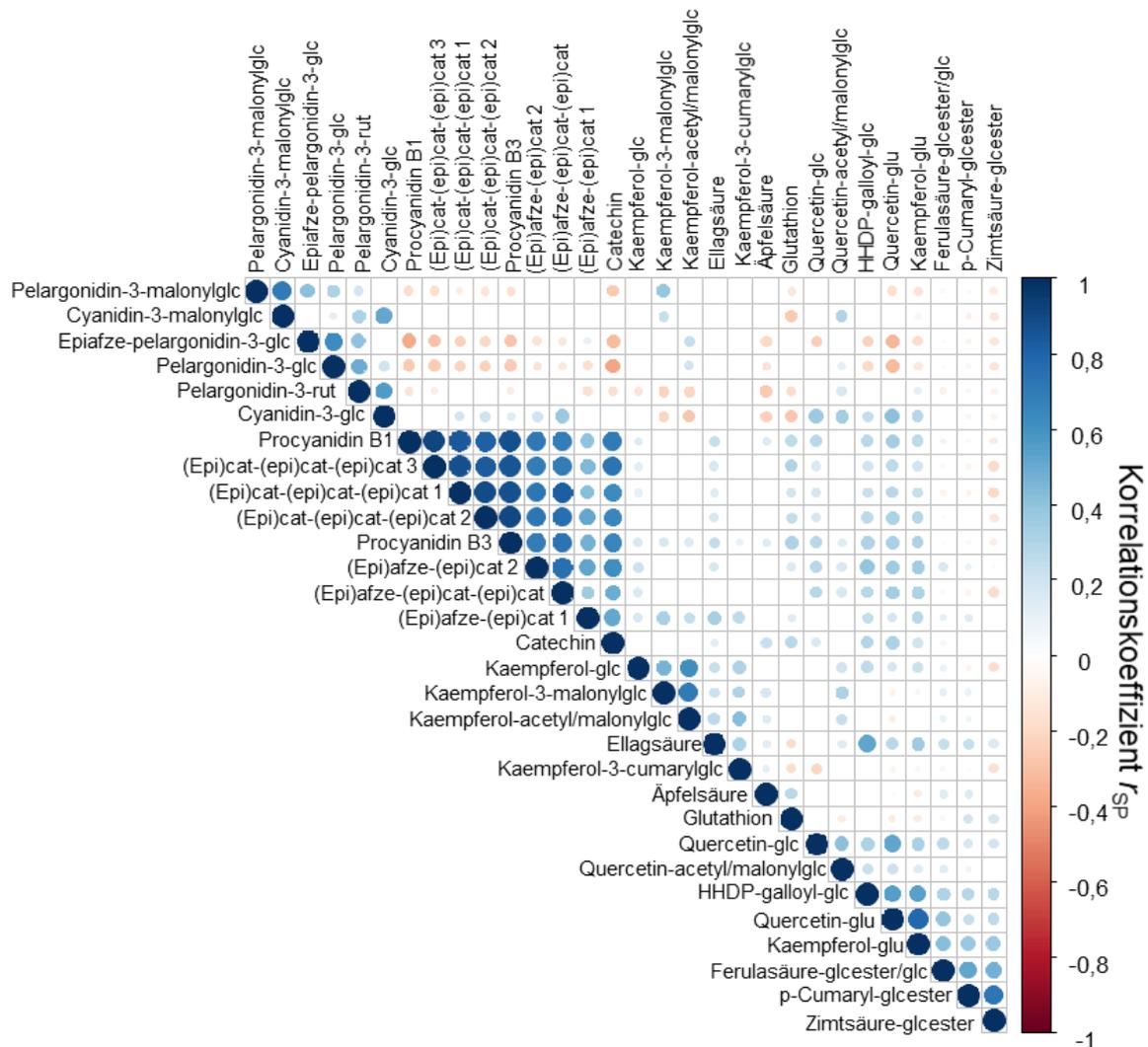


Abbildung 33: Korrelationsplot der Metabolitenkonzentrationen der GoodBerry-Population (Datenset 18). Die Punkte zeigen den Korrelationskoeffizienten r_{SP} zwischen zwei Metaboliten; rot = entgegengesetzte Korrelation, blau = direkte Korrelation. Je größer der Punkt und je dunkler die Farbe, desto stärker die jeweilige Korrelation. Weiß bedeutet keine signifikante Korrelation zwischen zwei Metaboliten ($p \geq 0,05$).

3. Ergebnisse

Tabelle 24: Korrelationen der Gehalte ausgewählter Metaboliten-Paare. Dargestellt werden die Korrelationskoeffizienten nach Spearman (Datenset 18). Für die Signifikanzen gilt *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,0$; ***: $p \leq 0,001$; rot = entgegengesetzte Korrelation, blau = direkte Korrelation. Je dunkler die Farbe, desto stärker die jeweilige Korrelation.

Vergleichspaar	INHORT	Hansabred	Ciref	IFAPA	UPM
Procyanidin B3/ Pelargonidin-3-glc	-0.42**	-0.32*	-0.25	-0.17	-0.35*
Procyanidin B3/ Pelargonidin-3-rut	-0.19	-0.25	-0.11	0.21	-0.23
Procyanidin B3/ Cyanidin-3-malonylglc	-0.05	-0.03	-0.09	0.1	0.16
Procyanidin B3/ Cyanidin-3-glc	0.03	0.14	0.02	0.37	0.39**
Catechin/ (Epi)afze-(epi)cat 1	0.71***	0.54***	0.64***	0.64***	0.65***
Catechin/ Procyanidin B1	0.8***	0.7***	0.79***	0.68***	0.82***
Catechin/ (Epi)cat-(epi)cat-(epi)cat 1	0.75***	0.71***	0.72***	0.71***	0.8***
Catechin/ (Epi)afze-(epi)cat-(epi)cat	0.69***	0.57***	0.51***	0.62***	0.67***
Procyanidin B3/ Kaempferol-glc	0.09	0.54***	-0.26	0.32*	0.41**
Kaempferol-cumarylglc/ Kaempferol-glc	0.07	0.23	0.02	-0.17*	0.23*

Eine besonders stark über alle Umwelteffekte und Genotypen hinweg ausgeprägte Metaboliten-Konzentrations-Korrelation bestand innerhalb der Flavanole (Abbildung 33, Anhang Abbildung 5). Unabhängig von Polymerisierungsgrad oder Monomer-Baustein zeigte sich eine sehr stark ausgeprägte Korrelation zueinander (Tabelle 24). Diese war auch bei den Genotypen-Effekten der GoodBerry-Population (vgl. 3.2.2.1.1) zu erkennen.

Auch innerhalb der Gehalte der Phenylpropanoide und der Gehalte der Anthocyane zeigte sich, wenn signifikant vorhanden, stets eine positive Korrelation. Die Quantität der Korrelation, sprich die Stärke, war jedoch insbesondere bei den Anthocyanen stark abhängig vom Genotyp und Umwelt. Generell galt, dass die Gehalte der Cyanidine gut miteinander und auch die Gehalte der Pelargonidine gut miteinander korrelierten. Es existierten jedoch auch Interaktionen zwischen den Gehalten der Pelargonidinen und Gehalten der Cyanidinen. Ein besonderes Beispiel sind die malonylierten Anthocyane Pelargonidin-3-malonylglucosid und Cyanidin-3-malonylglucosid, deren Gehalte unabhängig von Umwelteffekten über die Gesamtpopulation eine sehr starke Korrelation aufwiesen. Basis für diese Korrelation war, dass sich die Population, wie bereits unter 3.2.2.1.1 beschrieben, für Pelargonidin-3-malonylglucosid und analog für Cyanidin-3-malonylglucosid unabhängig von der Umwelt stets in zwei Genotypen-Gruppen einteilen ließ. Beim Betrachten der Korrelation der Konzentrationen der malonylierten Anthocyane mit ihren jeweiligen nicht malonylierten biosynthetischen Vorläufern Pelargonidin-3-glucosid bzw. Cyanidin-3-glucosid fiel auf, dass auch beide Verhältnisse quantitativ jeweils abhängig von der Genotypen-Gruppe (hohe bzw. niedrige Konzentration) in zwei Gruppen eingeteilt werden konnten (Abbildung 34 A). Die 'Candongga'-Gruppe (niedrige Konzentration, blau markiert) zeigte bei gleichen Gehalten an nicht malonyliertem Anthocyan eine niedrigere Konzentration an malonyliertem Anthocyan als die 'Senga Sengana'-Gruppe (hohe Konzentration, rot markiert). Die Malonylierung der

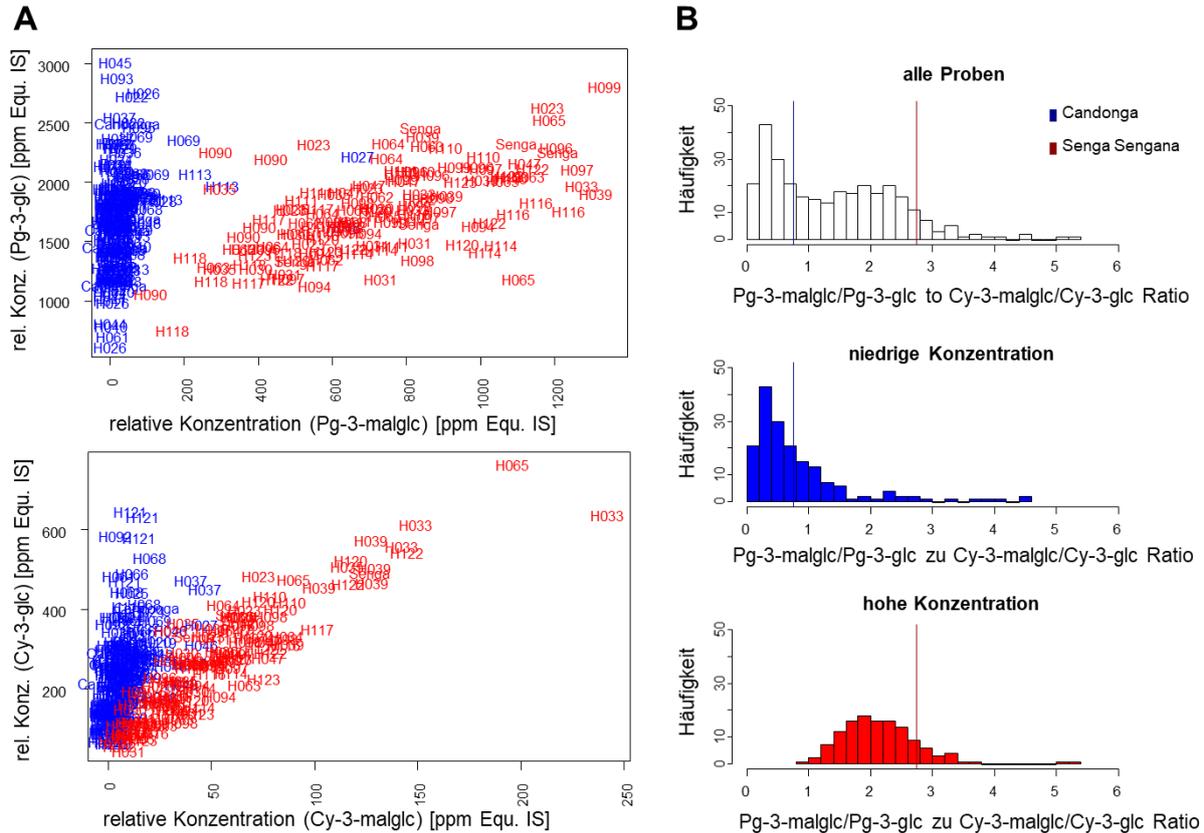


Abbildung 34: Korrelationen der Konzentrationen der Pelargonidin- und Cyanidin-Derivate der GoodBerry-Population – A: Korrelationsscatplot der Konzentrationen der malonylierten Anthocyane mit den nicht-malonylierten Anthocyanen. B: Histogramm der vergleichenden Umsetzungsraten zwischen den malonylierten und den nicht-malonylierten Anthocyanen; blau: 'Candonga'-Gruppe, rot: 'Senga Sengana'-Gruppe.

Anthocyane wird durch Malonyltransferasen katalysiert. Entsprechend sollte bei der 'Candonga'-Gruppe die enzymatische Aktivität niedriger sein als bei der 'Senga Sengana'-Gruppe. Durch Berechnung der Umsetzungsrate (Verhältnis malonyliertes zu nicht malonyliertem Anthocyan) und Vergleich der entsprechenden Werte des Pelargonidin-Paares mit denen des Cyanidin-Paares in Abhängigkeit von der Genotypen-Gruppe kann auf das Verhältnis der *in vivo* Aktivitäten zurückgeschlossen werden (Abbildung 34 B). Dabei fiel auf, dass die 'Senga Sengana'-Gruppe zu einer besseren Umsetzung von Pelargonidin-3-glucosid im Vergleich zu Cyanidin-3-glucosid tendierte als die 'Candonga'-Gruppe.

Davon abgesehen gab es auch Korrelationen zwischen den Konzentrationen verschiedener Metabolitengruppen. Die Anthocyanengehalte zeigten in Bezug auf die Flavanolgehalte kein einheitliches Verhalten. Insbesondere die Konzentrationen der Pelargonidin-Derivate wiesen eine negative Korrelation mit den Konzentrationen der Flavanele auf. Die Cyandin-3-glucosid-Gehalte zeigten vereinzelt jedoch auch signifikant positive Korrelationen mit den Flavanolgehalten. Davon abgesehen war unabhängig von der Umwelt stets eine positive Korrelation der Phenylpropanoidgehalte mit den Kaempferol-glucuronid-Gehalten zu erkennen. Dieses Interaktionsnetzwerk wird durch die stets signifikant ausgeprägte Korrelation der Konzentrationen von Kaempferol-glucuronid und Quercetin-glucuronid vervollständigt. Die

3. Ergebnisse

Gehalte an Ellagsäure und Glutathion korrelierten negativ miteinander. Die Gehalte an Ellagsäure und HHDP wiesen eine positive Korrelation auf. Bei HHDP und Glutathion war dies nicht der Fall.

Eine weitere deutliche Interaktionsgruppe innerhalb der Flavonole, die unabhängig von Umwelteffekten auftrat, waren Kaempferol-glucosid, Kaempferol-malonylglucosid, Kaempferol-acetyl/malonylglucosid und etwas schwächer miteingebunden Quercetin-acetyl/malonylglucosid. Im Allgemeinen korrelierten die Gehalte der Flavonole positiv miteinander, jedoch kehrte sich das Verhältnis zueinander an manchen Standorten sogar um. Ein Beispiel ist die Korrelation der Gehalte an Kaempferol-glucosid und Kaempferol-cumarylglucosid. In Erdbeeren, die in Spanien geerntet wurden, gab es eine signifikant negative Korrelation, in Erdbeeren aus Italien hingegen eine signifikant positive Korrelation (Tabelle 24). Die Ursache ist vermutlich der Einfluss der Umwelt, der sich, wie unter 3.2.2.1.2 dargelegt, besonders stark auf die Flavonole auswirkt. Als Konsequenz daraus resultierten qualitativ wechselnde Korrelationen der Flavonolgehalte mit den Gehalten anderer Metaboliten-Klassen. Allerdings blieb die Korrelation der Gehalte an Kaempferol-malonylglucosid mit den Gehalten beider malonylierten Anthocyanen unabhängig von der Umwelt stets positiv. Dies galt nicht für Kaempferol-acetyl/malonylglucosid und Quercetin-acetyl/malonylglucosid. Beim Betrachten der Korrelation der Gehalte an Kaempferol-malonylglucosid mit den Gehalten an Kaempferol-glucosid kann jedoch im Gegensatz zu den Anthocyanen (Abbildung 34 A) keine deutliche Abhängigkeit, von den durch die malonylierten Anthocyane festgelegten Genotypen-Gruppen identifiziert werden, obwohl auch hier Malonyltransferasen in die Stoffumwandlung involviert sein sollten. Bei genauerer Betrachtung lässt sich jedoch ein leichter Unterschied erkennen. Werden die jeweiligen linearen Regressionslinien der Korrelationsplots mit Ursprung im Nullpunkt miteinander verglichen, fällt ein etwas steilerer Anstieg, sprich eine etwas geringere Umsetzung für die 'Candonga'-Gruppe

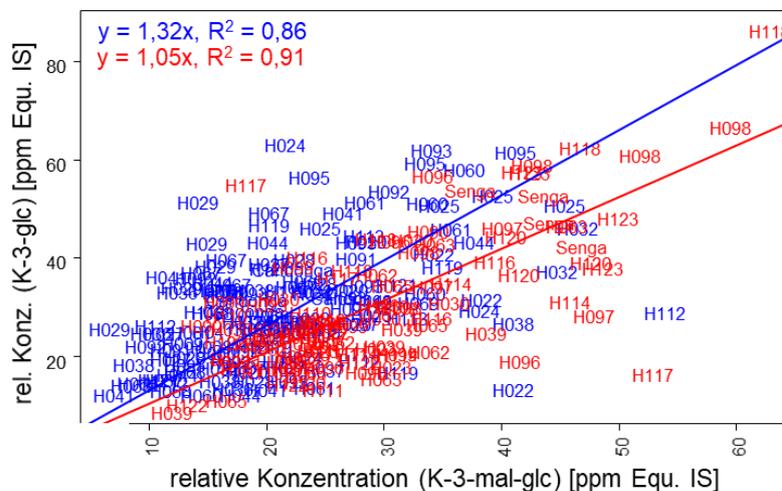


Abbildung 35: Korrelationsscatplot der Konzentrationen an Kaempferol-3-malonylglucosid und Kaempferol-3-glucosid der GoodBerry-Genotypen im Erntejahr 2018 (Datenset 18). Blau: 'Candonga' -Gruppe, rot: 'Senga Sengana'-Gruppe.

auf (Abbildung 35). Dies stimmt mit der geringeren Malonyltransferase-Aktivität der Anthocyane dieser Genotypen-Gruppe im Vergleich zur 'Senga Sengana'-Gruppe überein.

3.3. Allergengehalte der GoodBerry-Kreuzungspopulation 'Senga Sengana' x 'Candongga'

Von einem Subset (17 Genotypen) der GoodBerry-Population wurden mittels indirekt kompetitiven ELISA die Gehalte des Erdbeerallergens Fra a 1 bestimmt, um die Abhängigkeit des Allergengehaltes vom Genotyp der Kreuzungspopulation zu ermitteln.

3.3.1. Einfluss von Genotyp und Umwelt

Der Fra a 1 Gehalt der untersuchten Proben variierte in einem Bereich von ca. 0,86 bis 6,8 $\mu\text{g/g}$ Fra a 1. Die Genotypen wiesen mit Ausnahme von H112 und H037 signifikante Unterschiede der Gehalte zwischen den Standorten auf. Im Jahr 2018 waren die Konzentrationen an Fra a 1 im Schnitt in Italien (UPM) deutlich am niedrigsten (Abbildung 36). Auch zwischen den Erntejahren innerhalb eines Standorts resultierten Unterschiede (Abbildung 37). Signifikant waren diese jedoch nur bei 'Candongga', 'Senga Sengana' und H098 in Deutschland (Hansabred), sowie bei H110 in Polen (INHORT) (nach Dunn-Test, $p \leq 0,05$). Bei 'Candongga', 'Senga Sengana' und H098 zeigte sich in Deutschland ein Anstieg des Allergengehaltes im Jahr 2018 im Vergleich zum Vorjahr. Zusammen mit einem gleichgerichteten Trend der anderen zwei Genotypen, die auch in beiden Jahren beprobt werden konnten, resultierte daraus nach Wilcoxon ($p = 0,0079$) ein signifikanter Anstieg des Allergengehaltes in Deutschland (Abbildung 37).

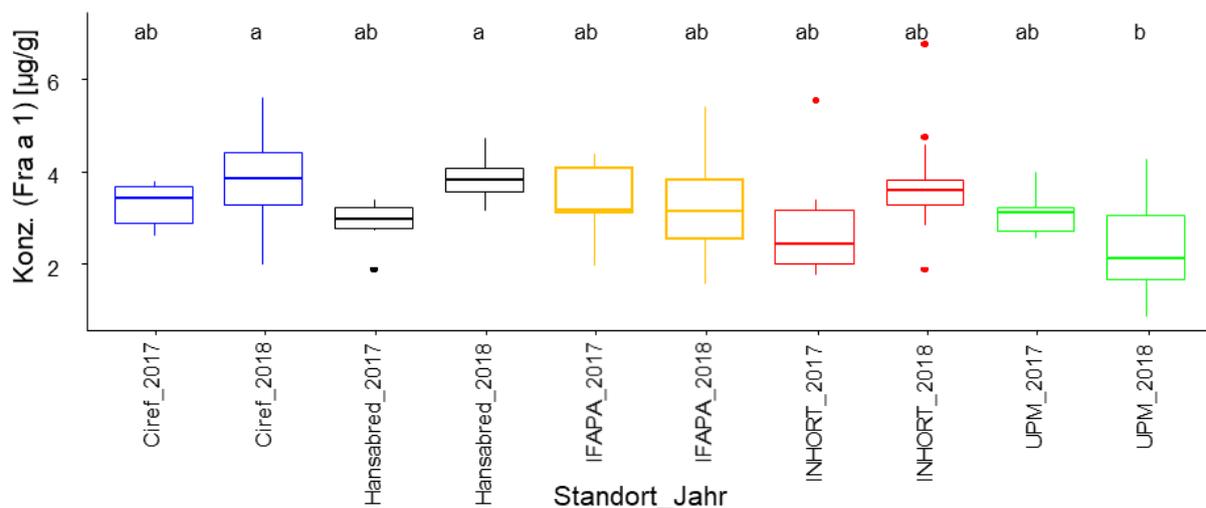


Abbildung 36: Boxplots der Allergengehalte ausgewählter Genotypen der Erntejahre 2017 und 2018 an den einzelnen Standorten (Datenset 17/18). Die Buchstaben (a-b) symbolisieren signifikante Unterschiede (Dunn-Bonferroni-Test, $p \leq 0,05$). Die Färbung der Boxplots ist abhängig vom Standort.

3. Ergebnisse

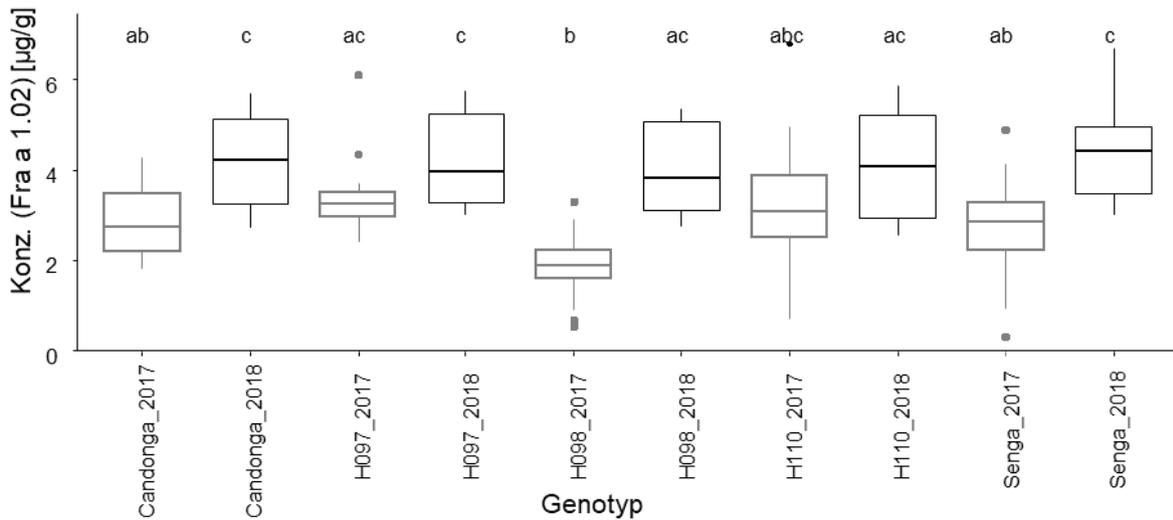


Abbildung 37: Boxplots der Allergengehalte ausgewählter Genotypen der Erntejahre 2017 und 2018 in Deutschland (Datenset 17/18). Die Buchstaben (a-b) symbolisieren signifikante Unterschiede (Dunn-Bonferroni-Test, $p \leq 0,05$). Die Färbung ist abhängig vom Erntejahr.

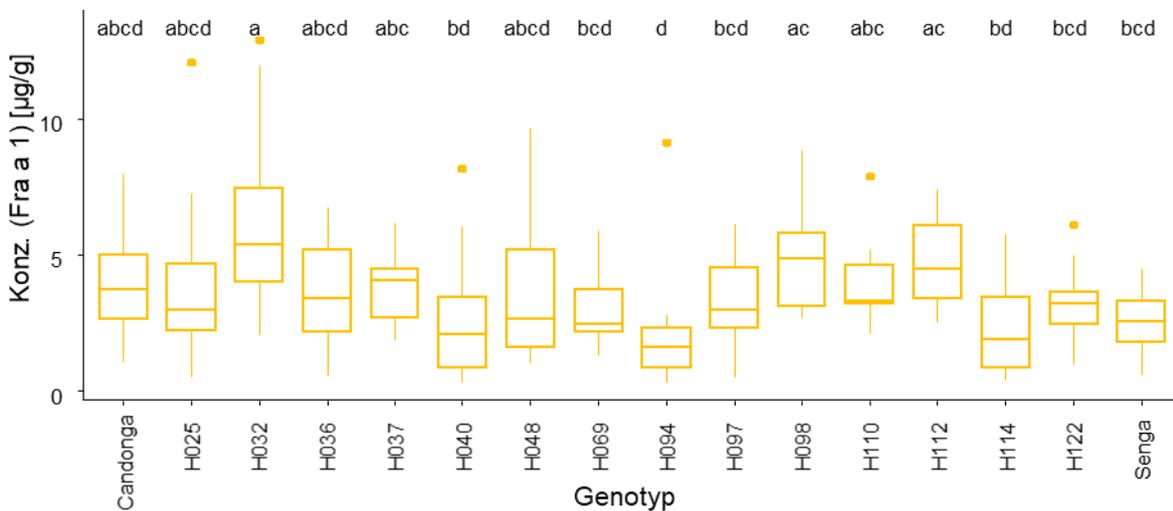


Abbildung 38: Boxplots der Allergengehalte der Genotypen im Erntejahr 2018 in Spanien (Datenset 18). Die Buchstaben (a-b) symbolisieren signifikante Unterschiede (Dunn-Bonferroni-Test, $p \leq 0,05$).

Überraschenderweise zeigten jedoch die Mediane der Allergengehalte der Genotypen über alle Standorte hinweg keine signifikanten Unterschiede (Anhang Abbildung 8), obwohl innerhalb eines Standortes Unterschiede zwischen den Genotypen feststellbar waren (Abbildung 38).

3.3.2. Korrelationen

Vorangegangene Studien konnten bereits eine Interaktion des Erdbeerallergens Fra a 1.02 mit Polyphenolen nachweisen (Muñoz et al. 2011; Muñoz et al. 2010; Casañal et al. 2013). Um diese innerhalb des vorliegenden Datensets zu untersuchen wurden gemäß Spearman die Korrelationen der quantifizierten Metabolitengehalte der Erdbeerfrüchte mit den Fra a 1 Gehalten separat für Datenset 17/18 (saisonalen Effekt) und Datenset 18 (mehr Genotypen und Datenpunkte, höhere Sensitivität) bestimmt.

3. Ergebnisse

Nur zwischen wenigen der 30 untersuchten Metaboliten wiesen die Allergengehalte eine signifikante Korrelation auf (Tabelle 25). Bei Datenset 18 umfasste das sechs Metaboliten, bei Datenset 17/18 zwei Metaboliten.

Tabelle 25: Korrelationen der Gehalte an Fra a 1 mit ausgewählten mittels LC-MS quantifizierten Metaboliten des Datenset 17/18 und 18. Dargestellt werden die Korrelationskoeffizienten nach Spearman (r_{SP}). Für die Signifikanzen gilt *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,0$; ***: $p \leq 0,001$. Rot: negative Korrelation, blau: positive Korrelation. Je intensiver die Farbe desto stärker ist die Korrelation.

Korrelationspartner	Datenset 17/18	Datenset 18
Epiatze-pelargonidin-3-glc	0,11	-0,17
Pelargonidin-3-malonylglc	-0,13	-0,28*
Pelargonidin-3-glc	-0,02	-0,08
Pelargonidin-3-rut	0,1	-0,08
Cyanidin-3-malonylglc	-0,38*	-0,39**
Cyanidin-3-glc	-0,24	-0,22*
Zimtsäure-glc ester	0,00	0,19*
Glutathion	0,22*	0,33**
Kaempferol-3-malonylglc	-0,06	-0,02
Quercetin-glu	-0,19	-0,06
(Epi)atze-(epi)cat 2	-0,07	-0,36*
(Epi)atze-(epi)cat 1	0,13	-0,23

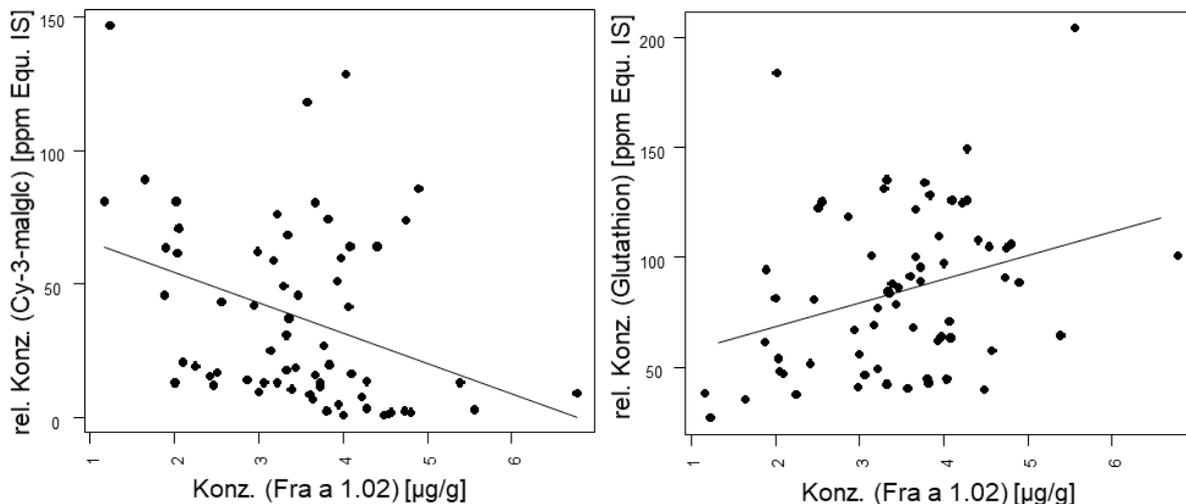


Abbildung 39: Korrelationsscatterplots der Gehalte an Fra a 1 und Cyanidin-3-glucosid bzw. Glutathion verschiedener Genotypen im Erntejahr 2018 (Datenset 18)

Für die Konzentrationen der beiden Metaboliten des Datensets 17/18, Cyanidin-3-malonylglycosid und Glutathion, konnte auch in Datenset 18 eine Korrelation mit dem Allergengehalt nachgewiesen werden. Der Cyanidin-3-malonylglycosid-Gehalt korrelierte stets negativ mit dem Gehalt an Fra a 1, der Gehalt an Glutathion korrelierte stets positiv mit dem Gehalt an Fra a 1 (Abbildung 39). Die vier zusätzlichen Metaboliten des Datensets 18, die mit dem Fra a 1-Gehalt korrelieren umfassen darüber hinaus Pelargonidin-3-malonylglycosid (negativ), Cyanidin-3-glucosid (negativ), Zimtsäure-glucoseester (positiv) und (Epi)atzelechin-(epi)catechin 2 (Tabelle 25). Bei Pelargonidin-3-malonylglycosid und

Cyanidin-3-glucosid konnte bereits im Datenset 17/18 eine Tendenz zu einer negativen Korrelation ihrer Konzentrationen festgestellt werden, jedoch ohne Signifikanz. Bei Zimtsäure-glucoseester und (Epi)afzelechin-(epi)catechin 2 zeigte sich in Datenset 17/18 keine Tendenz. Die Gehalte an (Epi)afzelechin-(epi)catechin 1 tendierte sogar zu einer gegensätzlichen Korrelation. Obwohl durch Casañal et al. 2013 bereits eine Bindung von Fra a 1-Homologen mit Flavonolen, wie dem hier untersuchten Quercetin-glucuronid, nachgewiesen werden konnte, wies bei den untersuchten Datensets keines der Flavonole eine signifikante Korrelation seiner Gehalte mit den Fra a 1-Gehalten auf.

3.4. Identifizierung von Anthocyan-Malonyltransferasen der Erdbeere

Die GoodBerry-Kreuzungspopulation konnte an Hand des jeweiligen Gehaltes an den malonylierten Anthocyanen Pelargonidin-3-malonylglucosid und Cyanidin-3-malonylglucosid in zwei Gruppen unterteilt werden. Sowohl die Gruppe mit einem niedrigen Gehalt an malonylierten Anthocyanen als auch die Gruppe mit einem hohen Gehalt wurde jeweils durch eine Elternsorte repräsentiert. Als Ursache dieser Segregation innerhalb der Kreuzungspopulation wurde eine unterschiedliche Malonyltransferase-Aktivität vermutet. Die Gen-Annotation des *Fragaria vesca* Genoms (v2.0.a1) beinhaltet potentielle Kandidaten-Gene für Malonyltransferasen (Tennessee et al. 2014). Um deren Bedeutung für die Malonylierung von Anthocyanen während der Erdbeerfruchtreifung abzuschätzen wurden zunächst die jeweiligen Transkriptlevel der Kandidatengene in verschiedenen *Fragaria vesca* Varietäten überprüft.

3.4.1. Genexpression in *Fragaria vesca*

Die Genexpressionsdaten der *Fragaria vesca* Varietäten 'Reine des Vallées', 'Yellow Wonder' und 'Hawaii 4' beruhen auf den Daten von Katja Härtl (Härtl et al. 2017).

Für zehn der vierzehn als potenzielle Anthocyan-Acylyltransferase annotierten Gene konnte eine Transkription in den reifen Früchten der *Fragaria vesca* Varietäten festgestellt werden (Abbildung 40). Das Zielgen sollte im Blütenboden exprimiert werden. Drei der zehn transkribierten Gene wiesen nur in den Nüsschen eine starke Transkription auf. Anthocyane werden erst am Ende der Fruchtreifung gebildet, weswegen für das Anthocyan-Malonyltransferase-Kandidaten-Gen eine Genexpression im reifen Fruchstadium zu erwarten ist. Für *Gen 29348* konnte weder in den Nüsschen noch im Blütenboden der reifen Frucht eine Genexpression festgestellt werden.

3. Ergebnisse

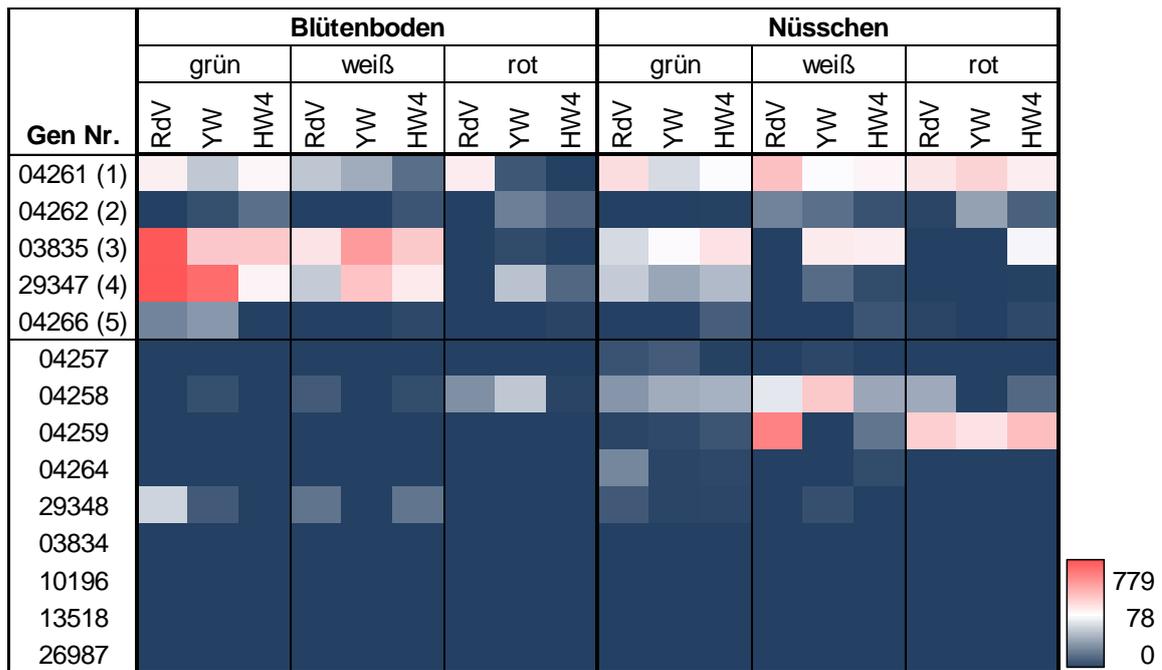


Abbildung 40: Heatmap der Transkriptgehalte vermuteter Malonyltransferase-Gene in *Fragaria vesca* Varietäten – Rdv: 'Reine des Vallées', YW: 'Yellow Wonder', HW4: 'Hawaii 4' (Daten von Härtl et al., 2017). Die Transkriptmengen sind als Anzahl der Transkripte pro Million kartierter Transkripte dargestellt. Minimum 0 in blau und Maximum 779 in rot.

Bei den sechs verbleibenden Anthocyan-Malonyltransferase-Kandidaten wiesen insbesondere *Gen 03835* und *Gen 29347* eine hohe Expression auf. Diese war insbesondere im grünen Fruchtstadium im Fruchtboden stark ausgeprägt und fiel während der Fruchtreifung ab. Auch bei den Achänen war eine Reduzierung der Genexpression von *Gen 03835* und *Gen 29347* im Laufe der Fruchtreifung zu erkennen. *Gen 04266* zeigte ein ähnliches Verhalten wie *Gen 03835* und *Gen 29347* jedoch mit einem deutlich geringeren Expressionslevel. *Gen 04261* wies im Blütenboden im Laufe der Fruchtreifung ein abfallendes Expressionsmuster auf. Die einzige Ausnahme ist ein Anstieg in 'Reine des Vallées' im reifen Fruchtstadium. In den Nüsschen wurde dieses Gen hingegen durchgehend exprimiert. *Gen 04262* wies in allen Varietäten eine relativ niedrige Expression auf. In 'Reine des Vallées' konnte diese überhaupt nur in den Nüsschen des weißen und roten Fruchtstadiums nachgewiesen werden. Beide anderen Varietäten zeigten eine reduzierte *Gen 04262* Expression im Blütenboden des weißen Fruchtstadiums und einen Anstieg in den Achänen im Laufe der Fruchtreifung.

Um die Ursache einer möglichen Segregation potenzieller Malonyltransferase-Gene innerhalb der Kreuzungspopulation zu eruieren, wurden die Malonyltransferase-Kandidaten-Gene *04261 (1)*, *04262 (2)*, *03835 (3)*, *29347 (4)* und *04266 (5)* der beiden Elternsorten 'Senga Sengana' (hoher Gehalt an malonylierten Anthocyanen) und 'Candongga' (niedriger Gehalt an malonylierten Anthocyanen) isoliert, in *E. coli* transferiert und die rekombinanten Proteine produziert.

3.4.2. Gen- und Proteinsequenzvergleich der Erdbeerkultivare

Alle aus der isolierten DNA der Elternsorten 'Senga Sengana' und 'Candongga' amplifizierten Kandidaten-Gene waren frei von Inserts, weswegen kein Exon-Trapping notwendig war und die DNA-Sequenzen folglich direkt in die jeweiligen Protein-Sequenzen translatiert werden konnten. Alle fünf Kandidatengene konnten mittels Primer, die anhand der *F. vesca* Sequenzen generiert worden waren, erfolgreich aus den Elternsorten isoliert werden. Es zeigten sich abhängig von den Kandidaten-Genen Unterschiede zwischen den aus 'Senga Sengana' und 'Candongga' isolierten Gen- und Proteinsequenzen (Tabelle 26 und Abbildung 41).

Tabelle 26: DNA- und Proteinsequenzübereinstimmung der FaMAT-Kandidaten

Gen Nr.	FaMAT	DNA-Sequenzidentität	Protein-Sequenzidentität	Unterschiede in der Proteinsequenz
04261	1	99,4 %	99,4 %	109: A_T; 243: -V; 291(290): A_G
04262	2	96,9 %	80,8 %*	Unterschied insbesondere zwischen 279-346; Stopp bei 'Senga Sengana' (375)
03835	3	100 %	100 %	keine
29347	4	98,4 %	97,9 %*	10 AS Wechsel inklusive eines Stopps (47) bei 'Senga Sengana'
04266	5	99,7 %	99,6 %	330: V_L; 348: V_I

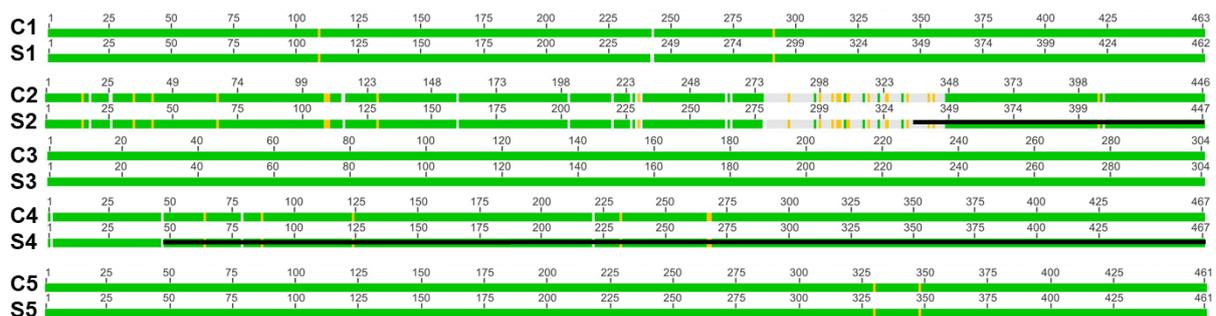


Abbildung 41: Proteinsequenz-Alignment der Malonyltransferase-Kandidaten FaMAT1 bis FaMAT5. C1 bis C5 und S1 bis S5 repräsentieren die jeweiligen allelischen Formen aus 'Candongga' bzw. 'Senga Sengana': grün – identisch, gelb – ähnlich, grau – nicht ähnlich, schwarz – kein codierter Bereich.

Die erhaltenen potenziellen Malonyltransferasen werden im Folgenden FaMAT1 bis FaMAT5 (Tabelle 6) genannt, wobei die Allele aus 'Candonga' mit 'C' (C1 bis C5) und aus 'Senga Sengana' mit 'S' (S1 bis S5) abgekürzt werden (Abbildung 43).

Bzgl. *Gen 04261 (FaMAT1)* konnten acht Basen-Unterschiede in der DNA Sequenz der Klone aus 'Candonga' und 'Senga Sengana' beobachtet werden. Diese umfassen 5 Basenwechsel und eine Insertion dreier Basen in der 'Candonga'-Sequenz. Bei drei der Punktmutationen handelt es sich jedoch um stille Mutationen, die keine Auswirkung auf die Translation bzw. die resultierende Proteinsequenz haben. Daneben zeigt der Vergleich der Proteinsequenzen von FaMATS1 und FaMATC1 den Wechsel von Alanin zu Threonin an der Position 109 und von Alanin zu Glycin an der Position 291 bzw. 290 in 'Senga Sengana', sowie eine Insertion von Valin an Position 243 in 'Candonga'.

In *Gen 04262 (FaMAT2)* konnte mit einer Gensequenzübereinstimmung von nur 96,9 % die geringste Ähnlichkeit zwischen den entsprechenden Allelen der beiden Kultivare beobachtet werden. Insgesamt existierten 14 Punktmutationen und Insertionen von 6 Basenpaaren in 'Senga Sengana'. Diese resultierten jedoch in über 70 Aminosäure (AS)-Wechsel und 3 Insertionen, wodurch sich eine Proteinsequenzhomologie von nur 80,8 % ergab. Zusätzlich führte eine Mutation in der Sequenz von 'Senga Sengana' auch zu der Einführung eines vorzeitigen Stopp-Codons bei Position 335, die eine Verkürzung des potenziellen Proteins um 25 % zu Folge hat (Abbildung 41). Da für dieses Protein von 'Senga Sengana' keine Aktivität zu erwarten war, wurde FaMATS2 in die weiteren Experimente nicht mehr einbezogen.

Im Gegensatz dazu konnte bei *Gen 03835 (FaMAT3)* in der Basensequenz und folglich auch in der Proteinsequenz kein Unterschied zwischen dem 'Candonga'- und dem 'Senga Sengana'-Allel festgestellt werden.

Bei *Gen 29347 (FaMAT4)* gab es 22 Punktmutationen in der DNA-Sequenz, die in einer Übereinstimmung von 98,4 % resultierten. Etwas mehr als die Hälfte der Mutationen hatten keine Auswirkungen auf die Proteinsequenz. 9 potenzielle AS-Wechsel konnten beobachtet werden. Die gravierendste Änderung betraf eine Punktmutation bei 'Senga Sengana' im Anfangsbereich der Sequenz (Position 47 von 407). Diese resultierte in einem Stopp-Codon. Da für das sich ergebende Polypeptid keine Aktivität zu erwarten war, wurde dieses ebenfalls bei den weiteren Experimenten nicht mitgeführt.

Vier Punktmutationen in *Gene 4266 (FaMAT5)* ergaben eine Sequenzhomologie auf DNA-Ebene von 99,7 %. Zwei der Mutationen resultierten in einen AS-Wechsel von Valin zu Leucin (AS 330) und Valin zu Isoleucin (AS 348) im 'Senga Sengana' Allel im Vergleich zu dem 'Candonga' Allel.

3.4.3. Aktivitäts-Assay

Acht der zehn Gene von denen zu erwarten war, dass sie potenzielle, aktive Malonyltransferasen kodieren, wurden in *E. coli* eingebracht, die rekombinanten Proteine produziert und mittels des Glutathion-Transferase (GST)-Tags des Fusionsproteins affinitätsgereinigt. In einem Aktivitäts-Assay wurden die aufgereinigten rekombinanten Proteine mit Acyl-Akzeptor-Substraten und Malonyl-CoA als Acyl-Donor bei pH 7 und 30 °C für 16 h inkubiert. Die Identität- und Reinheit der Proteine wurde zuvor mittels SDS-PAGE überprüft. Als Acyl-Akzeptor Substrat wurden die Anthocyane Pelargonidin-3-glucosid (Pg-3-glc) und Cyanidin-3-glucosid (Cy-3-glc), die Flavonole Kaempferol-3-glucosid (K-3-glc) und Quercetin-3-glucosid (Qu-3-glc), sowie Furaneol-glucosid (Fur-glc) getestet. Alle diese Verbindungen sind natürliche Metaboliten der Erdbeere, deren malonylierte Form bereits in der Erdbeere nachgewiesen werden konnte (Hanhineva et al. 2011; Roscher et al. 1996). Als Negativ-Kontrolle diente die pGEX-4T-1 bedingte Proteinexpression in *E. coli* BL21, die analog der FaMAT Kandidaten durchgeführt wurde. Da für keines der Produkte Referenzmaterial zur Verfügung stand, wurde für den quantitativen Vergleich der Enzymaktivitäten die relative Peakfläche betrachtet. Die Identität der Produkte wurde mittels Fragmentierungsmuster und Vergleich mit einem Erdbeerfruchtextrakt verifiziert. Die Quantifizierung der Produkte erfolgte mittels UV-Spektrum (Anthocyane: 520 nm/ Flavonolglucoside und Furaneolglucosid: 280 nm).

Drei der getesteten FaMAT-Kandidaten zeigten katalytische Aktivität mit den getesteten Substraten. Dabei handelt es sich um FaMATC1 und FaMATC4 aus 'Candonga', sowie FaMATS1 aus 'Senga Sengana'. Diese Enzyme zeigten Malonyltransferase-Aktivität in Bezug auf alle getesteten Acyl-Akzeptor-Substrate.

FaMATC4 zeigte sowohl für die Umsetzung von Pg-3-glc als auch von Cy-3-glc signifikant höhere Aktivitäten im Vergleich zu FaMATC1 als auch FaMATS1, wobei FaMATS1 katalytisch

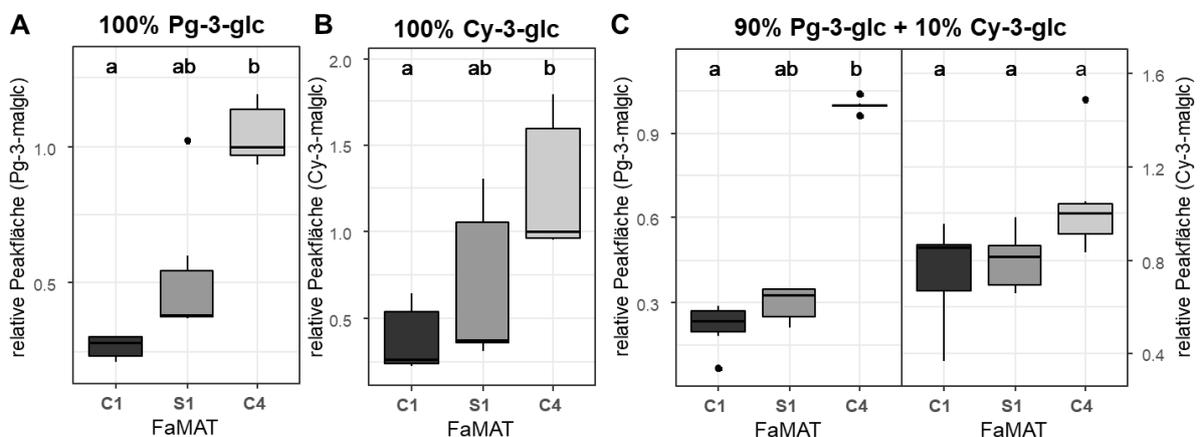


Abbildung 42: Relative Produktbildung der Malonyltransferasen aus Candonga (FaMATC1 und C4) sowie aus 'Senga Sengana' (FaMATS1). Als Akzeptorsubstrate dienten Anthocyane – A: Substrat Pg-3-glc (100%); B: Substrat Cy-3-glc (100%); C: Substrat Pg-3-glc (90%) und Cy-3-glc (10%). Buchstaben (a-b) symbolisieren signifikante Unterschiede (Dunn-Bonferroni-Test, $p \leq 0,05$). Dargestellt werden die relativen Peakflächen der Produkte bezogen auf den größten Peakflächen-Median eines Produkts.

3. Ergebnisse

aktiver war als FaMATC1 (Abbildung 42). Neben der Aktivität gegenüber einem Einzelsubstrat wurde für die Anthocyane auch die simultane Umsetzung der beiden Substrate getestet. Das Verhältnis von Pg-3-glc und Cy-3-glc wurde dem Verhältnis in der Erdbeerfrucht von ca. 9:1 nachempfunden (Lopes-da-Silva et al. 2007). Hier ergab sich erneut eine signifikant höhere Aktivität von FaMATC4 im Vergleich zu FaMATC1. FaMATS1 setzte im Vergleich zu FaMATC1 Pg-3-glc bevorzugt um, für Cy-3-glc konnte jedoch kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. FaMATC4 bildete mehr Cy-3-malglc. Ähnlich wie bei dem Metabolitenprofil der GoodBerry-Kreuzungspopulation wurde für die beiden Analyten-Gruppen das Verhältnis zueinander, basierend auf dem Produkt zu Edukt Quotienten, berechnet. Für FaMATC1 ergab sich ein Pg-3-malglc/Pg-3-glc zu Cy-3-malglc/Cy-3-glc Verhältnis von $0,106 \pm 0,035$, für FaMATS1 von $0,135 \pm 0,023$ und für FaMATC4 von $0,305 \pm 0,133$. Das bedeutet, dass Pg-3-glc im Vergleich zu Cy-3-glc mit FaMATC4 am besten umgesetzt wurde. FaMATC1 malonylierte mehr Cy-3-glc im Vergleich zu Pg-3-glc bei der simultanen Umsetzung.

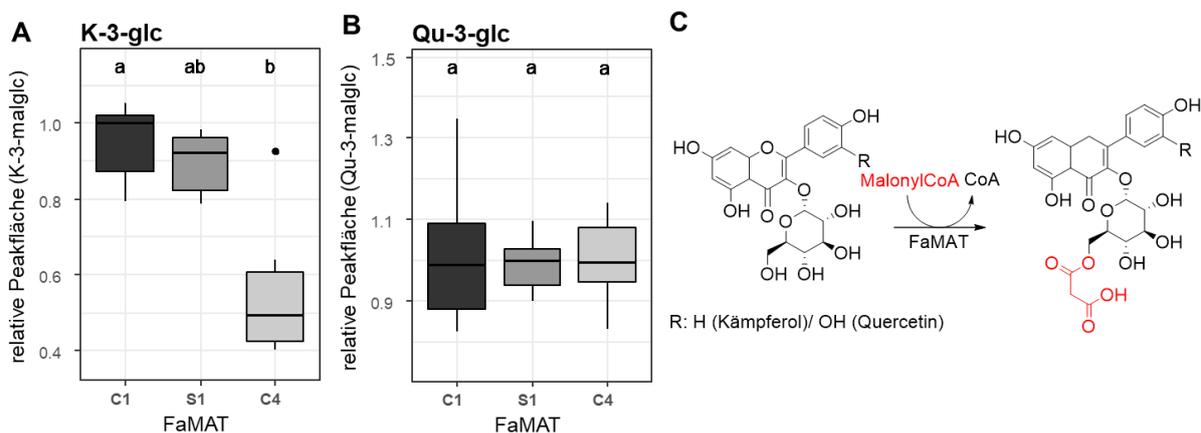


Abbildung 43: Relative Produktbildung der Malonyltransferasen aus 'Candonga' (FaMATC1 und C4) sowie aus 'Senga Sengana' (FaMATS1) mit Flavonolglucosiden – A: Produktgehalte bei Verwendung von K-3-glc als Substrat; B: Produktgehalte bei Verwendung von Qu-3-glc als Substrat. Die Buchstaben (a-b) symbolisieren signifikante Unterschiede (Dunn-Bonferroni-Test, $p \leq 0,05$). Dargestellt werden die relativen Peakflächen der Produkte bezogen auf den größten Flächen-Median eines Produkts (=1); C: postulierter Reaktionsmechanismus.

Neben den Anthocyanen wurden auch Flavonolglucoside als Akzeptorsubstrate der Malonyltransferasen verwendet. Im Gegensatz zu der hohen Umsetzungsrate bei den Anthocyanen zeigte FaMATC4 eine niedrige enzymatische Aktivität für K-3-glc im Vergleich mit den beiden anderen untersuchten Malonyltransferasen (Abbildung 43). FaMATC1 und FaMATS1 zeigten für K-3-glc ähnliche Aktivitäten. Qu-3-glc war das einzige getestete Substrat, das im Enzymassay mit allen drei FaMATs gleich gut umgesetzt wurde. Da das Edukt Qu-3-glc nach der Reaktion im Vergleich zur Leerkontrolle in etwa die Hälfte der Intensität aufwies, d.h. die Hälfte des Akzeptorsubstrates umgesetzt wurde und das Akzeptor- und Donor-Substrat anfänglich in einem 2:1 Verhältnis zugegeben wurden, ist in diesem Fall davon auszugehen, dass das gesamte Malonyl-CoA verbraucht wurde.

3. Ergebnisse

Weil Furaneol-malglc ein natürlicher Inhaltsstoff von Erdbeerfrüchten ist wurde Furaneolglucosid mit den Malonyltransferasen in Gegenwart von Malonyl-CoA inkubiert. Interessanterweise konnten bei den Assays mit Fur-glc nicht nur jeweils ein Peak, sondern drei Peaks als Produkte identifiziert werden. Beim Vergleich mit den MS-Spektrum eines Erdbeerfrucht-Extrakts wird deutlich, dass auch hier dasselbe drei-Peak Schema erkennbar ist (Abbildung 44 A). Alle drei Peaks zeigen im MS2-Spektrum den Übergang von m/z 377 zu m/z 129, was einer Abspaltung von Malonylglucose zu Furaneol entspricht und dadurch die Bildung von Fur-3-malglc verifiziert (Abbildung 44 B).

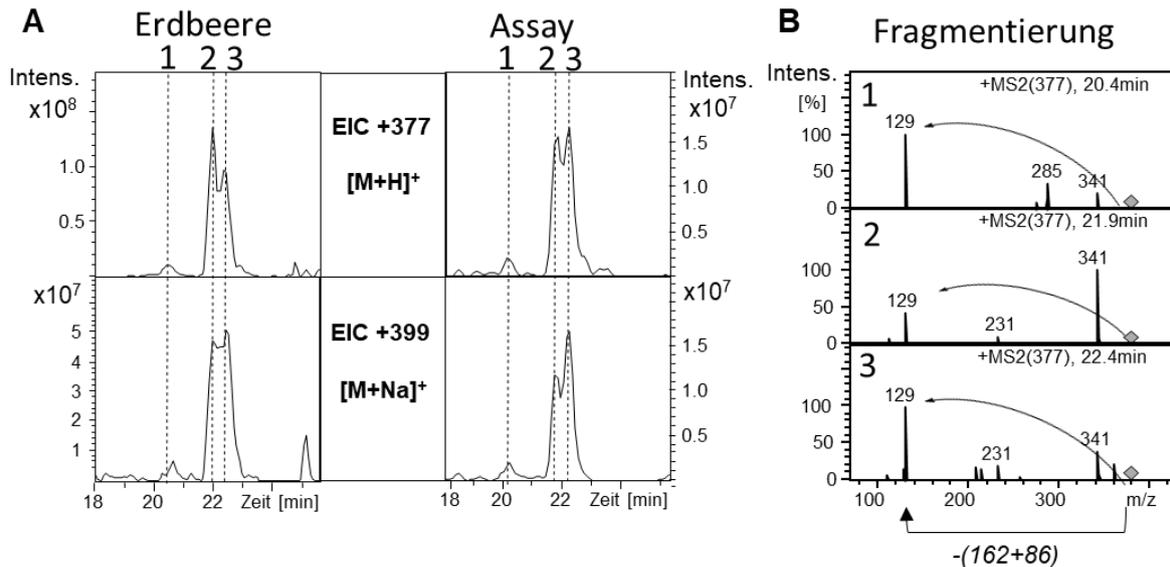


Abbildung 44: LC-MS-Analyse der Fur-glc Produkte des FaMAT-Assay und eines Erdbeerfruchtextraktes – A: Vergleich der LC-MS Spektren zwischen einem Erdbeerfruchtextrakt und dem Assay-Produkt; B: MS2-Spektrum von m/z 377 zeigt das Fragmentierungsmuster der Fur-glc Produkte.

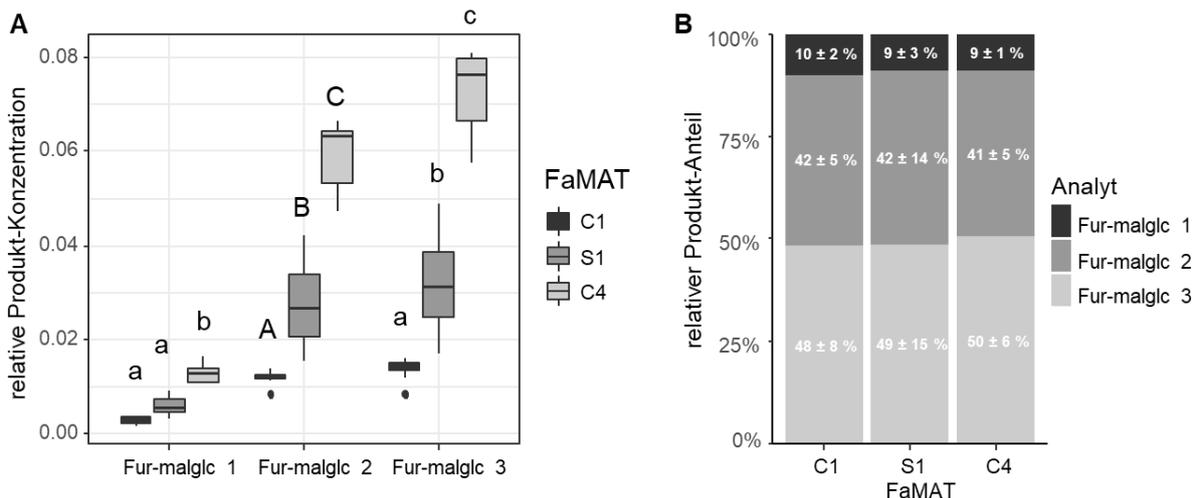


Abbildung 45: Relative Produktbildung der Malonyltransferasen aus 'Candonga' (FaMATC1 und C4), sowie aus 'Senga Sengana' (FaMATS1) mit Furaneolglucosid. – A: Relative Produktkonzentrationen; Buchstaben (a-c/A-C) symbolisieren signifikante Unterschiede (Dunn-Bonferroni-Test, $p \leq 0,05$); dargestellt wird die relative Umsetzungsrate in Bezug auf die eingesetzte Eduktmenge an Furaneol-glucosid (=1). B: relativer Produktanteil in Prozent.

FaMATC4 zeigte für alle drei Produkte eine signifikant höhere Bildungsrate als FaMATC1 und FaMATS1 (Abbildung 45 A). FaMATS1 bildete signifikant mehr Produkt 2 und 3 als FaMATC1.

Wird jedoch der relative Produktanteil der Reaktionen aller drei Enzyme betrachtet, wird deutlich, dass das Verhältnis der Produkte stets das gleiche ist (Abbildung 45 B). Den höchsten Produktanteil hat Produkt 3 mit ca. 49 %, gefolgt von Produkt 2 mit ca. 42 % und Produkt 1 mit ca. 9 %.

3.5. Sekundärmetabolitenprofil transgener Pflanzen

Um die biologische Funktion von Genen zu untersuchen werden in der reversen Genetik oft deren Transkriptgehalte verändert und die Auswirkungen auf den Phänotyp analysiert. Die Auswirkung der Herunterregulierung der Flavonol-Synthase und des Erdbeerallergens Fra a 1.02 auf die Metaboliten in der Erdbeerpflanze wurde in dieser Arbeit untersucht. Der Schwerpunkt lag dabei auf den Veränderungen der Sekundärmetaboliten.

3.5.1. siFLS-Pflanzen

Bei der Flavonol-Synthase (FLS) handelt es sich um ein Enzym der Polyphenolbiosynthese. Das Enzym katalysiert die Bildung von Flavonolen aus Dihydroflavonolen. Pflanzen der siFLS-Linie wurden in Dürnast (GHL) kultiviert. Die siFLS-Linie, bei der das Flavonol-Synthase-Gen herabreguliert worden war, wies im Vergleich zu der 'Senga Sengana'-Kontrolle keine äußerlichen Veränderungen des Phänotyps auf (Abbildung 47 und Abbildung 47), sowohl hinsichtlich der Blätter, der Blüten, der Früchte als auch der Wurzeln. Auch das Fruchtgewicht veränderte sich nicht durch die Herabregulierung der FLS-Expression.

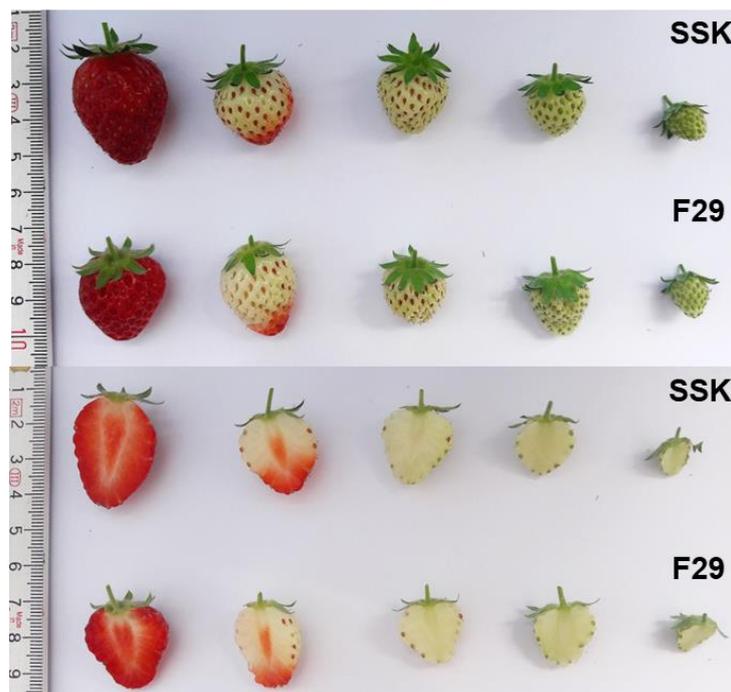


Abbildung 46: Phänotyp der siFLS-Linie (F29) und der Senga Sengana-Kontrolle (SSK); dargestellt sind die untersuchten fünf Fruchtstadien der Erdbeere (klein grün, groß grün, weiß, weiß/rot und rot) als ganze Frucht und im Querschnitt

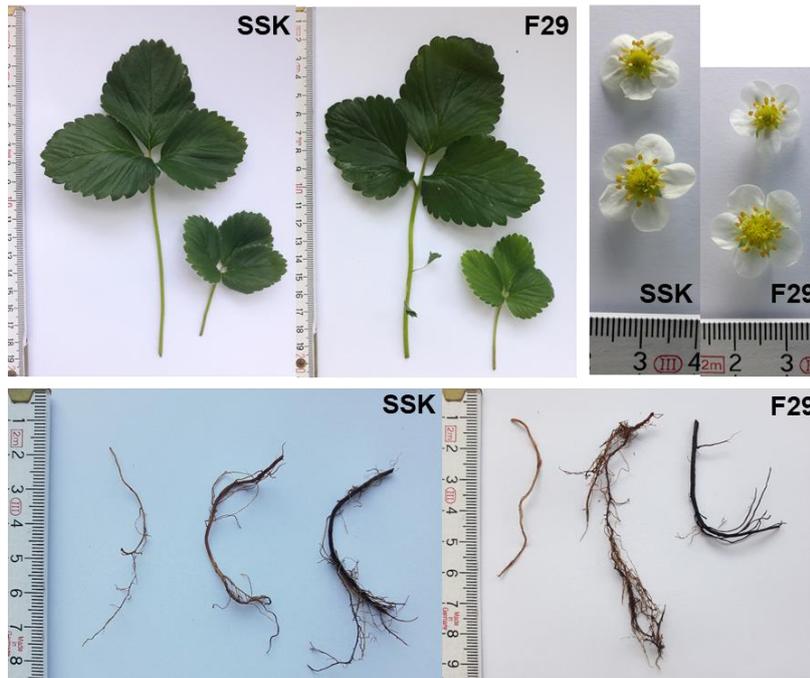


Abbildung 47: Phänotyp der siFLS-Linie (F29) und der Senga Sengana-Kontrolle (SSK); dargestellt sind alte und junge Blätter, Blüten und Wurzeln

3.5.1.1. Veränderungen in den Früchten der siFLS-Linie

Um Veränderungen des Metabolitenspektrums der Früchte durch die Herabregulation des Flavonol-Synthase-Gens zu bestimmen, wurde die Metaboliten der Früchte verschiedener Reifestadien der siFLS-Linie als auch von Kontrollfrüchten mittels LC-MS analysiert (Abbildung 48).

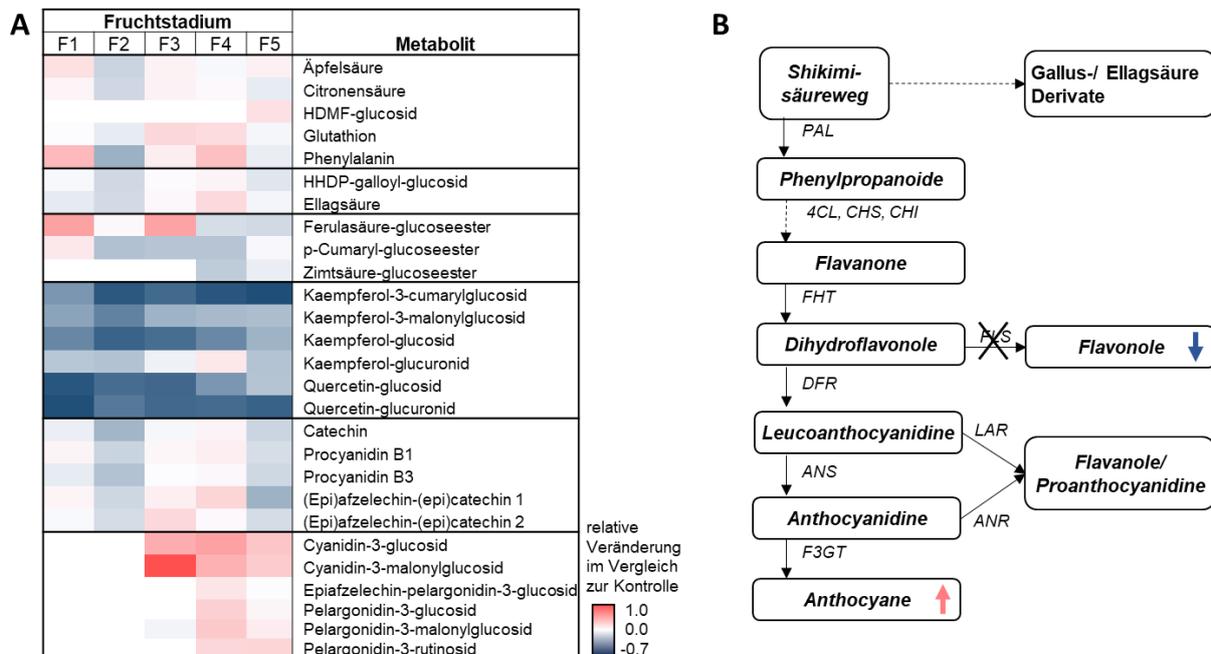


Abbildung 48: Metabolitenkonzentrationsveränderung in den siFLS-Früchten im Vergleich zu Kontrollfrüchten – A: Heatmap der Veränderungen der relativen Metabolitenkonzentrationen; weiß: keine Veränderung im Vergleich zur Kontrolle, rot: Erhöhung im Vergleich zur Kontrolle, blau: Erniedrigung im Vergleich zur Kontrolle. F1: klein grün, F2: groß grün, F3: weiß, F4: weiß/rot, F5: rot. B: Veränderungen verdeutlicht im Schema des Polyphenolbiosynthesewegs.

3. Ergebnisse

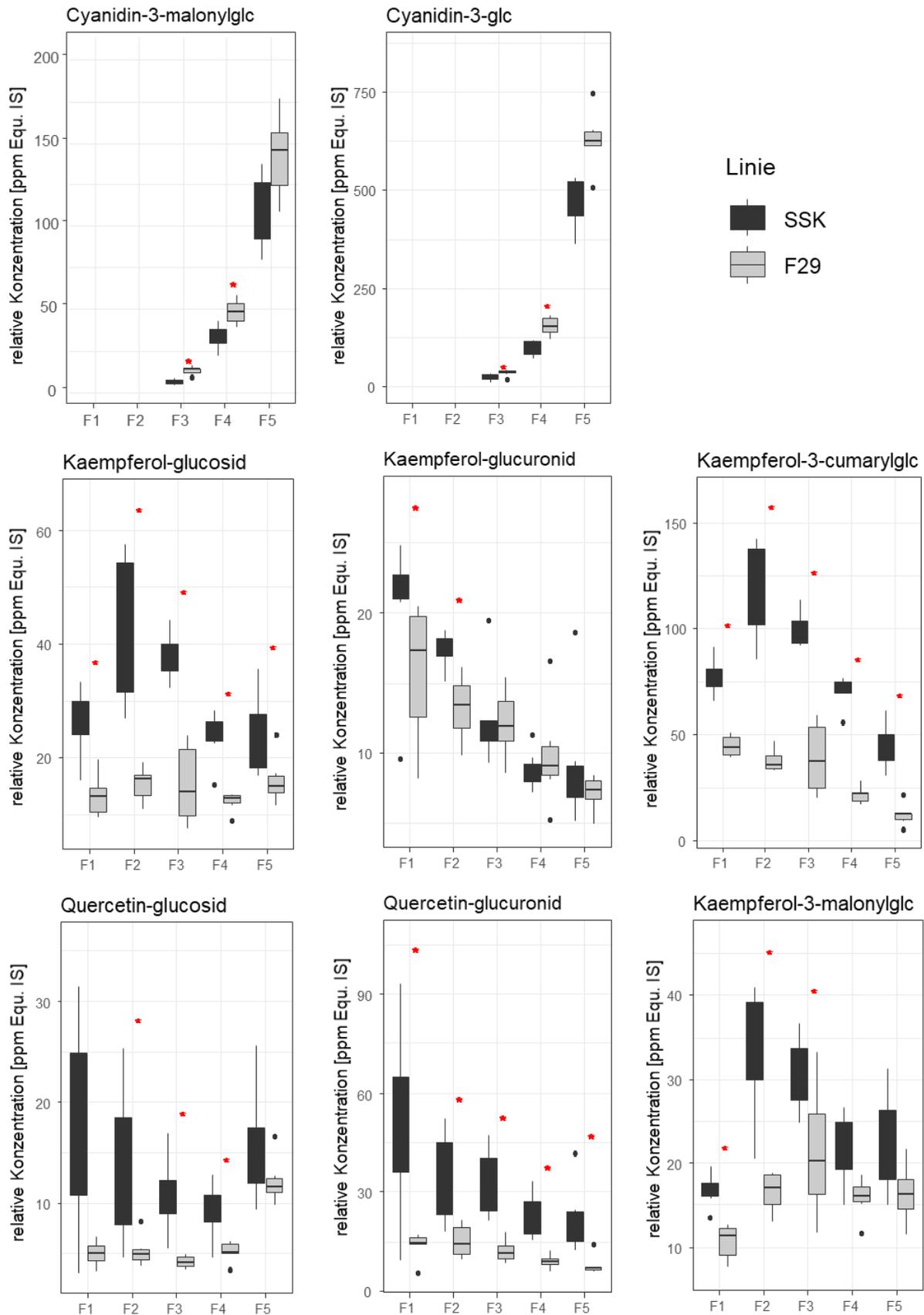


Abbildung 49: Beispiele der Metabolitenkonzentrationen in den Früchten der siFLS-Linien und Kontrollfrüchten während der Fruchtreifung angegeben als relative Konzentrationen – F1: klein grün, F2: groß grün, F3: weiß, F4: weiß/rot, F5: rot. Die Signifikanzen wurden mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Test berechnet ($p \leq 0.05$, *; $p \leq 0.01$, **).

3. Ergebnisse

Im Vergleich zu der Kontrolle zeigte die siFLS-Linie (F29) signifikant niedrigere Gehalte an den analysierten Flavonolen (Abbildung 49). Die Differenz zur Kontrolle stieg im Fall von Kaempferol-3-cumarylglucosid im Laufe der Fruchtreifung an, während das Gegenteil bei Quercetin-3-glucosid der Fall war. Bei Kaempferol-glucuronid konnte nur in den grünen Fruchtstadien ein niedrigerer Gehalt festgestellt werden. In den späteren Fruchtstadien war der Unterschied nicht mehr statistisch signifikant (Abbildung 49). Generell nahm die Konzentration der Glucuroniden von Kaempferol und Quercetin im Laufe der Fruchtreifung ab, dies war sowohl bei der Kontrolle als auch bei F29 der Fall. Eine Steigerung im groß grünen Stadium gefolgt von einem stetigen Abfall, konnte hingegen bei Kaempferol-glucosid, Kaempferol-3-cumarylglucosid und Kaempferol-malonylglucosid in der Kontrolle beobachtet werden. Bei Kaempferol-3-malonylglucosid verhielt sich F29 ähnlich. Bei Kaempferol-3-cumarylglucosid blieb jedoch die Steigerung im groß grünen Stadium aus. Es konnte nur ein stetiger Abfall im Laufe des Reifungsprozesses beobachtet werden. Die Kaempferol-3-glucosid-Gehalte von F29 blieben im Gegensatz zur Kontrolle konstant.

Eine weitere interessante Veränderung waren signifikant höhere Anthocyangehalte im weißen und weiß/roten Fruchtstadium (F3 und F4). Dies betraf Cyanidin-3-glucosid und Cyanidin-3-malonylglucosid (Abbildung 49).

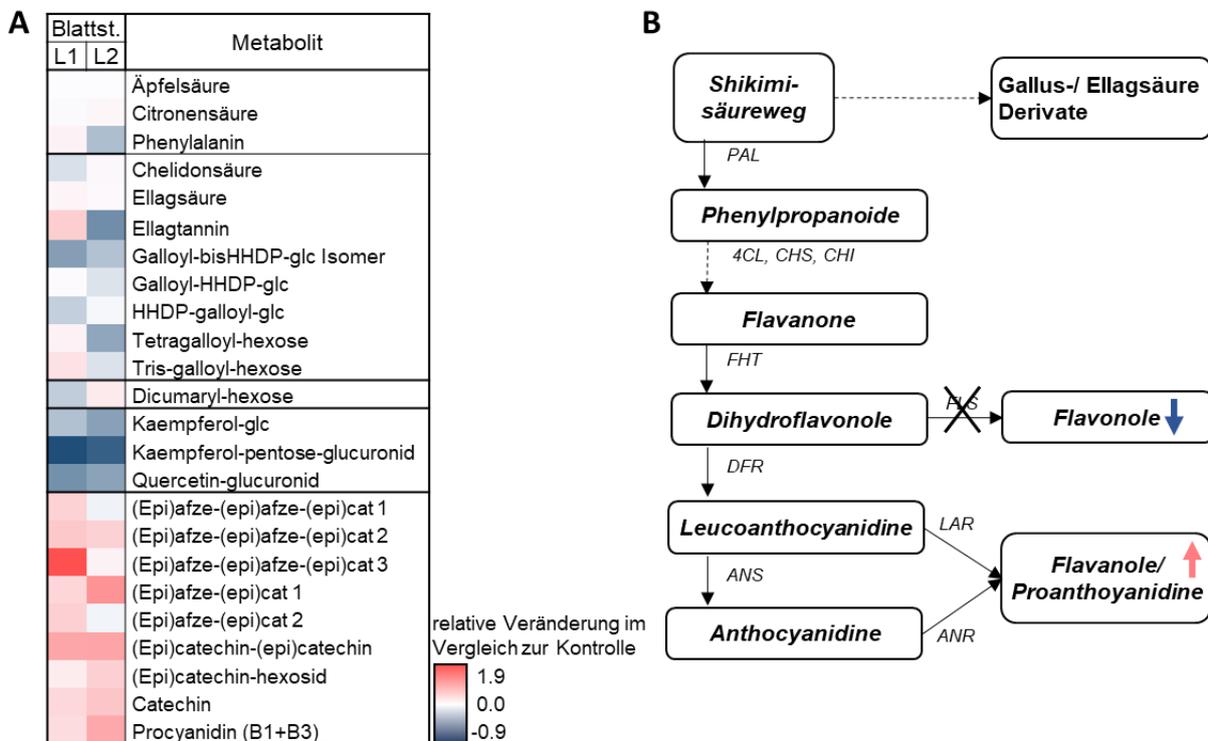


Abbildung 50: Metabolitenkonzentrationsveränderung in den siFLS-Blättern im Vergleich zu Blättern der Kontrollpflanzen – A: Heatmap der relativen Metabolitenkonzentrationsveränderung; weiß: gleiche Konzentration wie in der Kontrolle, rot: Erhöhung im Vergleich zur Kontrolle, blau: Erniedrigung im Vergleich zur Kontrolle; (L1: junges Blatt, L2: altes Blatt); B: Veränderungen verdeutlicht im Schema des Polyphenolbiosynthesewegs.

3.5.1.2. Veränderungen in den Blättern der siFLS-Linie

Auch in den jungen und alten Blättern der siFLS-Linie und Kontrollpflanzen wurden die Metaboliten mittels LC-MS bestimmt. In den Blättern konnten signifikant niedrigere Gehalte an Flavonolen in beiden Entwicklungsstadien beobachtet werden (Abbildung 50). Dies traf insbesondere auf Kaempferol-pentose-glucuronid zu. Hier war die Reduktion in jungen Blättern ca. 90 % und in alten Blättern ca. 80 % im Vergleich zur 'Senga Sengana'-Kontrolle.

Bei den Flavanolen war hingegen ein erhöhter Gehalt in der siFLS-Linie im Vergleich zu den Kontrollpflanzen zu erkennen, für (Epi)catechin-(epi)catechin, sowie Procyanidin B1+B3 und Catechin waren in beiden Blattstadien die Werte signifikant.

3.5.1.3. Veränderungen in den Wurzeln der siFLS-Linie

In der Wurzel konnte keine signifikante Reduktion der Flavonole in der siFLS-Linie beobachtet werden (Abbildung 51). Eine der wenigen signifikanten Änderungen war die Erhöhung des Gehaltes an HHDP-galloyl-glucose (Abbildung 51 B) und dreier Flavanole bestehend aus Catechin. Allerdings lagen andere Flavanole in niedrigeren Konzentrationen vor.

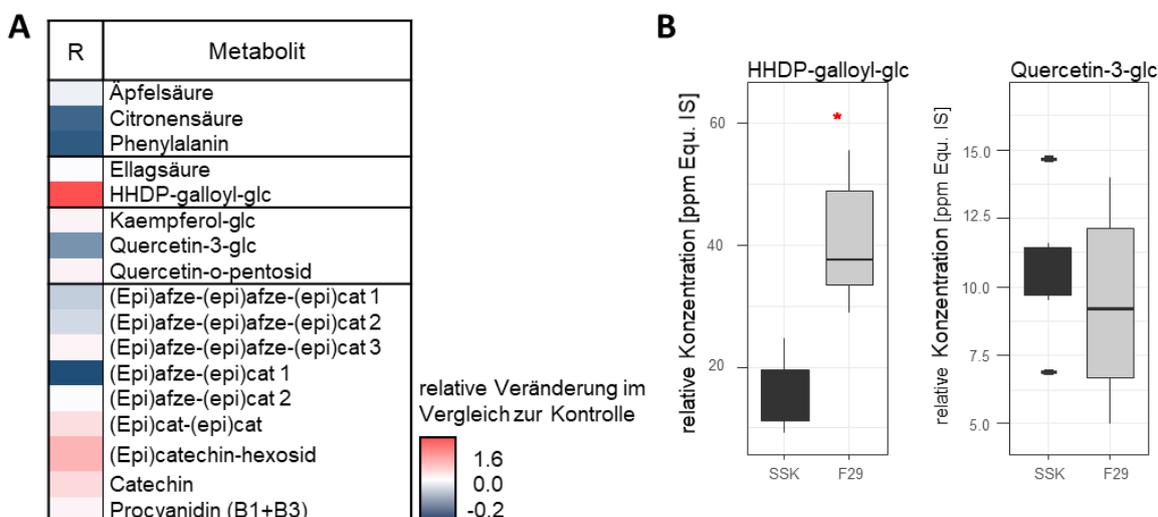


Abbildung 51: Metabolitenveränderung in den siFLS-Wurzeln im Vergleich zu Kontrollpflanzen – A: Heatmap der relativen Metabolitenkonzentrationsveränderung; weiß: gleiche Konzentration wie in der Kontrolle, rot: Erhöhung im Vergleich zur Kontrolle, blau: Erniedrigung im Vergleich zur Kontrolle; B: Beispiele der Metabolitenkonzentrationen in Wurzeln der siFLS-Linien. Die Signifikanzen wurden mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Test berechnet ($p \leq 0.05$, *, $p \leq 0.01$, **).

3.5.1.4. Veränderungen in den Blüten der siFLS-Linie

In den Blüten der siFLS-Pflanzen konnte in Bezug auf die meisten Flavonole ein signifikant reduzierter Gehalt im Vergleich zu den Kontrollpflanzen festgestellt werden (Abbildung 52).

3. Ergebnisse

Ausnahmen sind nur Quercetin-glucuronid, Quercetin-pentosid, sowie Isorhamnetin-sophorosid/dihexosid. Die Reduktion betrug bis zu 70 %.

Darüber hinaus ergab sich für die Phenylpropanoide Kaffeesäure-glucoseester und p-Cumaryl-glucoseester ein signifikant niedrigerer Gehalt in den Blüten der siFLS-Pflanzen.

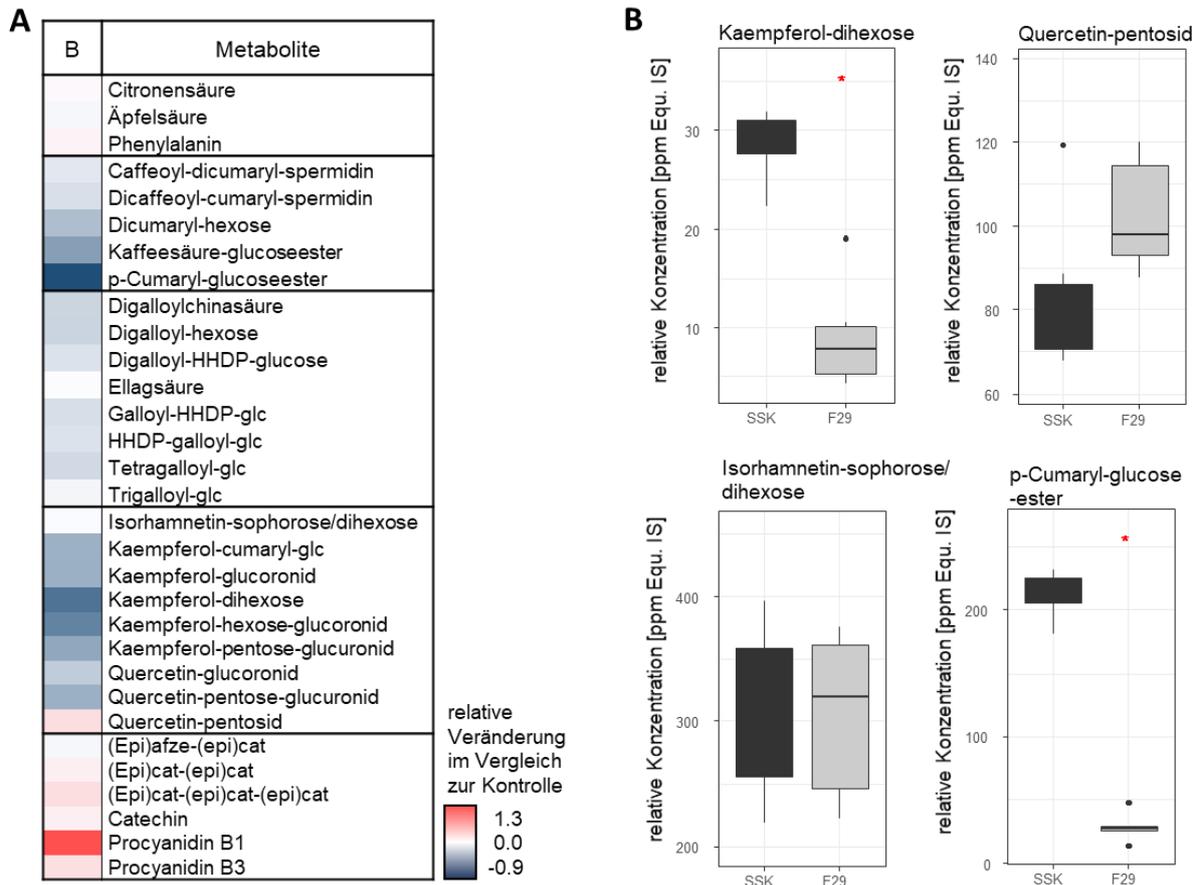


Abbildung 52: Metabolitenveränderung in den Blüten von siFLS-Pflanzen im Vergleich zu Kontrollpflanzen – A: Heatmap der relativen Metabolitenveränderung; weiß: gleiche Konzentrationen wie in der Kontrolle, rot: Erhöhung im Vergleich zur Kontrolle, blau: Erniedrigung im Vergleich zur Kontrolle; B: Beispiele der Metabolitenkonzentrationen in Blüten der siFLS-Linien. Die Signifikanzen wurden mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Test berechnet ($p \leq 0.05$, *; $p \leq 0.01$, **).

3.5.2. siFra a 1.02-Pflanzen

Bei Fra a 1.02 handelt es sich um das Haupt-Bet v 1-homologe-Allergen der Erdbeere. Da es Hinweise gibt, dass die Expression von Fra a 1-Genen für die Bildung von Polyphenolen in der Erdbeerfrucht von Bedeutung ist, wurde die Expression des Fra a 1.02-Gens in Erdbeerpflanzen *Fragaria x ananassa* cv. 'Senga Sengana' mittels reverser Genetik herabreguliert. Die Herunterregulierung dessen Expression hatte keine Auswirkung auf den äußerlichen Phänotyp (Abbildung 53).

3. Ergebnisse

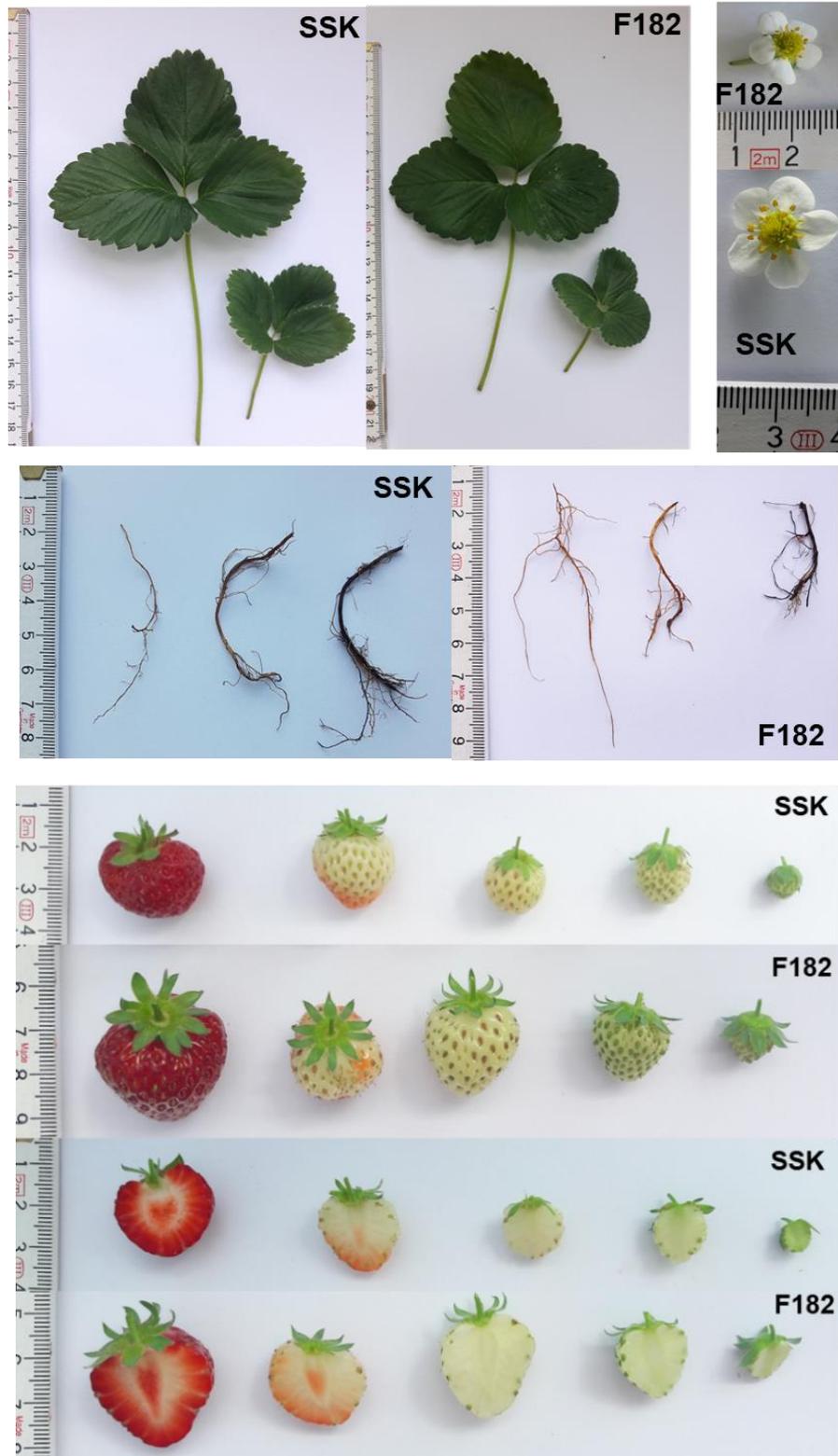


Abbildung 53: Phänotyp der siFra-Linie (F182) und der Senga Sengana-Kontrolle (SSK). Dargestellt sind alte und junge Blätter, Blüten, Wurzeln und die untersuchten fünf Fruchtstadien der Erdbeere (klein grün, groß grün, weiß, weiß/rot und rot) als ganze Frucht und im Querschnitt.

3.5.2.1. Veränderungen in den Früchten der siFra a 1.02-Linie

Die Sekundärmetaboliten der siFra-Linien wurden mittels LC-MS für die Erntejahre 2018 und 2019 bestimmt. Die Metabolitengehalte der siFra-Linien zeigten eine große Varianz zwischen den beiden Erntejahren (Abbildung 54). Auch die Richtung der Metaboliten-Veränderung der siFra a 1.02-Linie (F182) im Vergleich zur 'Senga Sengana'-Kontrolle wechselte bisweilen. Als Beispiel ist hier Glutathion zu nennen, das im ersten Erntejahr signifikant höhere Gehalte in den siFra-Pflanzen aufwies, während im zweiten Erntejahr signifikant niedrigere Konzentrationen festgestellt wurden. Darüber hinaus gab es Metaboliten, wie HHDP-galloyl-glucosid und Quercetin-glucosid, die 2018 einen deutlich niedrigeren Gehalt im Vergleich zu der Kontrolle zeigten, während 2019 keine deutliche Veränderung feststellbar war. Es gab auch Metaboliten, deren Verhältnis im Vergleich zur Kontrolle annähernd gleich blieb. Der Gehalt an Citronensäure war in beiden Erntejahren und in allen Fruchtstadien erniedrigt.

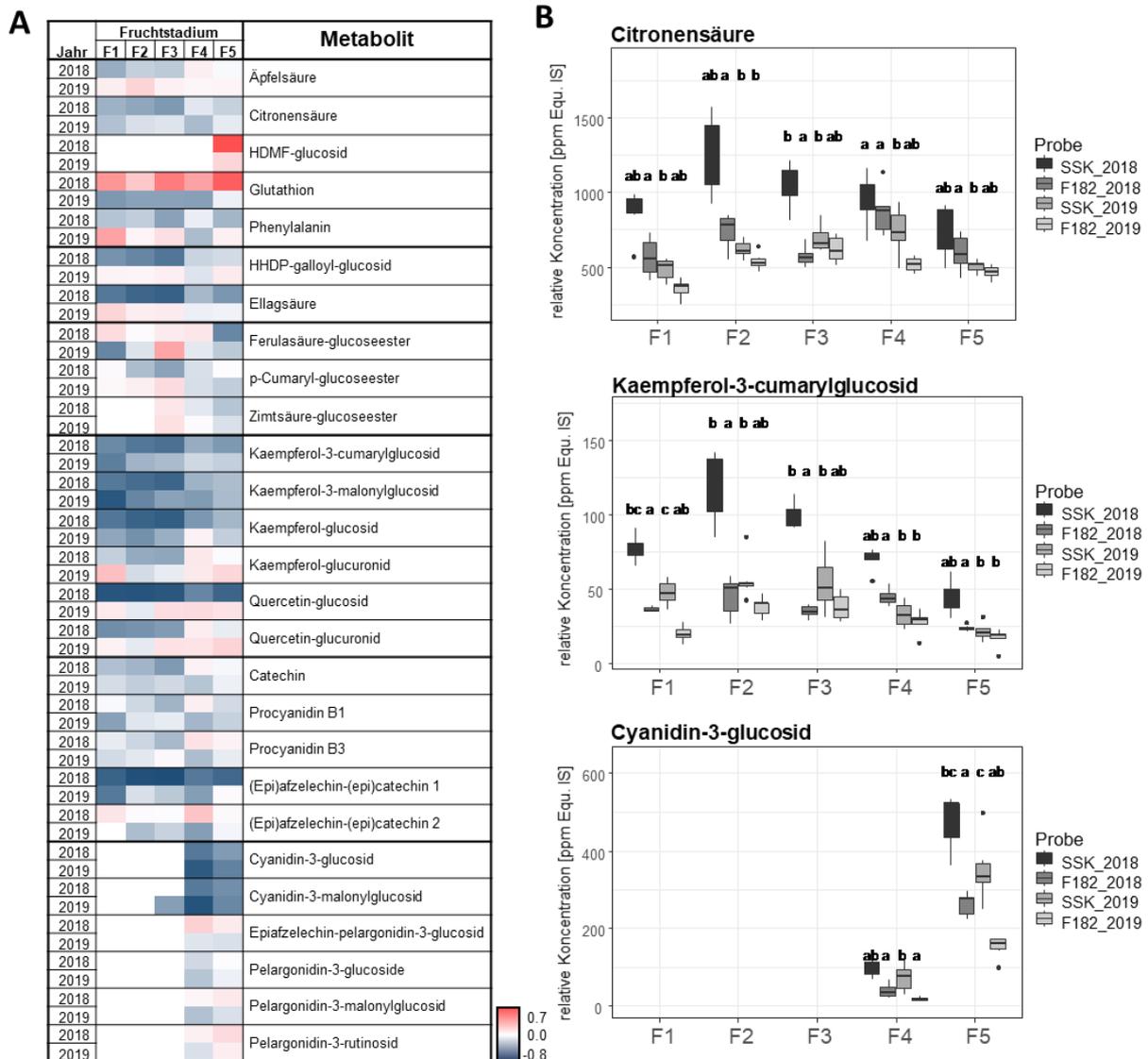


Abbildung 54: Metabolitenveränderung in den siFra-Früchten im Vergleich zu den Kontrollfrüchten – A: Heatmap der relativen Metabolitenkonzentrationsveränderung im Vergleich zur Kontrolle; weiß: gleiche Konzentration wie in der Kontrolle, rot: Erhöhung im Vergleich zur Kontrolle, blau: Erniedrigung im Vergleich zur Kontrolle; (F1: klein grün, F2: groß grün, F3: weiß, F4: weiß/rot, F5: rot); B: Beispiele der Metabolitenkonzentrationen. Die Buchstaben (a-b) symbolisieren signifikante Unterschiede (Dunn-Bonferroni-Test, $p \leq 0,05$).

Besonders auffällig waren niedrige Konzentrationen an Kaempferol-3-cumarylglucosid, Kaempferol-3-malonylglucosid und Kaempferol-3-glucosid. Die Differenz zur Kontrolle war insbesondere in dem klein grünen Fruchtstadium groß und nahm im Laufe der Reifung ab. Ebenfalls erniedrigt war der Gehalt an den Anthocyanen Cyanidin-3-glucosid und Cyanidin-3-malonylglucosid. Die Reduktion betrug 50 % bis 80 % und war in allen Fruchtstadien, in denen sich die Anthocyane quantifizieren ließen, signifikant. Der einzige Metabolit, der in beiden Erntejahren deutlich erhöht vorlag, war HDMF-glucosid.

3.5.2.2. Veränderungen in den Blättern der siFra a 1.02-Linie

Bei der Analyse der Metaboliten der jungen Blätter der siFra a 1.02-Pflanzen konnte nur bei drei Flavanolen ein signifikanter Unterschied zu den Proben der Kontrollpflanzen festgestellt werden (Abbildung 55). Dies betraf (Epi)catechin-(epi)catechin, Catechin und die Summe aus Procyanidin B1 und B3. Die Gehalte waren stets in den Blättern der siFra a 1.02-Pflanzen erhöht. Im alten Blattstadium waren jedoch die Gehalte mancher Flavanole auch reduziert. Dies waren Proanthocyanidine, die eine Afzelechin-Einheit enthielten. Die Flavonole Kaempferol-pentose-glucuronid und Quercetin-glucuronid sowie Chelidonsäure waren in den alten Blättern signifikant erhöht und in den jungen Blättern signifikant erniedrigt im Vergleich

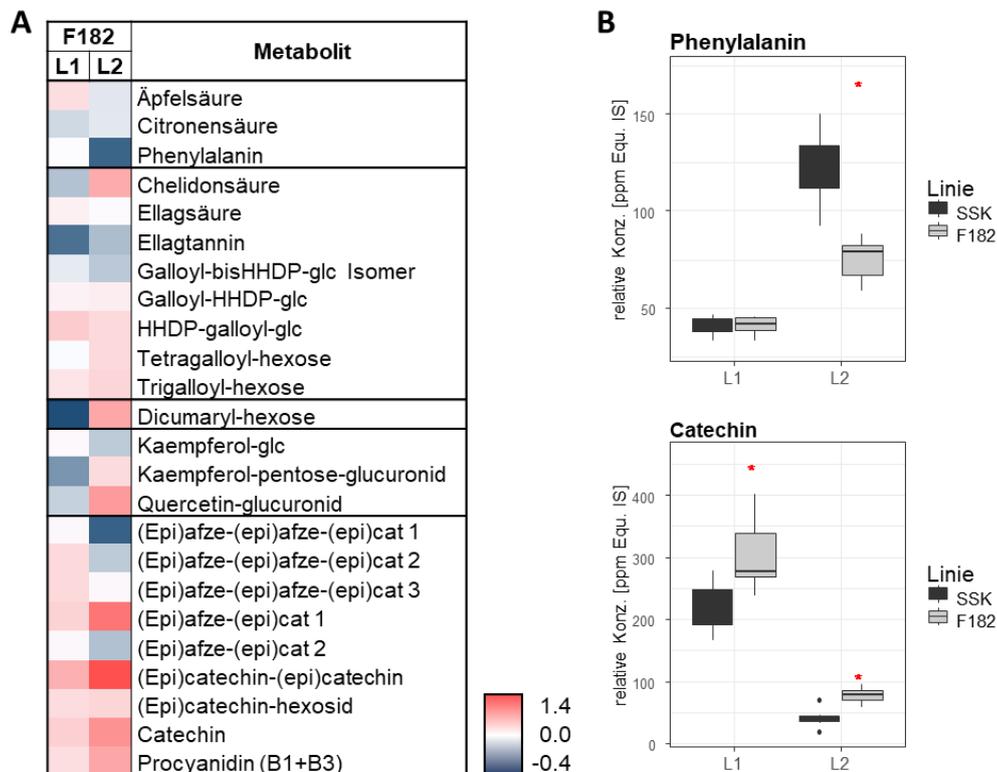


Abbildung 55: Metabolitenveränderung in den siFra-Blättern im Vergleich zu Kontrollblättern – A: Heatmap der relativen Metabolitenkonzentrationsveränderung im Vergleich zur Kontrolle; weiß: gleiche Konzentration wie in der Kontrolle, rot: Erhöhung im Vergleich zur Kontrolle, blau: Erniedrigung im Vergleich zur Kontrolle; (L1: junges Blatt, L2: altes Blatt); B: Beispiele der Metabolitenkonzentrationen. Die Signifikanzen wurden mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Test berechnet ($p \leq 0.05$, *, $p \leq 0.01$, **).

zu den Kontrollblättern. Für Phenylalanin konnte in den alten Blättern eine signifikante Reduktion im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden.

3.5.2.3. Veränderungen in den Wurzeln der siFra a 1.02-Linie

Die LC-MS Analyse der Metaboliten der Wurzeln zeigte, dass die Konzentration an Phenylalanin in den Wurzeln der F182-Pflanzen mehr als doppelt so hoch war wie in den Wurzeln der Kontrollpflanzen (Abbildung 56). Auch der Gehalt an Ellagsäure war signifikant erhöht. Dies galt jedoch nicht für HHDP-galloyl-glc. Äpfelsäure war hingegen signifikant erniedrigt. Das galt auch für fünf der quantifizierten Flavanole. Und auch die Flavanole, für die keine Signifikanz berechnet werden konnte, zeigten niedrigere Gehalte in den transgenen Wurzeln. Die Flavonole tendierten ebenfalls zu erniedrigten Gehalten.

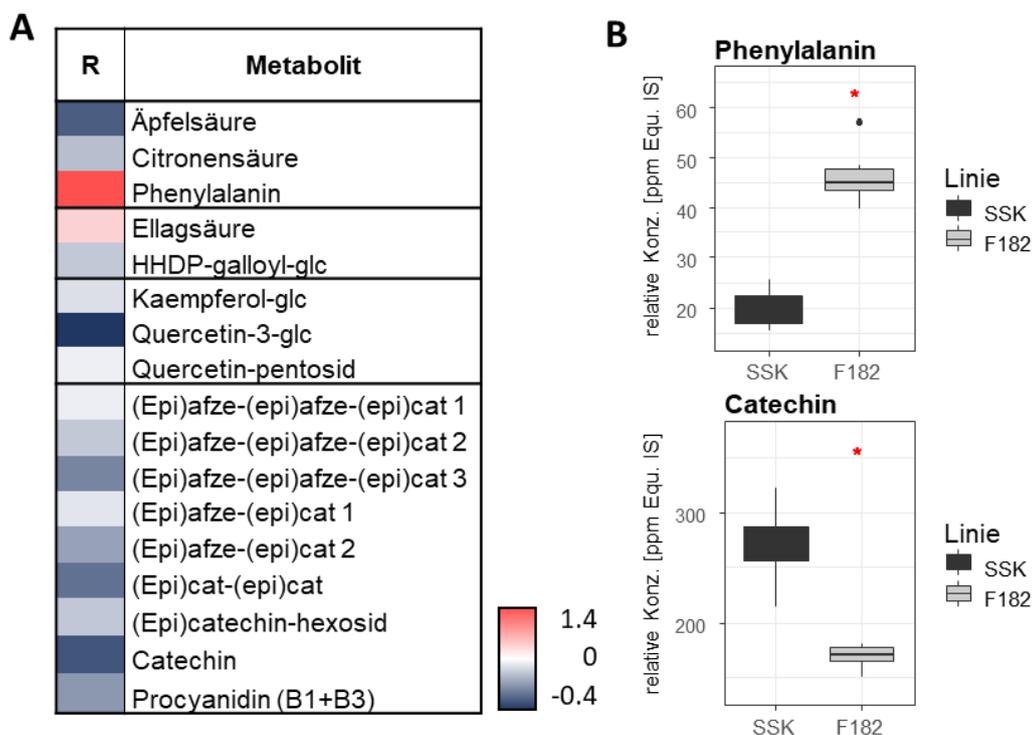


Abbildung 56: Metabolitenveränderung in den siFra-Wurzeln im Vergleich zu den Wurzeln der Kontrollpflanzen – A: Heatmap der relativen Metabolitenkonzentrationsveränderung im Vergleich zur Kontrolle; weiß: gleiche Konzentration wie in der Kontrolle, rot: Erhöhung im Vergleich zur Kontrolle, blau: Erniedrigung im Vergleich zur Kontrolle; B: Beispiele der Metabolitenkonzentrationen. Die Signifikanzen wurden mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Test berechnet ($p \leq 0.05$, *; $p \leq 0.01$, **).

3.5.2.4. Veränderungen in den Blüten der siFra a 1.02-Linie

Die LC-MS Untersuchung der Metaboliten der Blüten zeigte, dass bei den Blüten innerhalb einer Metaboliten-Gruppe meistens derselbe Trend beobachtet werden konnte (Abbildung 57). Die Aminosäuren Phenylalanin und Tryptophan waren signifikant erniedrigt, im Vergleich zur Kontrolllinie jeweils 21 % bzw. 9 % reduziert. Für die meisten Gallus- und Ellagsäure-Derivate, sowie Phenylpropanoide konnte auch eine Reduzierung in den transgenen Blüten beobachtet

werden. Hingegen waren die Flavanolgehalte erhöht, der Wert für Procyanidin B1 (94 % mehr) war signifikant. Mit Ausnahme von Quercetin-pentosid lagen geringere Konzentrationen aller Flavonole in den siFra a 1.02-Blüten in Vergleich zu Kontrollblüten vor, die Werte für vier der fünf quantifizierten Flavonole waren signifikant erniedrigt (Kaempferol-dihexose, Kaempferol-hexose-glucuronid, Kaempferol-pentose-glucuronid und Quercetin-glucuronid).

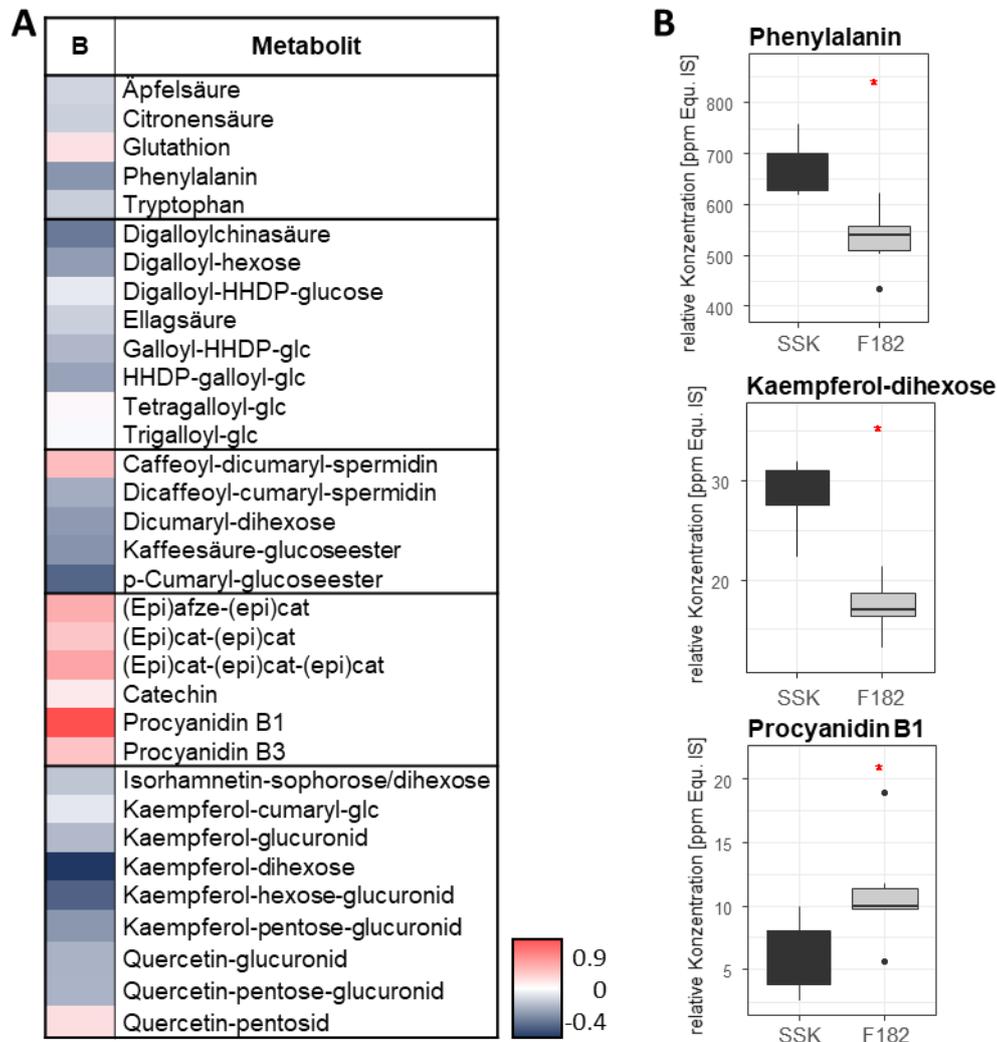


Abbildung 57: Metabolitenveränderung in den siFra-Blüten im Vergleich zu den Blüten von Kontrollpflanzen – A: Heatmap der relativen Metabolitenkonzentrationsveränderung; weiß: gleiche Konzentration wie in der Kontrolle, rot: Erhöhung im Vergleich zur Kontrolle, blau: Erniedrigung im Vergleich zur Kontrolle; (B: Blüten); B: Beispiele der Metabolitenkonzentrationen. Die Signifikanzen wurden mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Test berechnet ($p \leq 0.05$, *, $p \leq 0.01$, **).

3.5.3. Spanische siFra a 1.02-Früchte

In einem unabhängigen Projekt wurden vom spanischen Projektpartner der Universität Malaga ebenfalls siFra a 1.02-Pflanzen hergestellt. Hier wurde die Expression von *Fra a 1.02* in Erdbeerpflanzen *Fragaria x ananassa* cv. ‘Camarosa‘ mittels reverser Genetik herabreguliert. Von den spanischen siFra 1.02-Linien wurden die reifen Früchte auf Veränderungen hinsichtlich der Metaboliten untersucht. Es gab zwei Kontrolllinien (pBIN4 und pBIN5), sowie

drei siFra a 1.02-Linien (Fra4, Fra5, Fra6). Die Herunterregulierung der Genexpression von *Fra a 1.02* in den Fra4-, Fra5- und Fra6-Pflanzen wurde mittels RNAseq vom Kooperationspartner bestätigt und betraf nicht nur *Fra a 1.02*, sondern auch andere *Fra a 1*-Homologe. Die LC-MS-Spektren der methanolischen Fruchtextrikte wurden sowohl mittels *Metabolic Profiling (Targeted Metabolomics)* als auch ungerichteter Analyse (*Untargeted Metabolomics*) ausgewertet.

3.5.3.1. *Metabolic Profiling* der spanischen siFra 1.02-Früchte

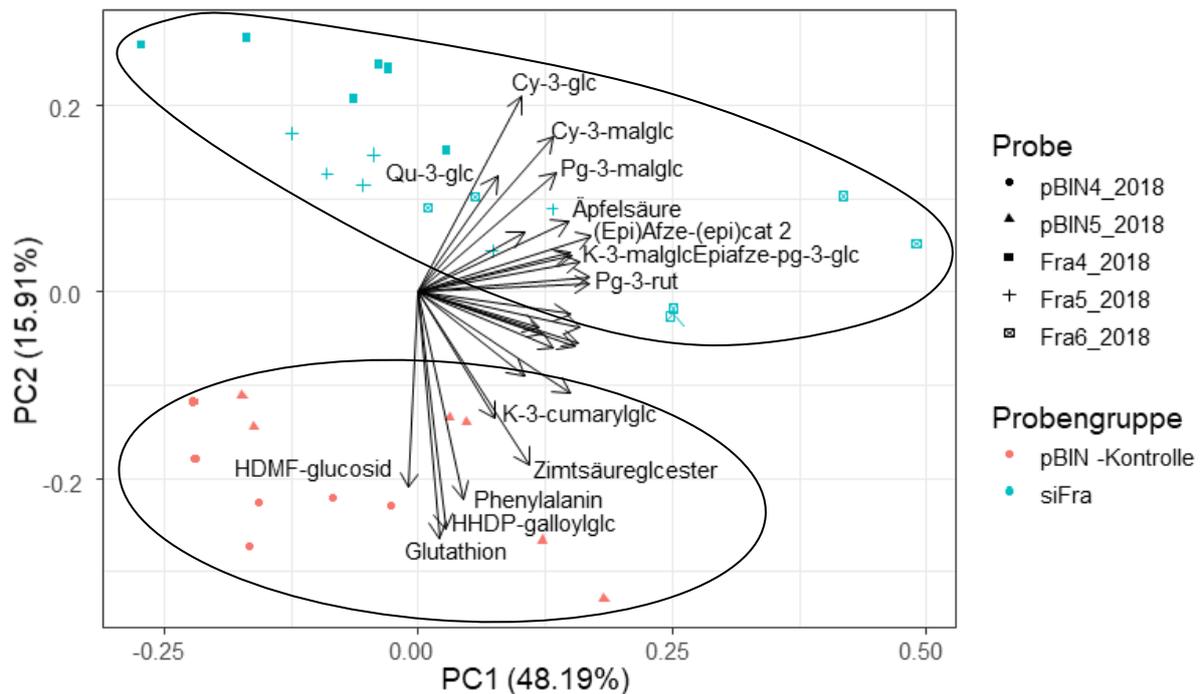


Abbildung 58: PCA der Konzentrationen der identifizierten Metaboliten der spanischen siFra-Früchte. Die Punkte repräsentieren die Messwerte einzelner Proben, die Symbole die verschiedenen Proben und die Farben die Probengruppen (orange: Kontrollen, blau: siFra-Linien). Die Pfeile stellen die Loadings der beiden Hauptkomponenten dar.

Mittels PCA der Gehalte der identifizierten Metaboliten konnten die Extrakte der siFra-Linien deutlich von den Extrakten der Kontrollen unterschieden werden (Abbildung 58). Jedoch war die Variabilität innerhalb der Probengruppen hoch, insbesondere beschrieben durch die Hauptkomponente 1 (PC1). Die Trennung der Probengruppen basiert hauptsächlich auf PC2 (15,91 %). Bei Betrachtung der Loadings, den Variablen, die die PCs definieren, fällt auf, dass die Kontrollgruppe vor allem zu höheren Konzentrationen an Cyanidin-3-glucosid, Cyanidin-3-malonylglucosid, Pelargonidin-3-malonylglucosid und Quercetin-3-glucosid tendierten. Die Fra-Gruppe hatte hingegen höhere Gehalte an HDMF-glucosid, Glutathion, HHDP-galloylglucosid und Phenylalanin.

3. Ergebnisse

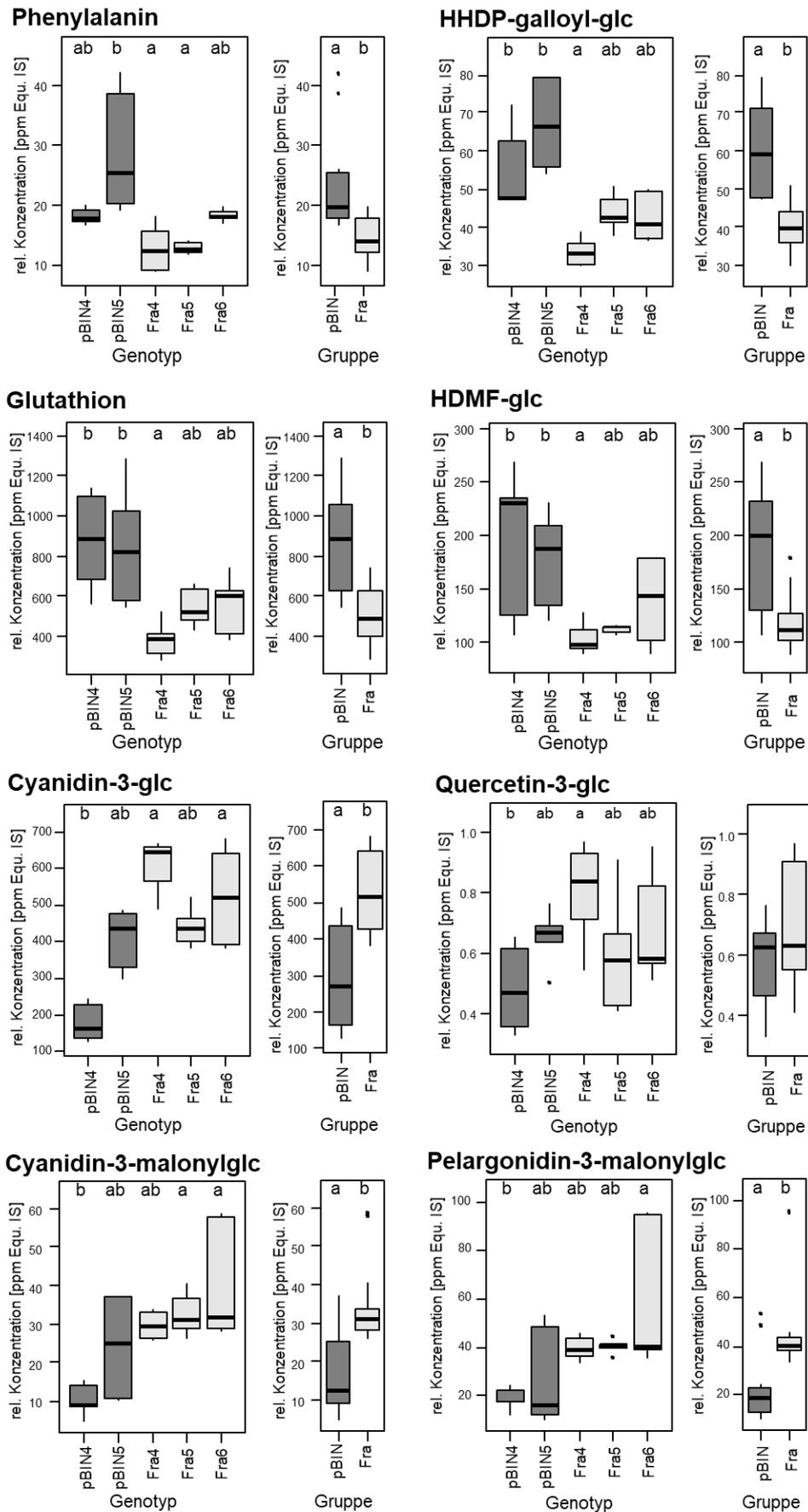


Abbildung 59: Metabolitenkonzentrationen in den spanischen siFra-Früchten im Vergleich zu Kontrollfrüchten – dunkelgrau: Kontrolllinien, hellgrau: siFra 1.02-Linien; Buchstaben (a-b) symbolisieren signifikante Unterschiede (Dunn-Bonferroni-Test, $p \leq 0,05$)

Diese Metaboliten wurden mittels Dunn-Bonferroni-Test auf Signifikanzen zwischen den Genotypen untersucht (Abbildung 59). Erneut fiel die hohe Variabilität zwischen den Probengruppen auf. Dies betraf sowohl den Vergleich beider Kontrollen als auch den Vergleich der drei siFra-Linien. Bezüglich Phenylalanin wies pBIN5 signifikant höhere Gehalte als Fra4 und Fra5 auf. Zwischen pBIN4 und Fra6 konnte kein Unterschied festgestellt werden. Jedoch hatten beide Kontrollen einen signifikant höheren Gehalt an HHDP-galloyl-glucosid als Fra4. Die beiden anderen Fra-Linien wiesen eine ähnliche Tendenz auf. pBIN4 und pBIN5 zeigten ein vergleichbares Glutathion-Level, das signifikant höher als bei Fra4 ausfiel.

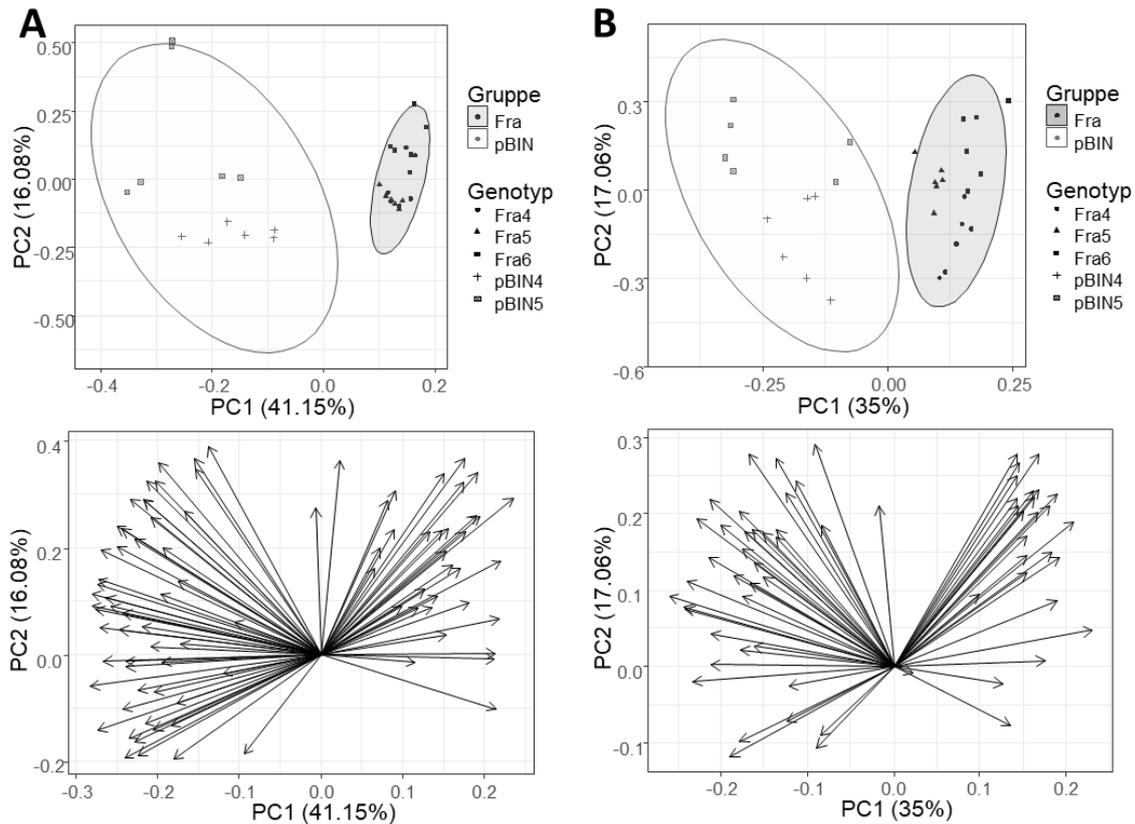
Ähnlich wie bei HHDP-galloyl-glucosid konnte auch bei Glutathion im Vergleich von Fra5 und Fra6 zu den Kontrollen kein signifikanter Unterschied der Konzentration berechnet werden. Diese zeigten jedoch auch die Tendenz eines erniedrigten Gehaltes an Glutathion wie Fra4. Auch für HDMF-glucosid setzte sich dieses Muster fort. Obwohl durch die PCA ein Unterschied im Quercetin-glucosid-Gehalt zu vermuten war, konnte dies bei der Einzelbetrachtung des Metaboliten nicht bestätigt werden. Obwohl Fra4 einen signifikant höheren Gehalt hatte als die Kontrolle pBIN4, hatte die zweite Kontrolle einen deutlich höheren Gehalt, der in einem ähnlichen bzw. sogar höheren Bereich lag, als die beiden restlichen siFra-Linien. Bezüglich Cyanidin-3-glucosid hatten zwei siFra-Linien signifikant höhere Gehalte als die pBIN4-Kontrolle. Cyanidin-3-malonylglucosid zeigte ein ähnliches Muster. Allerdings waren die Gehalte bei Fra5 und Fra6 signifikant höher als bei pBIN4. Beide Kontrollen tendierten zu einer niedrigeren Konzentration als alle siFra-Linien. Auch für Pelargonidin-3-malonylglucosid bestand diese Tendenz.

3.5.3.2. Ungerichtete Analyse der spanische siFra 1.02-Früchte

Die LC-MS Daten, die für die Bestimmung der bekannten Erdbeermetaboliten verwendet wurden, wurden anschließend für die ungerichtete Auswertung genutzt. Nach Trennung der Massenspektren in eine positive und negative Spur, wurden die Spektren der Kontrollen und der siFra-Früchte mittels XCMS auf weitere Metaboliten-Differenzen überprüft. Die Daten der sich ergebenden Metabolitenliste wurden auf die Fläche des Internen Standards Biochanin A normalisiert und von Isotopologen befreit.

Auch die PCA der Gehalte der Metaboliten, die mittels ungerichteter Analyse im positiven und negativen Modus gefunden wurden, trennt die Proben in zwei Gruppen (Abbildung 60). Es fällt bei der Betrachtung der Loadings auf, dass fast alle neuen, meist unbekannt Metaboliten, mit nur wenigen Ausnahmen, zu der Trennung in der PC1 (41,15 % bzw. 35 %) beitragen. Das bedeutet, dass die Auswertung über XCMS erfolgreich potenziell veränderte Metaboliten identifizieren konnte.

3. Ergebnisse



Für

Abbildung 60: PCA der Konzentrationen der Metaboliten aus der ungerichteten Analyse der spanischen siFra-Früchte – A: positiver Modus; B: negativer Modus. Oben: Auftrennung der Probenmesswerte in Kontrollen (pBIN) und siFra-Linien; unten: Loadings der Metaboliten der oben dargestellten PCAs.

eine Verifizierung dieser Metaboliten wurde eine geclusterte Heatmap der Metaboliten-Mediane der verschiedenen Genotypen erstellt (Abbildung 61). Der Farbencode beruht auf dem Vergleich der Signalintensität des Metaboliten mit der höchsten detektierten Signalintensität des Metaboliten. Hier zeigt sich, wie bereits bei der gerichteten Analyse, eine große Variabilität zwischen den Genotypen bzw. auch innerhalb der Probengruppen. In den positiven Spuren fallen vor allem Fra6 und pBiN5 mit besonders hohen Werten einzelner Metaboliten auf, während bei der negativen Spur zusätzlich auch noch Fra4 hervorsteht. Dennoch gibt es auch unbekannte Metaboliten, die innerhalb einer Probengruppe dieselbe Tendenz aufweisen. In der negativen Spur gibt es die Metaboliten m/z -757 (RT = 38,6 min) und m/z -661 (RT = 32,3 min), die eine deutlich höhere Konzentration in allen drei siFra Linien aufweisen. Es können jedoch auch sieben Metaboliten identifiziert werden, die im Gegensatz dazu eine deutlich höhere Konzentration in den Kontrollen aufweisen. Analog dazu gibt es in den positiven Spuren ein Metabolitencluster mit erhöhten Konzentrationen in den siFra-Linien und ein Cluster mit erniedrigter Konzentration in dieser Probengruppe. Unter diesen Metaboliten befindet sich auch Glutathion, das zuvor schon in der gerichteten Analyse als beeinflusster Metabolit identifiziert werden konnte.

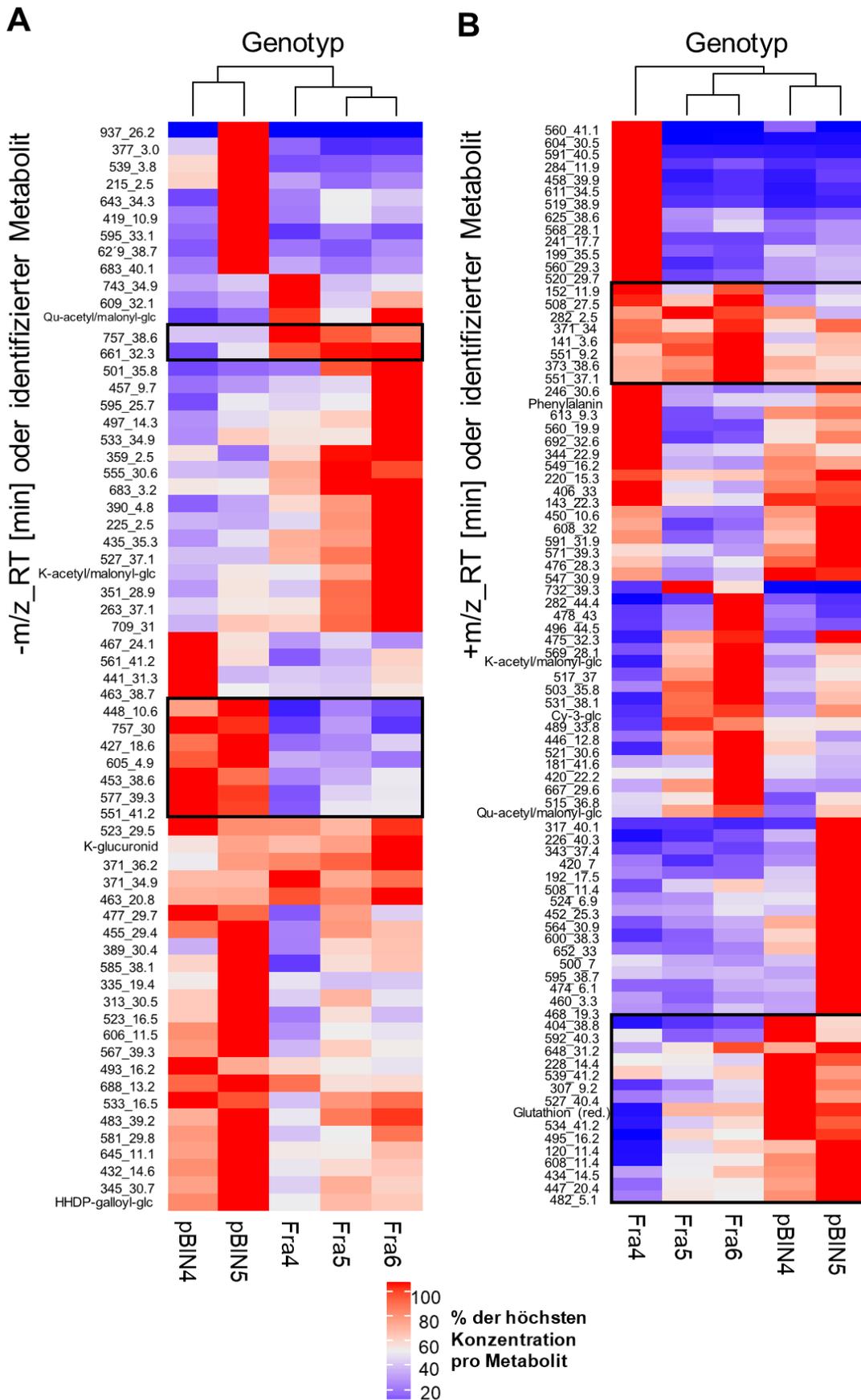


Abbildung 61: Heatmap der Konzentrationen der durch ungerichtete Analysen gefundenen Metaboliten der Früchte der spanischen siFra-Pflanzen – A: negativer Modus, B: positive Modus. Der Farbencode beruht auf dem Vergleich der Signalintensität des Metaboliten mit der höchsten detektierten Signalintensität des Metaboliten

4. Diskussion

4.1. Metabolitenprofil der Erdbeer-Kreuzungspopulationen

Um trotz der Herausforderungen des Klimawandels auch in Zukunft einen verlässlichen Anbau pflanzlicher Nahrungsmittel gewährleisten zu können ist ein genaues Verständnis des Pflanzenmetabolismus notwendig. Daher wurden die Sekundärmetaboliten der Genotypen einer französischen Erdbeer-Kreuzungspopulation, sowie der GoodBerry-Erdbeer-Population mittels LC-MS analysiert, um den Einfluss von genetischer Veranlagung und der Umwelt auf das Pflanzenmetabolom zu untersuchen. Da die GoodBerry-Population an verschiedenen Standorten und zudem für zwei Jahre angebaut wurde, konnte für die Metaboliten der Nachkommen dieser Kreuzung der Einfluss der Umwelt bestimmt werden.

4.1.1. Umwelteffekt auf die Metabolitengehalte

Generell wurden zwischen den Erntejahren der GoodBerry Population an einem Standort große Unterschiede der Metabolitengehalte der Genotypen beobachtet. Eine vergleichbare Varianz zwischen zwei Erntejahren konnte auch bei einer *Fragaria vesca* NIL Kollektion festgestellt werden (Urrutia et al. 2016). Zwischen den Erntejahren sind die geographische Lage als auch annähernd die die Kultivierungsmaßnahmen gleich. Das heißt, der saisonale Effekt kann auf andere Faktoren, wie schwankende Wetterbedingungen (Sonneneinstrahlung, Regen, Kältetage, etc.) oder im Fall des GoodBerry-Standortes Italien (UPM) auf ein spätes Auspflanzen im Jahr 2016 zurückgeführt werden.

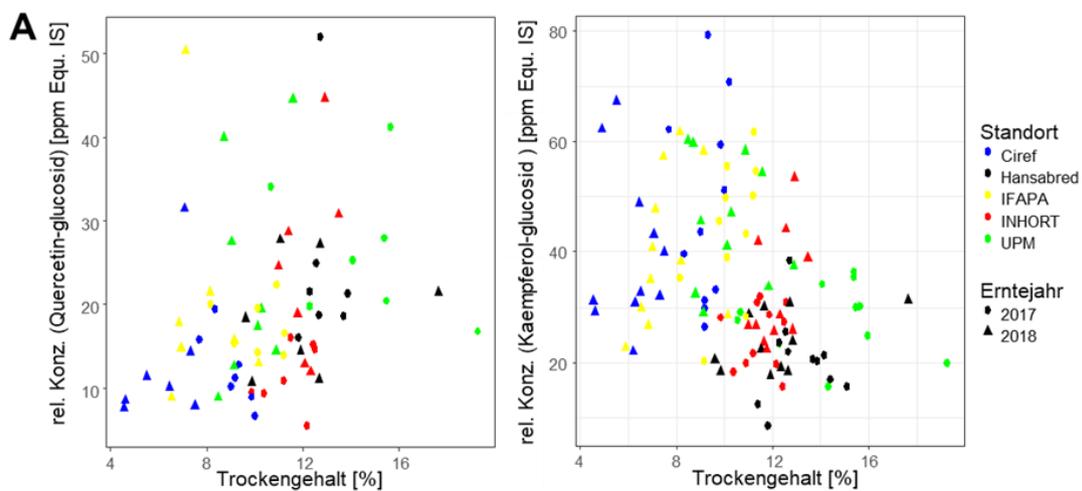
Die Gehalte der Flavanole bzw. Proanthocyanidine zeigten kaum signifikante Umwelteffekte in Bezug auf die Metabolitenmediane der Standorte. Interessanterweise zeigte sich ein signifikanter Unterschied, wenn vorhanden, überwiegend bei den Proanthocyanidinen die auch (Epi)afzelechin enthalten. Carbone et al. 2009 berichten von einem Einfluss der Umwelt auf das Epicatechin/Catechin-Verhältnis. Dieses konnte jedoch auf Grund der fehlenden Diastereomeren-Information in der vorliegenden Studie nicht berechnet werden. In einer Europäischen Studie in der die Metabolitengehalte von Erdbeerkultivaren untersucht wurden, die in Norwegen, Dänemark, Deutschland und der Schweiz angebaut wurden, war ein erhöhter Gehalt an Proanthocyanidinen und Ellagatanninen in Früchten der Pflanzen, die in den nördlicheren Ländern wuchsen, feststellbar (Josuttis et al. 2012). Häkkinen und Törrönen 2000 beschreiben einen erhöhten Gehalt an Ellagsäure in Früchten aus Finnland im Vergleich zu Polen. Der Unterschied der Flavanolgehalte wurde in der GoodBerry-Population jedoch hauptsächlich durch saisonale Effekte zwischen den Erntejahren verursacht und weniger von den Standorteffekten. Die Gehalte an Ellagsäure und HHDP-galloyl-glucosid zeigten bei der GoodBerry-Population ein vergleichbares Umweltverhalten. Jedoch wiesen die GoodBerry-

Genotypen in Deutschland, einem in der GoodBerry-Studie am nördlichsten gelegenen Standort, eher geringe Gehalte dieser beiden Metaboliten auf.

Für die Gehalte von drei der fünf Anthocyane ließ sich ein signifikanter Einfluss der Umwelt feststellen. Die Pelargonidine Pelargonidin-3-glucosid und Epiafzelechin-pelargonidin-3-glucosid wiesen jeweils im Jahr 2017 verhältnismäßig hohe Gehalte in Frankreich und Spanien auf. 2018 in Polen und 2017 in Italien hatten die Erdbeeren besonders niedrige Gehalte dieser Metaboliten. Die niedrigsten Gehalte an Cyanidin-3-glucosid konnten jedoch 2018 in Frankreich festgestellt werden. Studien berichten von einem deutlichen Einfluss des Standortes auf die Anthocyane (Josuttis et al. 2012; Cocco et al. 2015). Palmieri et al. 2017 beschreiben diesen Einfluss jedoch im Vergleich zu den anderen Metaboliten als eher gering. Bei den Anthocyanen dominiert vermutlich ein genetischer Einfluss (Guerrero-Chavez et al. 2015).

Trotz der generell großen Varianz der Metabolitengehalte gab es einzelne Metaboliten, die unabhängig vom Erntejahr an einem Standort dieselben Tendenzen bezüglich ihrer Konzentrationen zeigten. Dies betrifft insbesondere die Flavonole. Die Flavonole können in Bezug auf den Standorteffekt in zwei Gruppen unterteilt werden. Die Mengen an Quercetin-glucosid, Quercetin-glucuronid und Kaempferol-glucuronid waren insbesondere in Früchten aus Frankreich gering, waren jedoch in Früchten aus Italien relativ hoch. Kaempferol-3-glucosid, Kaempferol-3-malonylglucosid, Kaempferol-3-acetyl/malonylglucosid und Quercetin-3-acetyl/malonylglucosid zeigten in Frankreich, Spanien und 2018 in Italien hohe, in Polen, Deutschland, sowie 2017 in Italien jedoch niedrige Gehalte. Wird die Ernte 2017 in Italien nicht miteinbezogen, was durch das späte Auspflanzen gerechtfertigt ist, kann die durch Josuttis et al. 2012 beschriebene Nord-Süd-Unterteilung für Kaempferol-3-malonylglucosid bestätigt werden. Die Unterteilung der Flavonole im GoodBerry-Datenset in zwei Gruppen lässt sich durch deren Fruchtgewebe-spezifische Konzentration erklären. Kaempferol-malonylglucose(hexose), Kaempferol-glucose(hexose) und Kaempferol-cumarylglucose(hexose) können nicht nur im Blütenboden sondern auch in den Nüsschen detektiert werden (Fait et al. 2008). Das bedeutet, dass das differenzierte Standortverhalten der Flavonole möglicherweise auf dem Unterschied der Flavonol-Synthese bzw. deren Umweltinteraktion zwischen Nüsschen und Blütenboden beruht. Im Buchweizen wurde die Expression zweier Flavonol-Synthasen unterschiedlich von den Regulatoren Abscisinsäure, Salicylsäure und Natriumchlorid beeinflusst (Li et al. 2013). In der Erdbeere werden auf Basis von Genanalysen bis zu acht verschiedene Flavonol-Synthasen erwartet (Almeida et al. 2007). In Kombination mit einer gewebespezifischen Genexpression könnte dies zu einer gewebspezifischen Umweltinteraktion führen. Alternativ könnten jedoch auch generell die Glucuronosyl-Transferase mit der Flavonoid-3'-Hydroxylase unabhängig von den

Acyltransferasen von der Umwelt beeinflusst werden. Interessanterweise gibt es eine Korrelation der Flavonole mit dem Trockengehalt der Früchte (Abbildung 62). Auch die Trockengehalte wiesen eine signifikante Abhängigkeit von dem Standort auf. Ein hoher Trockengehalt könnte allgemein auf kleinere Früchte, mit einem kleineren Blütenbodenanteil im Vergleich zu den Nüsschen, zurückzuführen sein. Die Nüsschen haben einen deutlich höheren Trockenmasseanteil als der Blütenboden und gelten als besonders Polyphenol-reich (Aaby et al. 2005). Die Gehalte, der in den Nüsschen vorkommenden Kaempferol-malonylglucose, Kaempferol-glucose und Kaempferol-cumarylglucose korrelierten jedoch negativ mit dem Trockengewicht, während die Gehalte der anderen Flavonole positiv damit korrelierten. Im Rahmen des GoodBerry-Projekts wurde auch das durchschnittliche Fruchtgewicht der Genotypen bestimmt. Mit diesem konnte jedoch keine signifikante Korrelation nach Spearman festgestellt werden. Dies kann darauf hindeuten, dass das Fruchtgewicht bzw. der Trockenmassenanteil nicht direkt mit dem Anteil der Nüsschen korreliert. Ein Grund hierfür wäre eine schwankende Anzahl an Nüsschen. Alternativ könnte dies auch der Beleg dafür sein, dass es keine spezifische Flavonol-Umwelt-Regulierung in den Nüsschen gibt. Es sollte auch beachtet werden, dass zwischen den Nüsschen und dem



B

Korrelationspartner	r_{SP}
Kaempferol-malonylglucosid	-0.40***
Kaempferol-glucosid	-0.41***
Kaempferol-cumarylglucosid	-0.48***
Kaempferol-acetyl/malonylglucosid	-0.59***
Quercetin-acetyl/malonyl-glucosid	0.16**
Quercetin-glucosid	0.43***
Quercetin-glucuronid	0.36***
Kaempferol-glucuronid	0.20**

Abbildung 62: Relative Konzentration der Flavonolglucoside in Abhängigkeit von der Trockenmasse – A: Korrelationsscatterplot der Gehalte an Quercetin-glucosid bzw. Kaempferol-glucosid mit den Trockenmassengehalten ausgewählter Genotypen angefarbt nach Standort und geformt nach Erntejahr; B: Korrelationswerte der Flavonolgehalte mit der Trockenmasse nach Spearman (*: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$). rot: entgegengesetzte Korrelation, blau: direkte Korrelation. Je dunkler die Farbe, desto stärker die jeweilige Korrelation.

Blütenboden eine Interaktion besteht. Beispielsweise induziert die Bildung von Auxin in den Nüsschen das Wachstum des Blütenbodens, weswegen die Größe des Blütenbodens mit der Anzahl der Nüsschen korreliert (Nitsch 1950). Ein weiterer Effekt des Pflanzenhormons Auxin ist die Repression des Transkriptionsfaktors MYB10, der die Flavonoid-Synthese beeinflusst (Medina-Puche et al. 2014). Dies verdeutlicht die Komplexität der Regulierungsmechanismen und damit der potenziellen Umwelteffekte.

Die Umwelt ist von mehreren Faktoren geprägt, die einen Einfluss auf die Metaboliten haben können. Zum einen spielt der Boden bzw. die Nährstoffversorgung eine Rolle. Eine Düngung kann zur Reduzierung der Flavonole, der Ellagsäure und der Anthocyane führen (Anttonen et al. 2006; Moor et al. 2005). Preciado-Rangel et al. 2020 folgerten, dass ein optimales Stickstoff-zu-Kalium-Verhältnis wichtig für die Bildung der Polyphenole ist. Aber auch das Kultivierungssystem beeinflusst die Konzentrationen der Sekundärmetaboliten. Treftz und Omaye 2015 konnten bei einer erdlosen Kultivierung einen signifikanten Anstieg der Gesamt-Polyphenole im Vergleich zu einer Erd-Kultivierung feststellen. Bei der erdlosen Kultivierung kann zudem das Substrat die Gehalte der Sekundärmetaboliten beeinflussen (Palencia et al. 2016). Bei erdhaltiger Kultivierung hat es einen Einfluss, ob die Pflanzen in matteden Reihen oder in Erdhügeln mit Plastik- oder Strohmulch angepflanzt werden (Wang und Millner 2009; Moor et al. 2005; Wang et al. 2002). Am Standort Frankreich wurde ein erdloses System für die Kultivierung verwendet. An den vier restlichen Standorten wurden die Pflanzen in Erde (jedoch unterschiedlicher Zusammensetzung) kultiviert. In Spanien wurden die Erdbeerpflanzen auf Erdhügeln, bedeckt mit einer Plastikmulch-Folie unter einem Folientunnel angebaut. In Italien, Polen und Deutschland erfolgte der Anbau auf offenem Feld. Die Kultivierungssysteme der GoodBerry-Population stellen daher einen potenziellen Einflussfaktor dar. Darüber hinaus haben das Pflanzdatum und die Frucht Nummer einer Erdbeerpflanze einen Effekt (Anttonen et al. 2006). Innerhalb des GoodBerry-Projekts wurden die Erdbeeren während der Hauptsaison geerntet. Jedoch hatten insbesondere die Pflanzen in Polen und 2017 in Italien oft nur geringe Fruchtansätze, die zu geringen Erträgen führten. In Italien wurden die Pflanzen 2016 darüber hinaus deutlich später angepflanzt (Ende statt Anfang August), was zur starken Differenz der Metabolitengehalte zwischen beiden Erntejahren beitragen könnte. Die Temperatur gilt als großer Einflussfaktor. Bei dem GoodBerry Projekt wurden die Erdbeeren an Standorten angebaut, die verschiedene Klimazonen und damit verschiedene Temperaturverläufe umfassten. Das südlichste Anbaugebiet, Huelva in Spanien, liegt in den Subtropen, während der nördlichste Standort, bei Skierniewice in Polen zur gemäßigten Zone gehört. Diese Unterschiede in den Temperaturverläufen wirkten sich deutlich auf den Erntezeitpunkt aus. Aber auch innerhalb eines Standortes konnten zwischen beiden Erntejahren deutliche Temperaturdifferenzen beobachtet werden. Josuttis et al. 2011 und Wang und Zheng 2001 folgerten aus ihren

Versuchen einen Anstieg der Gehalte einzelner Sekundärmetaboliten mit zunehmender Temperatur. Dies betraf jedoch bei beiden Studien nicht immer dieselben Metaboliten. Bei Josuttis et al. 2011 waren dies die Anthocyane, die Proanthocyanidine, die Ellagttannine und Kaempferol-3-malonylglucosid. Wang und Zheng 2001 beschrieben diesen Effekt für p-Cumarylhexose, Quercetin-3-glucosid, Quercetin-3-glucuronid, Kaempferol-3-glucosid und die Anthocyane Cyanidin-3-glucosid und Pelargonidin-3-glucosid. Matsushita et al. 2016 konnten hingegen eine Reduktion des *MYB10* Transkriptionsfaktors und damit eine Reduzierung der Anthocyane und reduzierte Expressionslevel der an deren Synthese beteiligten *DFR*, *FaGT* und *ANS* Gene feststellen, obwohl im Vergleich zu Wang und Zheng 2001 nur leicht veränderte Temperaturen angewandt wurden. Diese Differenzen könnten durch verschiedene Sorten oder Vorbehandlungen erklärt werden. Ein weiterer Umwelteffekt ist die Wasserversorgung. Ein durch Wassermangel induzierter Stress führt zur Erhöhung der Expression von *MYB10* und folglich auch zur Erhöhung der Anthocyane (Medina-Puche et al. 2014). Im GoodBerry-Projekt wurden die Pflanzen bewässert, ein kurzfristiger Wassermangel kann allerdings nicht ausgeschlossen werden. Das Licht ist ebenfalls ein Umweltfaktor. Die *MYB10*-Expression und dadurch auch die Bildung der Anthocyane kann durch Licht induziert werden (Kadomura-Ishikawa et al. 2015). Eine Filterung von UVB-Licht in Plastiktunneln führt zu reduzierten Gehalten an Cyanidin-3-glucosid, Quercetin-3-glucuronid, Kaempferol-3-glucosid und Kaempferol-3-glucuronid (Josuttis et al. 2010). In Frankreich, wo die Erdbeeren unter einem Tunnel kultiviert wurden, waren insbesondere Cyanidin-3-glucosid, Quercetin-3-glucuronid und Kaempferol-3-glucuronid reduziert.

Eine Vielzahl an Umweltbedingungen variierten an den verschiedenen GoodBerry-Standorten und zwischen den Erntejahren. Damit ist es schwierig für die Schwankungen der Metabolitkonzentrationen einzelne Umweltfaktoren als Ursache zu identifizieren.

4.1.2. Genotypeneffekt auf die Metabolitengehalte

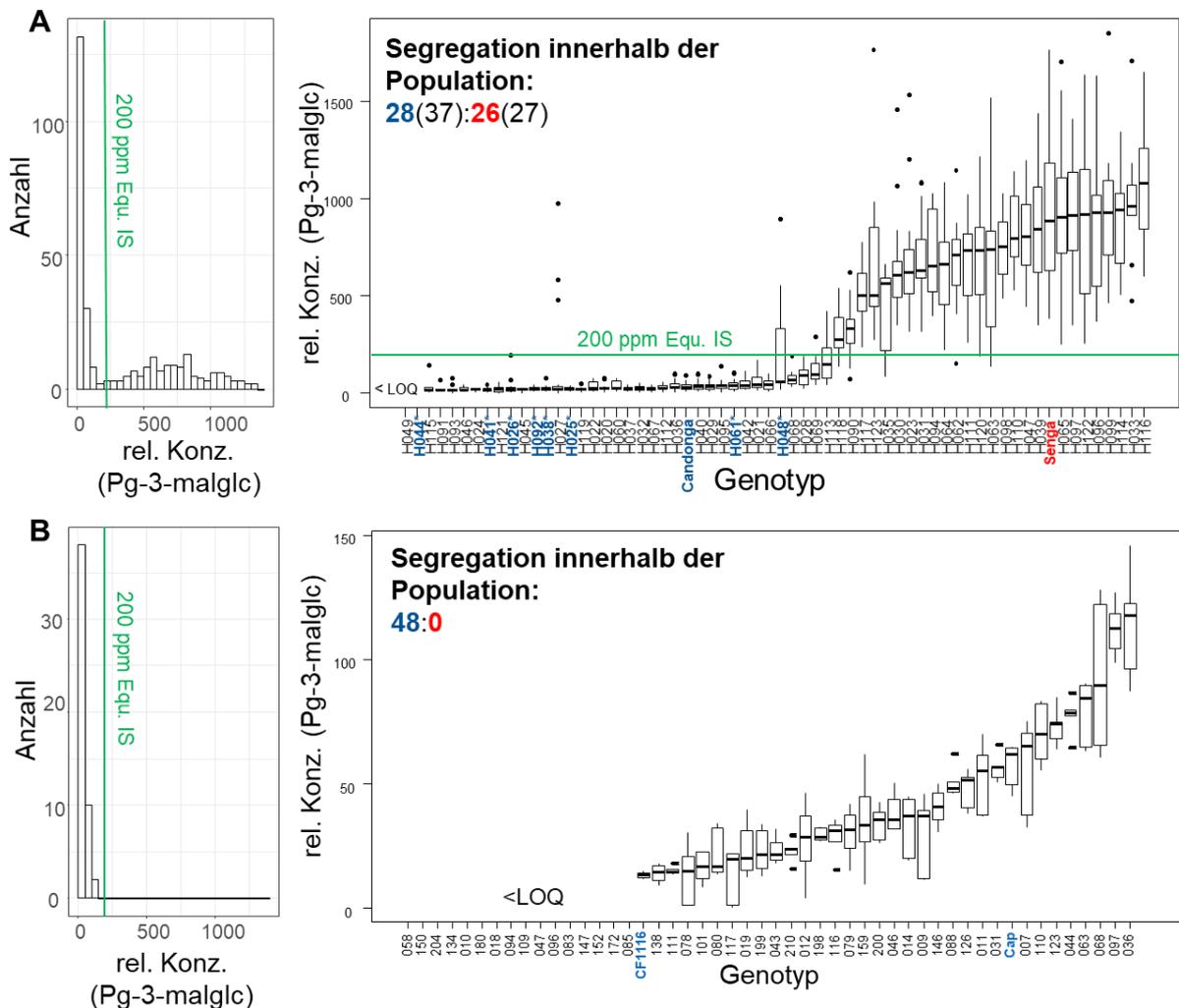
Im Gegensatz zu der französischen Kreuzungspopulation (Abbildung 19) befanden sich die Eltern der GoodBerry-Population (Abbildung 24 und Abbildung 25) bei der PCA-Analyse der Metabolitenkonzentrationen auch am Rand der Proben, sie neigten also auch zu Extremwerten innerhalb der Population an einzelnen Standorten. Dies kann dadurch bedingt sein, dass es sich bei 'Senga Sengana' und 'Candongga' im Gegensatz zu den Elternsorten der französischen Population um sehr unterschiedliche Sorten handelt. 'Candongga' ist eine spanische Varietät, während es sich bei 'Senga Sengana' um eine deutsche Züchtung handelt. Somit kann für beide Sorten eine unterschiedliche Adaption an Umweltbedingungen erwartet werden.

Die geringsten Schwankungen der Metabolitengehalte zwischen den Genotypen waren bei den beiden Primärmetaboliten Äpfelsäure und Citronensäure, sowie bei dem Anthocyan Pelargonidin-3-glucosid zu erkennen. Im Schnitt lag hier ein Faktor von etwa zwei zwischen dem Genotyp mit dem niedrigsten und dem Genotyp mit dem höchsten Gehalt. Möglicherweise ist der Genotypeneffekt auf die Primärmetaboliten geringer ausgeprägt als auf die Sekundärmetaboliten. Der Primärmetabolismus ist unter anderem für die Energieversorgung zuständig und als solches für das Überleben der Pflanze unabdingbar. Vielen Primärmetaboliten obliegt eine Schlüsselrolle im Metaboliten-Netzwerk. Das bedeutet aber auch, dass Änderungen eines einzelnen Metaboliten sich stark auf den gesamten Metabolismus auswirken können. Möglicherweise ist der Evolutionsdruck die Gene, die im Primärmetabolismus involviert sind, zu erhalten, deutlich größer als bei dem Sekundärmetabolismus, da Mutationen in den involvierten Genen weitreichendere Folgen haben können. Der Sekundärmetabolit Pelargonidin-3-glucosid wies auch relativ geringe Schwankungen zwischen den Genotypen auf. Bei Pelargonidin-3-glucosid handelt es sich mit einem Anteil von ca. 77 – 90 % um das Hauptanthocyan der Erdbeere (Lopes-da-Silva et al. 2007). Die relativ geringe Schwankung könnte analog der beiden Primärmetaboliten auf eine zentrale Bedeutung dieses Anthocyans hinweisen, jedoch existieren auch weiße Erdbeeren, also Erdbeeren mit keinen bzw. geringen Anthocyangehalten (Franz-Oberdorf et al. 2017a; Zhao et al. 2018). Eine alternative Hypothese ist, dass durch die Züchtung vorwiegend Genotypen mit starker Farbe bevorzugt wurden. Pelargonidin-3-glucosid trägt maßgeblich zu der Färbung bei. Diese Selektion führte möglicherweise zu einer geringen Variabilität des Genpools der Elternsorten und dadurch zu relativ konstanten Gehalten innerhalb der untersuchten Erdbeerpopulationen. Analysen aus der Literatur zeigen jedoch eine deutlich höhere Variabilität an Pelarginidin-3-glucosid zwischen verschiedenen Sorten (Aaby et al. 2012). Darüber hinaus sollte auch erwähnt werden, dass bei der hier angewandten Methode die Erdbeerextrakte stark konzentriert wurden, um auch Minor-Bestandteile zu erfassen. Da Pelargonidin-3-glucosid in sehr hohen Konzentrationen in der Erdbeere vorkommt und nur eine relative Quantifizierung durchgeführt wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich dessen Konzentrationen im Gegensatz zu den anderen Analyten nicht mehr in einem linearen Messbereich, sondern in einem Sättigungsbereich bei der Detektion an der LC-MS befanden, die zu einer Unterbewertung der Variabilität der Pelargonidin-3-glucosid-Gehalte führte. Gleiches könnte auch für die Citronensäure und die Äpfelsäure gelten.

Bei beiden Populationen war hingegen bei den malonylierten Anthocyanen Pelargonidin-3-malonylglucosid und Cyanidin-3-malonylglucosid eine sehr hohe Differenz zwischen Gehalten in den Genotypen zu erkennen. In beiden Fällen wiesen einzelne Genotypen auch Gehalte unter den Bestimmungsgrenzen auf. Die GoodBerry-Population zeichnete sich durch eine noch höhere Varianz, bedingt durch teils höhere Konzentrationen der malonylierten

Anthocyane, aus. Bei der französischen Population lag der Faktor zwischen Bestimmungsgrenze und höchster mittlerer Genotypen-Konzentration bei ca. 10, während bei der GoodBerry-Population mit 100 der Faktor deutlich größer war. Basierend auf einer Konzentrationsgrenze von 200 ppm Equ. IS an Pelargonidin-3-malonylglucosid kann die GoodBerry-Population in eine Genotypen-Gruppe mit hohen Gehalten und Genotypen mit niedrigen Gehalten an malonylierten Anthocyanen unterteilt werden. Grundlage hierfür ist ein ähnliches Verhalten von Pelargonidin-3-malonylglucosid und Cyanidin-3-malonylglucosid. Dieses Phänomen konnte auch schon durch Yoshida und Tamura 2005 beobachtet werden. Auf Basis der Aufteilung an Hand der Konzentration an Pelargonidin-3-malonylglucosid ergibt sich eine Segregation der GoodBerry-Population von 28 : 26. Interessanterweise gehören die Elternsorte 'Candonga', sowie deren Inzuchtlinien, zu der Genotypen-Gruppe der niedrigen Konzentration, während sich 'Senga Sengana' zu der hohen-Konzentrations-Gruppe zuordnen

Abbildung 63: Varianz der Pelargonidin-3-malonylglucosid-Gehalte in den beiden untersuchten Erdbeerkreuzungspopulationen – A: Histogramm und Boxplots der Pelargonidin-3-maloylglucosid-Gehalte der Genotypen der GoodBerry-Population; B: Histogramm und Boxplots der Pelargonidin-3-maloylglucosid-Gehalte der Genotypen der französischen Kreuzungspopulation; *: Inzuchtlinie; die Elternsorten und Inzuchtlinien sind gemäß der Konzentrationsgrenze von 200 ppm Equ. IS gefärbt. Bei fehlenden Boxplots liegen die Gehalte unter der Bestimmungsgrenze (LOQ).



lässt. In der französischen Population haben alle Genotypen, auch beide Eltern 'CF1116' und 'Camarosa', Gehalte unter 200 ppm Equ. IS an Pelargonidin-3-malonylglucosid (Abbildung 63).

Die Segregation, die deutlich bei den malonylierten Anthocyanen zu erkennen ist, konnte nicht bei den malonylierten Flavonolen beobachtet werden.

Bei Anwendung der mendelschen Vererbungs-Regeln (Mendel 1866) bedeutet die 1:1 Aufspaltung der GoodBerry-Population bezüglich der malonylierten Anthocyanen, sowie die fehlende Aufspaltung in den 'Candonge'-Inzuchtlinien und der französischen Population, im Rückschluss, dass ein dominantes Gen für die Vererbung der hohen Konzentrationen an den malonylierten Anthocyanen verantwortlich ist. Dieses dominante Gen liegt heterozygot in 'Senga Sengana' vor, fehlt aber in den Varietäten 'Candonge', 'CF1116' und 'Capitola'. Auch über die weiteren im Rahmen dieser Arbeit analysierten Sorten kann eine Aussage bezüglich der Konzentrationen der malonylierten Anthocyanen bzw. der Vererbung des verantwortlichen Gens getroffen werden. Die niederländische Sorte 'Elsanta' hat hohe Gehalte, besitzt also das verantwortliche Gen, während 'Camarosa', eine Züchtung aus Kalifornien, eine niedrige Konzentration der malonylierten Anthocyanen hat und folglich dieses Gen nicht besitzen sollte.

Yoshida et al. 2000 kamen in ihrer Studie über die Vererbung von Pelargonidin-3-malonylglucosid zu ähnlichen Ergebnissen. Jedoch unterschieden sie bei der Vererbung nicht zwischen Genotypen niedriger Gehalte und hoher Gehalte, sondern zwischen Genotypen mit oder Genotypen ohne das malonylierte Anthocyan. Vermutlich ist dies auf die verwendeten Analysemethoden zurückzuführen. Während in dieser Arbeit 1 g Probenmaterial in 0,070 ml gelöst wurde waren es bei Yoshida et al. 2000 3,0 ml. Darüber hinaus wurde in dieser Arbeit mit einer LC-MS gearbeitet, während Yoshida et al. 2000 ein einfaches HPLC-System für die Analyse der Erdbeerextrakte verwendeten. Die hier angewendete Analysemethode ist deutlich sensitiver als die von Yoshida et al. 2000. Bei den in der Studie von Yoshida et al. 2000 als Genotypen ohne Pelargonidin-malonylglucosid bezeichneten Genotypen handelt es sich vermutlich analog dieser Arbeit um Genotypen mit einer geringen Konzentration an dem malonyliertem Anthocyan.

Spurenmengen an malonylierten Anthocyanen können auch allein auf deren Vorkommen in den Nüsschen zurückzuführen sein, wenn ganze Früchte (mit Nüsschen) aufgearbeitet werden (Yoshida und Tamura 2005). Die Verteilung der Anthocyanen ist stark von dem Fruchtgewebe abhängig. Im Fruchtfleisch dominiert Pelargonidin-3-glucosid, während in den Nüsschen das Verhältnis von Cyanidin-3-glucosid und Pelargonidin-3-glucosid annähernd ausgeglichen ist (Aaby et al. 2005). Das Verhältnis des malonylierten zu dem nicht-malonylierten Pelargonidin-3-glucosid ist in den Nüsschen größer (Aaby et al. 2005; Yoshida und Tamura 2005).

Der Gehalt an malonylierten Anthocyanen könnte auch durch ein mit HCl angesäuertes Extraktionsmittel bzw. eine starke Einengung des Extrakts und damit Aufkonzentrierung der enthaltenen Säuren unterbewertet werden (Lopes-da-Silva et al. 2007). Die Esterbindung der verknüpften aliphatischen Säuren kann durch sehr niedrige pH-Werte hydrolysiert werden. Bei der verwendeten Methode wurde vollständig auf eine Ansäuerung des Lösungsmittels verzichtet. Die Erdbeerextrakte inklusive der natürlich vorkommenden Säuren wurden jedoch stark eingengt und dennoch wurden auch sehr geringe Gehalte an malonylierten Anthocyanen detektiert.

Yoshida et al. 2000 untersuchten nicht nur die Kreuzungs-Population von zwei Sorten mit niedrigen Konzentrationen an Pelargonidin-3-malonylglucosid bzw. fehlendem Pelargonidin-3-malonylglucosid, sowie zweier Sorten, die sich bezüglich dieses Merkmals unterschieden, sondern auch eine Inzuchtlinie einer Sorte mit hohen Gehalten. Für die Inzuchtlinie ergab sich eine 3 : 1 Aufspaltung der Population. Offensichtlich ist die verwendete Elternsorte 'Nyoho' ebenfalls heterocygot bezüglich dieses Merkmals. Darüber hinaus konnten Yoshida et al. 2000 die Vererbung des Phänotypen bzgl. Pelargonidin-3-malonylglucosid in der Züchtung der japanischen Sorten nachvollziehen. Dabei kamen sie zu der Schlussfolgerung, dass das für den Pelargonidin-3-malonylglucosid-Phänotypen verantwortliche Gen in den japanischen Sorten hoher Konzentrationen vermutlich überwiegend heterocygot vorliegt und die homocygote Vorlage dieses Gens sich daher eventuell negativ auf die Fruchtproduktion auswirken könnte.

Ein großer Unterschied bezüglich der malonylierten Anthocyane kann nicht nur in Erdbeeren, sondern auch in anderen Pflanzenarten festgestellt werden. Analog den Erdbeeren können rote Mais (*Zea Mays*)-Linien nach Malonylierungsgrad der Anthocyane in zwei Genotyp-Gruppen unterteilt werden (Paulsmeyer et al. 2017). Durch QTL-Analysen einer Kreuzung von Genotypen, mit unterschiedlichen Malonylierungsgrad, gelang es eine Malonyltransferase auf Chromosom 1 zu identifizieren, die für die differenzierte Ausprägung der Malonylierung innerhalb der Kreuzungspopulation (3 : 1 Segregation) verantwortlich ist. Der Knockout dieses Gens in einer Transposon getaggen Linie der UniformMu-Linien bestätigte die Funktion des Gens.

Auch in Wein (*Vitis vinifera*) kann ein ähnliches Phänomen beobachtet werden. Varietäten wie 'Cabernet Sauvignon' enthalten acylierte Anthocyane, während es anderen Varietäten wie 'Pinot Noir' an diesen Anthocyanen mangelt (Rinaldo et al. 2015). In dem Fall von 'Pinot Noir' konnte eine Mutation im Gen der Malonyltransferase Vv3AT, die zu einer Verkürzung des Proteins führt, als Ursache für die fehlenden acylierten Anthocyane identifiziert werden.

Die Acylierung von Anthocyanen in Wein erhöht die Stabilität der Anthocyane und kann dadurch zu einer verlängerten Farbstabilität beitragen (van Buren et al. 1968). Diese Beobachtung konnte von Suzuki et al. 2002 durch Experimente mit Cyanidin, Cyanidin-3-glucosid und Cyanidin-3-malonylglucosid bestätigt werden. Bei pH 2 konnte nach mehrstündiger Inkubation bei 30 °C keine Veränderung der Absorption der drei Anthocyan-Formen bei 520 nm beobachtet werden. Bei pH 5 und pH 7 wurde die Absorption nach einer Stunde deutlich reduziert. Diese Reduzierung war bei dem Malonylglucosid (-48 % bzw. -38 %) deutlich am schwächsten. Das Glucosid zeigte mit -96 % bzw. -70 % eine leicht bessere Absorption als das Aglykon Cyanidin mit -100 % bzw. -70 %. Durch Ansäuerung konnte dieser Absorptionsverlust bei dem Glucosid und dem Malonylglucosid im Gegensatz zu dem Aglykon wieder vollständig ausgeglichen werden. Basis hierfür ist das Gleichgewicht der Anthocyane zwischen verschiedenen molekularen Strukturen (Abbildung 64) (Brouillard und Dubois 1977). Nur eine Gleichgewichtsform, das Flavylium-Ion, ist verantwortlich für die rote Farbe des Cyanidins (Mazza 1993). Der pH-Wert hat jedoch einen starken Einfluss auf das Gleichgewicht. Bei höheren pH-Werten wird der Anteil an Flavylium-Ion zunehmend reduziert. Die Malonylierung erhöht die pH-Toleranz der Flavylium-Form und sorgt dadurch für eine höhere Farbstabilität bzw. -intensität auch bei höheren pH-Bereichen (Suzuki et al. 2002). Diese Eigenschaft der malonylierten Anthocyane bzw. der Erdbeergenotypen mit erhöhten Gehalten an Cyanidin-3-malonylglucosid und Pelargonidin-3-malonylglucosid könnte auch kommerziell für Erdbeerprodukte von Interesse sein. Farbe und Farbstabilität ist ein Teil der Produktqualität. Eine weitere Eigenschaft der malonylierten Anthocyane ist der Schutz vor Deglucosylierung durch β -Glucosidasen (Suzuki et al. 2002).

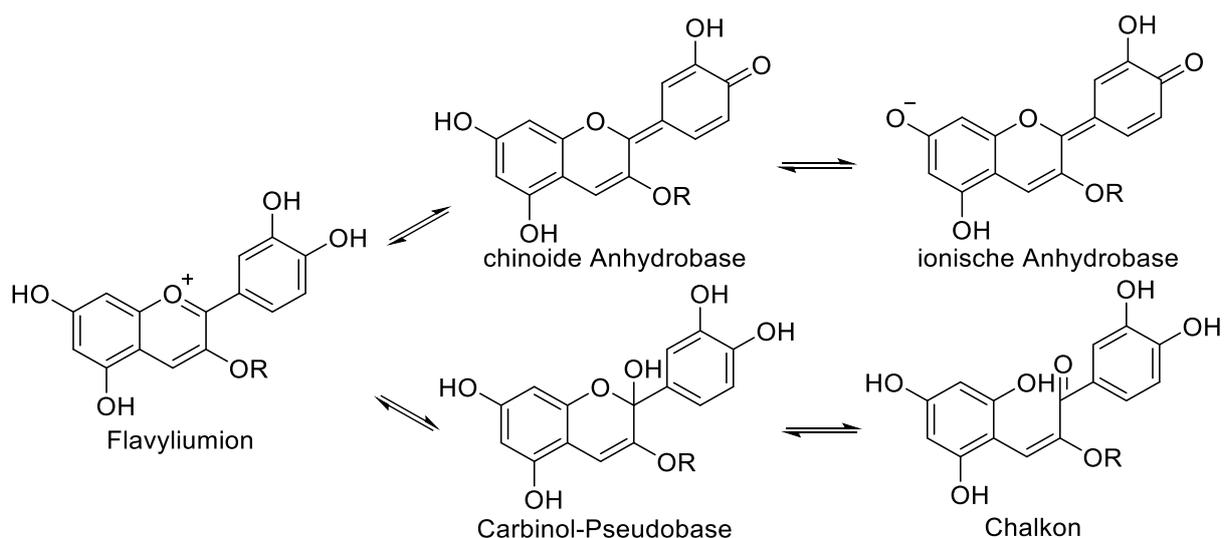


Abbildung 64: Anthocyan Gleichgewicht nach Mazza et al. 2002; R = Glucose

Eine Diskriminierung bezüglich der Malonylierung in verschiedenen Pflanzen-Varietäten kann jedoch nicht nur bei Anthocyanen, sondern auch bei anderen Flavonoiden, wie den Flavonolen

beobachtet werden. In Blättern von Maulbeeren (*Morus spp.*) wird die Bildung von Quercetin-3-malonylglucosid vermutlich durch ein dominantes Gen vererbt (Sugiyama et al. 2013).

Die Konzentration der Sekundärmetaboliten wird stark von dem Genotyp beeinflusst. Die Konzentrationen einzelner Metaboliten, wie der malonylierten Anthocyane, lässt sich deutlich auf die Vererbung durch einen Elternteil innerhalb der Population zurückführen. Dies unterstreicht die Bedeutung der Auswahl der Elternlinien bei der Züchtung. Für andere Metaboliten, wie den Flavanolen, ergaben sich auch deutlich höhere Gehalte einzelner Genotypen als bei den Eltern, was die Komplexität der Vererbung verdeutlicht.

Die Züchtung neuer Sorten ist ein langwieriger Prozess und umfasst nicht nur die Kreuzung zweier Eltern, sondern auch die Vermehrung, Bewertung und Auslese der Nachkommen über mehrere Jahre hinweg (Petit 2017; Soria 2017). Um gezielter neue Sorten zu züchten, können an Hand von Genmarkern schon im frühen Zuchtstadium verlässliche Vorauslesen stattfinden (Mezzetti et al. 2018). Die Basis dafür ist eine valide Identifizierung von Genmarkern (Folta et al. 2011). Hierfür ist die Kombination von Genanalysen in Verbindung mit Phänotyp-Parametern, wie dem Gehalt einzelner Metaboliten entscheidend (Slovin und Michael 2011). Im Rahmen des GoodBerry-Projekts sollen die hier dargestellten Metaboliten-Daten auch mit separat analysierten QTL- und Transkriptom-Daten verknüpft werden.

4.1.3. Korrelationen der Metabolitengehalte

Die Metabolitengehalte der Genotypen der GoodBerry-Population und der französischen Kreuzungspopulation wurden gemäß Spearman auf Korrelationen analysiert. Die mit am stärksten ausgeprägten Korrelationen betrafen die analysierten Flavanole. Die Gehalte dieser Metaboliten korrelierten stets stark signifikant positiv miteinander. Die Korrelation war dabei unabhängig vom Polymerisierungsgrad und Monomer.

Proanthocyanidine, oder auch kondensierte Tannine genannt, entstehen durch die Polymerisierung von Flavanol-Monomeren, wie Catechin (He et al. 2008). Die Verknüpfung der Monomere findet üblicherweise zwischen C4, der oberen Einheit, und C8 oder C6, der unteren Einheit, durch eine α - oder β -Bindung statt (Bruyne et al. 1999). Darüber hinaus besteht auch noch die Möglichkeit einer Etherbindung des C2 der oberen Einheit mit dem Sauerstoff der Hydroxygruppe an C7 oder C5 der unteren Einheit (Gu et al. 2003). Des Weiteren können Proanthocyanidine oder die Flavanol-Monomere auch mit Gallussäure oder anderen Acylgruppen, wie Phenylpropanoiden, verestert werden (Constabel 2018). In der Erdbeere wurden bisher jedoch nur B-Procyanidine bzw. B-Proanthocyanidine ohne Acylierung nachgewiesen (Enomoto et al. 2019; He et al. 2008; Gu et al. 2003). Der B-Namenszusatz beschreibt Proanthocyanidine mit einer Bindung zwischen C4 und C8 oder C6

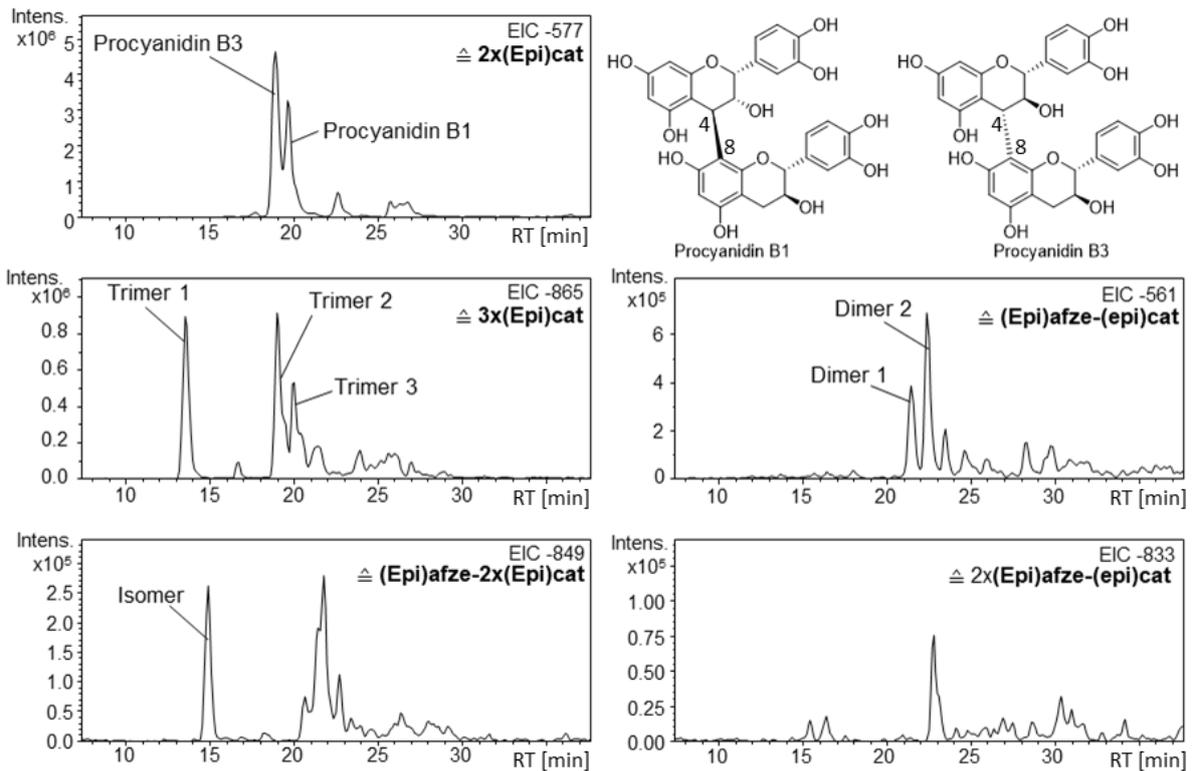


Abbildung 65: Ionenspur-Chromatogramme für die Bestimmung von Flavanolen – quantifizierte Peaks sind markiert; EIC: extrahiertes Ionenchromatogramm mit Nennung des selektierten m/z Verhältnis und dem Modus (negativ).

(He et al. 2008). Der durchschnittliche Polymerisierungsgrad, also die Anzahl der Monomer-Einheiten, der Erdbeeren betrug in der Studie von Buendía et al. 2010 abhängig von der Sorte zwischen 3,4 und 5,8. Im Vergleich dazu haben Himbeeren eine durchschnittlichen Polymerisierungsgrad von 2,1 und schwarze Johannisbeeren hingegen von 38,7 (Gu et al. 2003). Da bei der vorliegenden Arbeit die Detektion mittels LC-MS auf einen niedermolekularen Bereich beschränkt war, konnten die Proanthocyanidine nur bis zu einem Polymerisierungsgrad von 3, also Monomere, Dimere und Trimere bestimmt werden. Obwohl im Massenspektrum noch weitere Proanthocyanidine zu vermuten waren, beschränkte sich die Analyse zudem auf wiederholt gut trennbare und eindeutig identifizierbare Produktpeaks (Abbildung 65). Die Endeinheit der Erdbeer-Proanthocyanidine ist ausschließlich (Epi)catechin (Buendía et al. 2010). Davon sind ca. 60 % Catechin und ca. 40 % Epicatechin (Gu et al. 2003). In den Verlängerungseinheiten dominiert mit einem Anteil von 60 – 70 % erneut (Epi)catechin gegenüber (Epi)afzelechin mit nur 6 – 10 % (Buendía et al. 2010). Im Gegensatz zu den Endeinheiten überwiegt hier jedoch deutlich Epicatechin gegenüber Catechin (Gu et al. 2003). Obwohl sehr viel über die Strukturen und den Biosyntheseweg der Proanthocyanidine bekannt ist, ist der Polymerisierungsmechanismus noch nicht vollständig aufgeklärt (James et al. 2017). Es wird sowohl ein enzymatischer (mittels Polyphenoloxidase) als auch ein nicht enzymatischer Mechanismus diskutiert (He et al. 2008). Eine zentrale Rolle in diesen Theorien spielt das Carbokation, das durch einen nucleophilen Angriff von (Epi)catechin zur Polymerisierung führen könnte. Die kürzlich erschienene Studie von Wang

et al. 2020 konnte erstmals Carbokationen nachweisen und die Bildung von Procyanidin B2 und B3 simulieren, wodurch die Rolle des Carbokations bestätigt werden konnte. Die Vielfalt an Proanthocyanidinen in den Erdbeerfrüchten, sowie die starke Korrelation untereinander unabhängig vom Polymerisierungsgrad deuteten auf eine relativ ungesteuerte Polymerisierung hin. Dies könnte auch durch die Beteiligung des Carbokations erklärt werden. Nach Initiation ausgelöst durch die Oxidation des Flavanol-Monomers, unterliegt das Carbokation möglicherweise ungerichtet einem nucleophilen Angriff anderer Flavane. Jedoch wurde bei der Analyse anderer Pflanzengewebe deutlich, dass die Zusammensetzung der Proanthocyanidine abhängig vom Zellgewebe auch variieren kann. Darüber hinaus kann der Polymerisierungsgrad der Erdbeerfrüchte variieren (Buendía et al. 2010). Das bedeutet, dass bei der Polymerisierung ein Kontrollmechanismus vorhanden ist, der diese steuert. Dies könnte zum einen durch die Verfügbarkeit der Monomere oder zum anderen auch durch andere Einflussfaktoren, wie dem pH-Wert, geschehen. Ein ähnlicher Kontrollmechanismus wird auch für die Polymerisierung von Lignin, einem weiteren Polyphenol-Polymer, angenommen (Tobimatsu und Schuetz 2019). Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass die Acidifizierung der Vakuole mittels einer Plasmamembran H^+ -ATPase essentiell für die Bildung von Proanthocyanidinen in *Arabidopsis thaliana* ist (Baxter et al. 2005). Eine Steuerung der Struktur der Endprodukte könnte möglicherweise auch über Dirigierende Proteine erfolgen (Tobimatsu und Schuetz 2019; Effenberger et al. 2017). Aber nicht nur die Gehalte der Polymere korrelieren untereinander, sondern auch der Gehalt an Catechin korreliert ebenso stark mit denen der Proanthocyanidinen. Das deutet darauf hin, dass die Polymerisierung ein essenzieller Prozess für die Pflanze ist. Die Polymerisierung verhindert möglicherweise, dass Flavan-3-ole, wie Catechin, phytotoxische Konzentrationen annehmen (Kaushik et al. 2010; Baxter et al. 2005). Außerdem verändert die Polymerisierung die chemischen und biologischen Eigenschaften der Ursprungsmoleküle. Eine Besonderheit der Proanthocyanidine ist ihre adstringierende bzw. Protein-bindende Eigenschaft, auf Grund derer sie auch kondensierte Tannine genannt werden (Bruyne et al. 1999; Peleg et al. 1999; Hagerman und Butler 1981; Hofmann et al. 2006). Analog dazu erhöht die Polymerisierung auch die antimikrobiellen und antiviralen Eigenschaften der Proanthocyanidine (Takechi et al. 1985; Baldé et al. 1991). In der Erdbeerfrucht sind Flavan-3-ole hauptsächlich in den Nüsschen, der Haut und den Leitbündeln vorhanden und tragen dort vermutlich zum Schutz vor Pathogenen bei (Nizioł et al. 2019; Enomoto et al. 2019). Interessanterweise sind Proanthocyanidine, die nur (Epi)catechine enthalten, in höheren Konzentrationen in den Leitbündeln als in der Epidermis enthalten, während Proanthocyanidine mit (Epi)afzelechin Einheiten in beiden Geweben in etwa gleichen Konzentrationen vorhanden sind (Enomoto et al. 2019). Die Analyse der gesamten Erdbeerfrucht zeigte keine Differenzierung bezüglich der enthaltenen Untereinheiten der Proanthocyanidine.

Bei der GoodBerry-Population und der französischen Kreuzungspopulation traten neben der sehr starken Korrelation innerhalb der Flavanolgehalte auch positive Korrelationen innerhalb der Anthocyangehalte auf. Diese waren jedoch überwiegend schwächer ausgeprägt als bei den Flavanol- und Anthocyan-Paar spezifisch. Eine der stärksten Korrelationen konnte stets zwischen den Gehalten an Cyanidin-3-glucosid und Cyanidin-3-malonylglucosid beobachtet werden. Im Gegensatz dazu war die Korrelation innerhalb der Pelargonidin-Gehalte deutlich geringer ausgeprägt. In der französischen Population konnte keine signifikante Korrelation der Konzentration von Pelargonidin-3-malonylglucosid mit Pelarginidin-3-glucosid bestimmt werden. Ebenso korrelierte der Pelargonidin-3-malonylglucosid-Gehalt nicht mit dem Cyanidin-3-malonylglucosid-Gehalt. Diese Tatsache ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass in der französischen Population ausschließlich Genotypen mit geringen Gehalten an malonylierten Anthocyanen vorhanden sind, weswegen der Korrelationseffekt der Genotypen mit hohen Gehalten fehlt, der in der GoodBerry-Population vorhanden ist. Auf Grund der geringen Gehalte an Pelargonidin-3-malonylglucosid in den Früchten der Genotypen könnten unterschiedliche Biosyntheseraten, die die Menge des Pelargonidin-3-glucosids beeinflussen die Signifikanz der direkten Korrelation mit dem Gehalt des malonylierten Metaboliten mindern. Ein interessanter Aspekt im Bezug auf die GoodBerry-Population war die Genotypen-abhängige Korrelation der Gehalte beider malonylierten Anthocyane mit ihren nicht malonylierten biosynthetischen Vorläufern Pelargonidin-3-glucosid und Cyanidin-3-glucosid, die verdeutlichte, dass der Grund für die unterschiedlichen Konzentrationen an malonylierten Anthocyanen auf eine unterschiedliche Umsetzungsrate bzw. Aktivität von Anthocyan-Malonyltransferasen zurückzuführen ist. In Bezug auf die Korrelation wurde die Umsetzungsrate des Pelargonidins mit der des Cyanidins miteinander verglichen. Dabei fiel auf, dass in den Genotypen mit niedriger Malonyltransferase-Aktivität im Verhältnis mehr Cyanidin-3-glucosid umgesetzt wurde als Pelargonidin-3-glucosid im Vergleich zu den Genotypen mit einer hohen Aktivität. Dies könnte nicht nur auf eine unterschiedliche Enzymaktivität, sondern auch Substratspezifität der involvierten Malonyltransferasen hindeuten. Yoshida und Tamura 2005 postulieren, dass Spurenmengen an malonylierten Anthocyanen immer in den Nüsschen zu finden sind. Außerdem konnten sie im Blütenboden und Nüsschen von Genotypen niedriger Konzentrationen an malonylierten Anthocyanen ein annähernd gleiches Verhältnis der Cyanidine feststellen, während das Verhältnis von Pelargonidin-3-malonylglucosid zu Pelargonidin-3-glucosid im Blütenboden deutlich geringer ausfiel als in den Nüsschen. In Erdbeeren mit hohen Gehalten war bei beiden Verhältnissen kein wesentlicher Unterschied zwischen Blütenboden und Nüsschen feststellbar, was wiederum die Hypothese unterschiedlicher Enzymaktivität und Substratspezifitäten zwischen den Erdbeergenotypen unterstützen würde.

Die Gehalte der malonylierten Anthocyane wiesen auch eine Korrelation zu den Gehalten der malonylierten Flavonolen auf. Bei Pelargonidin-3-malonylglucosid war diese besonders stark mit Kaempferol-3-malonylglucosid und bei Cyanidin-3-malonylglucosid mit Quercetin-3-acetyl/malonylglucosid ausgeprägt. Dies kann durch eine Substratpromiskuität der Malonyltransferasen erklärt werden, die neben den Anthocyanen auch Flavonole akzeptieren können. Pelargonidin und Kaempferol haben dieselbe Struktur im B-Ring (4'-Hydroxylierung). Für Cyanidin und Quercetin ist eine zusätzliche Hydroxylierung mittels Flavonoid-3'-Hydroxylase für ihre 3',4'-Hydroxy-B-Ring Struktur notwendig, wodurch die bessere Korrelation erklärt werden kann.

Anhand der Konzentrationen an Quercetin-malonylglucosid und Kaempferol-malonylglucosid war keine klare Differenzierung in Genotypen mit niedrigem und hohem Gehalt möglich. Dies bedeutet, dass die Malonyltransferase, die für den erhöhten Gehalt an malonylierten Anthocyanen im Blütenboden die Ursache ist, nicht im selben Ausmaß auch die Gehalte an malonylierten Flavonolen erhöht. Die betreffende Malonyltransferase weist wahrscheinlich eine hohe Substratpräferenz für Anthocyane auf. Eine andere mögliche Ursache wäre ein gewebespezifisches Vorhandensein von Substraten. Fait et al. 2008 berichten von einer besonders hohen Konzentration von Kaempferol-malonylhexosid in den Nüsschen reifer Erdbeerfrüchte. In der Erdbeerfrucht ist Kaempferol-hexosid am höchsten in den Nüsschen des weißen Fruchtstadiums konzentriert. In der reifen Frucht hat Kaempferol-hexosid im Blütenboden jedoch eine etwas höhere Konzentration als in den Nüsschen bei diesem Fruchtstadium. Darüber hinaus konnten Fait et al. 2008 einzig im Blütenboden der reifen Frucht Kaempferol-acetylhexosid nachweisen. Die Acetyl-substituierten Flavonole können zur Konzentration in den Misch-Spuren beitragen und so die Korrelation beeinflussen.

In beiden unterschiedlichen Erdbeerpopulationen korrelierten die Gehalte der Anthocyane auch mit denen weiterer Flavonole und auch den Gehalten der Flavanole. Die Korrelation mit den Flavanolgehalten war jedoch bei den Pelargonidin-Derivaten, wenn signifikant vorhanden, bei der französischen Population stets positiv und bei der GoodBerry-Population überwiegend negativ ausgeprägt. Auch bei den Flavonolgehalten überwog in der französischen Population eine positive Korrelation mit den Pelargonidinen, während bei der GoodBerry-Population eine negative Korrelation überwog. Dieses gegenläufige Verhalten spiegelt den Einfluss der Genotypen wider. Während in der französischen Population überwiegend die Gesamtregulierung der Flavonoid-Synthese im Vordergrund steht, hat die Konkurrenz um die Endprodukte bei der GoodBerry-Population eine größere Bedeutung. Da bei der GoodBerry-Population für den Cyanidin-3-glucosid-Gehalt im Gegensatz zu den Pelargonidinen in der Regel auch eine positive Korrelation mit den Flavonolen und Flavanolen zu beobachten war,

deutet dies auch auf eine bedeutendere Rolle der Flavonoid-3'-Hydroxylase beim Metaboliten-Fluss in der GoodBerry-Population hin.

Eine Korrelation, die jedoch unabhängig von der Erdbeerpopulation auftrat, war eine negative Korrelation der Ellagsäure-Gehalte mit den Glutathion-Gehalten. Im Gegensatz dazu tendierten die Flavanolgehalte zu einer positiven Korrelation mit den Glutathion-Gehalten.

Glutathion ist ein ubiquitär vorkommendes Tripeptid bestehend aus Glutaminsäure, die über die γ -Carboxgruppe an Cystein gebunden ist, sowie Glycin (Abbildung 66) (Beutler 1989). Die Bioaktivität des Glutathions ist vor allem durch die Thiol-Gruppe des

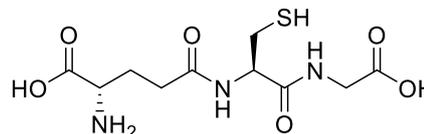


Abbildung 66: Glutathion

Cysteins bedingt (Zagorchev et al. 2013). Glutathion oder Glutathion-Homologe sind lebensnotwendig für Pflanzen (Cairns et al. 2006), aber auch für andere Organismen wie Säugetiere (Meister 1994). Glutathion ist ein zentrales Element des Redox-Systems der Zellen (Foyer und Noctor 2005). Es ist auch als Cofaktor bei vielen biochemischen Reaktionen beteiligt (Noctor et al. 2012). Neben der funktionellen Ähnlichkeit mit den Polyphenolen als Antioxidanz interagiert Glutathion mit den Flavonoiden als ein Element deren Transportsystems (Zhao 2015). Vor Kurzem konnte nachgewiesen werden, dass die Aufnahme von Cyanidin-3-glucosid mittels ABC-Transporter abhängig von einem Co-Transport von Glutathion ist (Behrens et al. 2019). Die Proanthocyanidine werden in den Vakuolen der Pflanzen synthetisiert, daher ist der Transport der Flavanole zu diesem Zellkompartiment entscheidend, wodurch die positive Korrelation der Flavanolgehalte mit den Glutathion-Gehalten erklärt werden kann. Dies erklärt jedoch nicht die negative Korrelation mit dem Ellagsäure-Gehalt. Jedoch ist für die HHDP-galloyl-glucose, welches über den gleichen Syntheseweg wie die Ellagsäure produziert wird, keine signifikante Korrelation der Gehalte mit den Glutathion-Gehalten zu erkennen. Das deutet darauf hin, dass Ellagsäure eine besondere Rolle im Pflanzen-Metabolismus hat, möglicherweise als Regulator.

4.2. Allergengehalte der GoodBerry-Kreuzungspopulation 'Senga Sengana' x 'Candongga'

Von einem Subset der Genotypen der GoodBerry-Population wurde mittels indirekt kompetitiven ELISA der Fra a 1-Gehalt der Erdbeerfrüchte bestimmt. Die Variation des analysierten Allergengehaltes befand sich in einem ähnlichen Bereich wie bei den Analysen verschiedener *Fragaria*-Varietäten von Kurze et al. 2018. Ebenso konnte innerhalb einer Saison an einem Standort ein Effekt des Genotyps, sowie zwischen den Jahren ein saisonaler Effekt beobachtet werden. Auch Alm et al. 2007 kamen zu dem Schluss, dass sowohl der

Genotyp als auch die Wachstumsbedingungen den Gehalt an Fra a 1 beeinflussen und folgerten das deswegen für eine Beurteilung eines Genotyps dieser unter verschiedenen Umweltbedingungen betrachtet werden sollte. Allerdings zeichnete sich innerhalb der GoodBerry-Population kein Genotyp aus, der über die beiden beprobten Jahre und alle Standorte hinweg einen signifikant höheren oder niedrigeren Allergengehalt aufwies. Dies deutet auf eine starke Umwelt-Genotypen-Interaktion von Fra a 1 hin.

Der beobachtete saisonale Effekt betraf insbesondere einen signifikanten Anstieg der Allergengehalte in Deutschland im Jahr 2018 im Vergleich zum Vorjahr. Studien von Ishibashi et al. 2019 konnten ebenfalls einen saisonalen Effekt bei der Genexpression von Fra a 1.01 erkennen und führten dies auf einen Kältestress zurück, da erhöhte Proteingehalte vor allem in den Wintermonaten feststellbar waren und eine Beschattung keinen Effekt zeigte.

Bei Vergleich der Wetterdaten des deutschen Standorts (Hansabred) fällt auf, dass sich der Temperaturverlauf der beiden Anbau-Jahre deutlich unterscheidet (Abbildung 67). Im Frühjahr 2018 kam es nach einem milden Winter im Gegensatz zum Vorjahr zu zwei Frostperioden, gefolgt von deutlich höheren Temperaturen im April, die auch zu einer etwas früheren Ernte als im Vorjahr führten. Dieser Temperaturstress könnte also die Ursache der erhöhten Fra a 1-Gehalte im Jahr 2018 in Deutschland sein. Jedoch waren ähnliche Wettereffekte auch am Standort in Polen zu sehen. Darüber hinaus wurden in Polen im Gegensatz zu Deutschland Frost-Effekte auf die Erdbeerpflanzen nicht mit einem Anti-Frost-Fließ gemildert. Für die polnischen Proben konnte aber nur für den Genotyp H110 ein signifikant höherer Fra a 1-Gehalt im Vergleich zum Vorjahr beobachtet werden. Hohe Temperaturen während der Fruchtreifung im Gegensatz zu milden und homogeneren Bedingungen waren bei Tulipani et al. 2008 eine Erklärung für reduzierte Fra a 1-Gehalte in grünen und rot/weißen Früchten. Jedoch konnte bei der reifen Frucht keine eindeutige Tendenz mehr festgestellt werden. Auch eine der vier untersuchten Varietäten verhielt sich bei der Fruchtreifung gegenläufig.

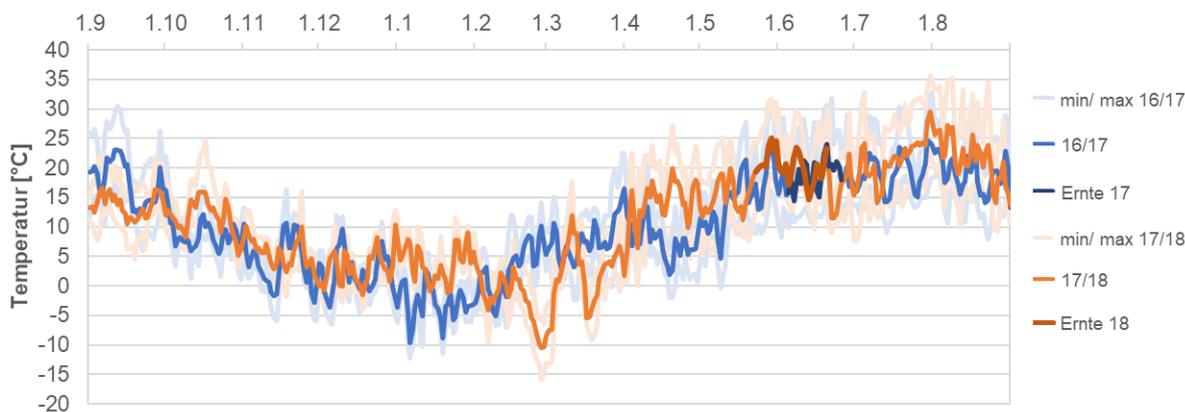


Abbildung 67: Temperaturverlauf in Deutschland (am Standort Hansabred) der Anbaujahre 2016/2017 und 2017/2018 – min/ max: Temperaturminimum bzw. –maximum. Hervorgehoben sind die Ernteperioden (Ernte) der Früchte in den Jahren 2017 bzw. 2018. blau: Temperaturverlauf 2016/2017, blau: Temperaturverlauf 2017/2018.

Okochi et al. 2020 konnten zeigen, dass die Auswirkungen der Kälte auf das Erdbeerallergen *Fra a 1.01* Pflanzenorgan-spezifisch sind. Eine Kältebehandlung bei 4 °C über 28 Tage führte bei der Krone und den Wurzeln zu einem starken Anstieg und bei den reifen Früchten zu einem leichten Anstieg des *Fra a 1.01*-Transkriptionslevels. In Blättern wurde das Transkriptionslevel jedoch gleichzeitig reduziert. Okochi et al. 2020 postulierten, dass durch eine Kältebehandlung der jungen Früchte die Proteine im reifen Fruchtstadium vermehrt angesammelt werden könnten.

Unabhängig von der Temperatur gibt es noch weitere Einflussfaktoren, die die Gehalte der *Fra a 1*-Homologen beeinflussen. Eine Behandlung geernteter Früchte mit UVC führte zu einer erhöhten Konzentration an *Fra a 1*-Proteinen (Severo et al. 2015). Besbes et al. 2019b konnten durch eine Pathogen-Infektion die Transkription von PR-10-Homologen erhöhen. Die Veränderung war Gen- und Organ-abhängig.

Die Genexpression in verschiedenen Pflanzenorganen ist für jedes *Fra a 1*-Homolog unterschiedlich (Muñoz et al. 2010; Besbes 2018). Auch die Phosphorylierungs-abhängige RNase-Aktivität der *Fra 1* Homologe ist Isoform-spezifisch. Folglich ist die Funktion der *Fra a 1*-Proteine abhängig vom Homolog. Bei der Quantifizierung mittels ELISA wird nicht selektiv ein *Fra a 1*-Homolog quantifiziert. Auf Grund der großen strukturellen Ähnlichkeit kann der polyklonale IgE-Antikörper potenziell verschiedene Homologe binden. In Kombination mit einer unterschiedlichen Sensitivität der Homologe auf Umweltreize sowie einer Genotypen-Abhängigkeit der einzelnen Homologe könnte dies zu der starken Genotyp-Umwelt-Interaktion des *Fra a 1*-Gehaltes beitragen.

Die *Fra a 1*-Gehalte wurden auf Korrelation mit den Metabolitengehalten analysiert. Die beiden am deutlichsten ausgeprägten Korrelationen konnten zwischen den *Fra a 1*-Gehalten und Glutathion- (positiv) und Cyanidin-3-malonylglucosid- (negativ) Gehalten beobachtet werden. Negative Korrelationen waren auch mit Pelargonidin-3-malonylglucosid und Cyanidin-3-glucosid vorhanden.

Muñoz et al. 2010 konnten bereits eine Korrelation zwischen den Gehalten der Anthocyane und der *Fra a 1.01*- und *Fra a 1.03*-Expression feststellen. Eine transiente Herunterregulierung der *Fra a 1*-Expression in Früchten via Agroinfiltration resultierte in reduzierten Gehalten an Pelargonidin-3-glucosid, Pelargonidin-3-malonylglucosid und Cyanidin-3-glucosid bedingt durch eine verringerte Expression des Phenylalanin-Ammonial-Lyase-Gens (*PAL*) und des Chalkonsynthase-Gens (*CHS*). Jedoch impliziert dies eine positive Korrelation, während das vorliegende Datenset eine negative Korrelation zeigt. Darüber hinaus konnte im vorliegenden Datensatz keine Korrelation mit dem Gehalt des Hauptanthocyans der Erdbeere, Pelargonidin-3-glucosid, abgeleitet werden.

Die Malonylierung wird mit einer verbesserten Aufnahmefähigkeit in die Vakuole in Verbindung gebracht. Es existieren MATE-Transporter die spezifisch acylierte Anthocyane transportieren können (Gomez et al. 2009). Diese kommen überwiegend im Tonoplast vor. Der Verlust des Anthocyan-Transporters MATE2 im Gestutzten Schneckenklee (*Medicago truncatula*) resultierte in reduzierten Anthocyangehalten (Zhao et al. 2011). Dies verdeutlicht, dass der zelluläre Transport der Metaboliten ein zentrales Element bei der Lenkung der Metaboliten-Ströme ist. Eine Verringerung bzw. Erhöhung der Malonylierung könnte sich potenziell ebenso auf den Metaboliten-Fluss auswirken, da die Transportfähigkeit der Anthocyane in die Vakuole verändert wird.

Fra a 1-Proteine können Flavonoide binden und verringern dadurch möglicherweise die Diffusion oder spielen beim Transport der Flavonoide in spezifische Zellkompartimente eine Rolle (Casañal et al. 2013). Die negative Korrelation der Fra a 1-Gehalte mit den malonylierten Anthocyanen könnte darauf zurückzuführen sein, dass Fra a 1 einen alternativen Transport- bzw. Regulierungsprozess im Vergleich zur Malonylierung darstellt.

Glutathion ist Teil des Pflanzenabwehrsystems (Hasanuzzaman et al. 2017). Glutathion kann Radikale binden und dadurch den ROS-Spiegel in der Pflanze regulieren (Zagorchev et al. 2013). ROS in Pflanzen können durch Stress induziert werden und sind ein wichtiges Pflanzensignal (Meyer 2008; Noctor et al. 2002). Ein erhöhter Glutathion-Gehalt in Pflanzen wird in Verbindung mit verbesserter Toleranz gegenüber hohem Salzgehalt (Roxas et al. 1997; Ruiz und Blumwald 2002), Dürre (Hasanuzzaman und Fujita 2011; Alam et al. 2013) und Temperaturstress (Kocsy et al. 2001; Kocsy et al. 2002; Dash und Mohanty 2002) gebracht. Hohe Temperaturen und eine intensive Sonneneinstrahlung führen im Apfel zu einer Erhöhung des Glutathion-Gehaltes (Zhang et al. 2008a). Erhöhte Konzentrationen an Glutathion können sich wiederum auf die Bildung von Pflanzenhormonen, wie Absisinsäure, Auxin und Jasmonat, auswirken (Cheng et al. 2015). Auch die Transkription von *CHS* kann durch die Bindung von Glutathion an dessen Promoter-Region reguliert werden (Dron et al. 1988). Analog dazu könnte Glutathion auch die Bildung von Fra a 1 regulieren.

Darüber hinaus besteht bei Glutathion eine Verbindung mit dem Transport von Flavonoiden. Neben dem MATE-Transportern, die bevorzugt malonylierte Anthocyane transportieren, existiert auch noch die Möglichkeit des Transports der Anthocyane in die Vakuole über ABC-Transporter (Zhao und Dixon 2010). Behrens et al. 2019 konnten nachweisen, dass der Transport des Anthocyan Cyanidin-3-glucosid mittels ABC-Transporter in *Arabidopsis* abhängig von einem Co-Transport von Glutathion ist.

4.3. Identifizierung von Anthocyan-Malonyltransferasen der Erdbeere

Malonyltransferasen sind an diversen Reaktionen des Primär- und des Sekundärmetabolismus im pflanzlichen, teils aber auch menschlichen und mikrobiellen Organismus beteiligt. Die Reaktion, die durch diese Enzyme katalysiert wird, ist die Übertragung einer Malonyl-Einheit auf ein Akzeptor-Molekül.

Eine der bekanntesten Malonylierungen betrifft die Fettsäurebiosynthese. Die schrittweise Übertragung von Malonyl-Einheiten auf ein Acyl-Akzeptor, gefolgt von einer Decarboxylierung ermöglicht die Elongation um C₂-Einheiten und somit die Synthese der Fettsäuren (Ohlrogge und Jaworski 1997). Aber auch bei der Synthese der Polyphenole spielt die Übertragung von Malonyl-Einheiten eine entscheidende Rolle. Der Übergang der Phenylpropanoide zu den Flavonoiden basiert auf einer schrittweisen Übertragung von drei Malonyl-Einheiten durch die Chalkonsynthase, jeweils gefolgt von einer Decarboxylierung (Dao et al. 2011). Unabhängig von der Beteiligung an Schlüsselreaktionen zentraler Biosynthesewege ist die Malonylierung eine gängige Modifizierung von Biosynthese-Produkten. Dies betrifft Proteine (Hirschey und Zhao 2015; Ishiguro et al. 2018; Peng et al. 2011), Aromastoff-Glucoside (Withopf et al. 1997; Tikunov et al. 2010), aber auch Polyphenole, wie die Anthocyane (Matern et al. 1983). Die Malonylierung kann zum einen die Stabilität verbessern (Suzuki et al. 2002), aber auch die Bioaktivität verändern (Li et al. 2018; Ishiguro et al. 2018; Koirala et al. 2014; Taguchi et al. 2005). Außerdem beeinflusst sie bei Pflanzen die Aufnahmefähigkeit in die Vakuole (Gomez et al. 2009; Zhao et al. 2011). Auf Grund dieser Eigenschaften ist die Malonylierung auch Teil des Phase II Metabolismus der Pflanzen und kann zum Entgiften von Herbiziden beitragen (Cobb und Reade 2010).

Anthocyan-Malonyltransferasen und auch alle anderen Malonyltransferasen benötigen für die Übertragung der Malonyl-Einheiten Malonyl-CoA (Sasaki und Nagano 2004). Malonyl-CoA wird hauptsächlich durch Acetyl-CoA Carboxylasen synthetisiert (Kannangara und Stumpf 1972). Dabei werden zwei Moleküle Acetyl-CoA mit Hilfe von Biotin zu Malonyl-CoA addiert. Darüber hinaus besteht auch die Möglichkeit einer direkten Veresterung von Malonsäure über eine Malonyl-CoA-Synthase (Chen et al. 2011).

4.3.1. Aktivitäten der FaMAT-Kandidaten

Es wurden jeweils fünf allelische, potenzielle Anthocyan-Malonyltransferase Kandidaten-Gene der GoodBerry-Elternsorten 'Senga Sengana' und 'Candongga' isoliert, in *E. coli* transformiert und die Aktivität der aufgereinigten rekombinanten Proteine in einem *in vitro* Assay getestet. Die Gene wurden aufgrund der Sequenzinformation des *Fragaria vesca* Genoms identifiziert.

Die Proteinsequenzidentität der Kandidaten von 'Candonga' und 'Senga Sengana' variierte zwischen 80,8 % und 100 %. Diese basiert auf DNA Sequenzidentitäten von 96,9 % bis 100 %. Zwei der Kandidaten (FaMATS2 und FaMATS4 bei 'Senga Sengana') wiesen ein vorzeitiges Stopp-Codon auf und wurden deshalb nicht auf Aktivität getestet.

Für drei Homologe (*Gen 04261* (*F. vesca*): allelische Formen in *F. x ananassa*: *FaMATS1*, *FaMATC1*; *Gen 29347*: *FaMATC4*) konnte für die kodierten Proteine eine katalytische Aktivität für alle getesteten Substrate (Anthocyane, Flavonol-glucoside, Furaneol-glucosid) nachgewiesen werden. Die weiteren drei Kandidaten (abgeleitete Proteine von *Gen 04262*, *Gen 03835* und *Gen 04266*), aus 'Candonga'- und 'Senga Sengana'-Homologen zeigten keine Aktivität.

Vorangegangene Studien von Anthocyan-Acyltransferasen in u.a. Feuersalbei (*Salvia splendens*), Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*), Chrysanthemen (*Dendranthema morifolium*) und Dahlien (*Dahlia variabilis*) ermöglichten die Identifizierung konservierter Aminosäure-Sequenz Motive der Anthocyan-Malonyltransferasen (Suzuki et al. 2001; Unno et al. 2007; D'Auria et al. 2007; D'Auria 2006; Suzuki et al. 2002). Durch Mutationsstudien konnte belegt werden, dass eine Veränderung dieser Motive zu starken Veränderungen der Enzym-Aktivität führt (Bayer et al. 2004; Suzuki et al. 2003). Einer dieser konservierten Proteinsequenz-Bereiche ist das HxxxD-Motiv (Unno et al. 2007). Es gilt als wichtig für die Substratbindung von BAHD-ATs (Bontpart et al. 2015). Mit Ausnahme der Proteine FaMATC5 und FaMATS5 (wobei es sich um die Orthologe des vom *F. vesca* *Gen 04266* kodierten Proteins handelt), weisen alle untersuchten Kandidaten dieses Motiv auf (Abbildung 68). Bei diesen Proteinen befinden sich an dieser Stelle ein HxxxxD Motiv. Ein weiteres wichtiges Motiv der BAHD-ATs und somit auch der Anthocyan-Malonyltransferasen ist das DFGWG-Motiv, dem vermutlich eine strukturelle Bedeutung innewohnt (Unno et al. 2007; Bontpart et al. 2015). Alle untersuchten Proteine, mit Ausnahme der rekombinanten vom *Gen 03835* abgeleiteten Proteine (FaMATC3/S3), haben dieses Motiv.

Das DFGWG-Motiv befindet sich im hinteren Bereich der Proteinsequenz einer Malonyltransferase (ab ca. AS 433). Die Sequenzen von FaMATC3 und FaMATS3 sind jedoch stark verkürzt und enden schon vor dieser Aminosäuren-Position. Das dritte Motiv YFGNC ist spezifisch für Anthocyan-Acyltransferasen, gilt jedoch als weniger konserviert (Nakayama et al. 2003; Suzuki et al. 2003; Manjasetty et al. 2012; Suzuki et al. 2004b). Dieses Motiv ist in allen Proteinsequenzen, mit Ausnahme von FaMATC3, FaMATS3 und FaMATS2 enthalten.

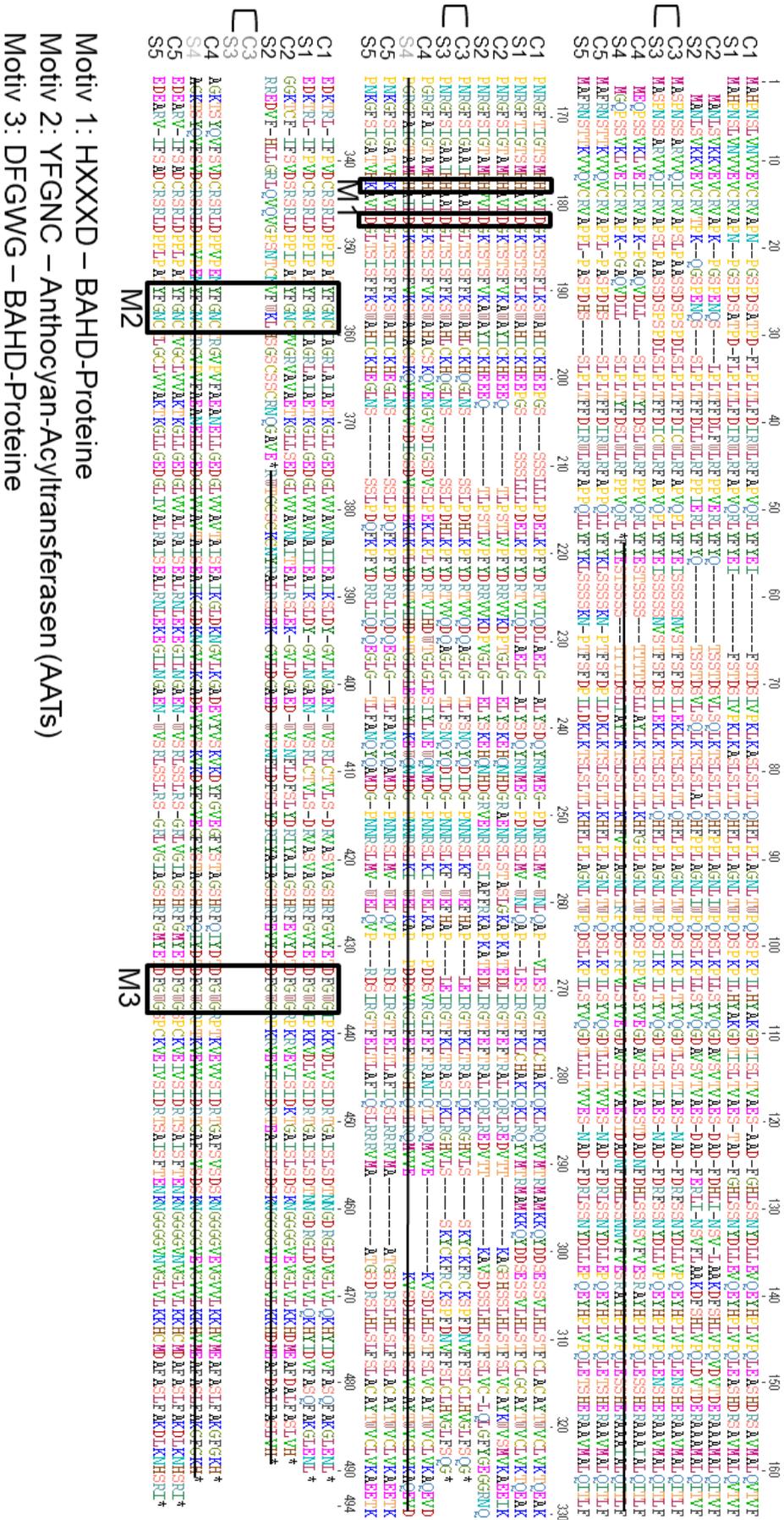


Abbildung 68: Protein-Sequenzalignment der jeweils 5 Malonyltransferase-Kandidaten aus ‘Candonga’ (C1 bis C5) und ‘Senga Sengana’ (S1-S5)

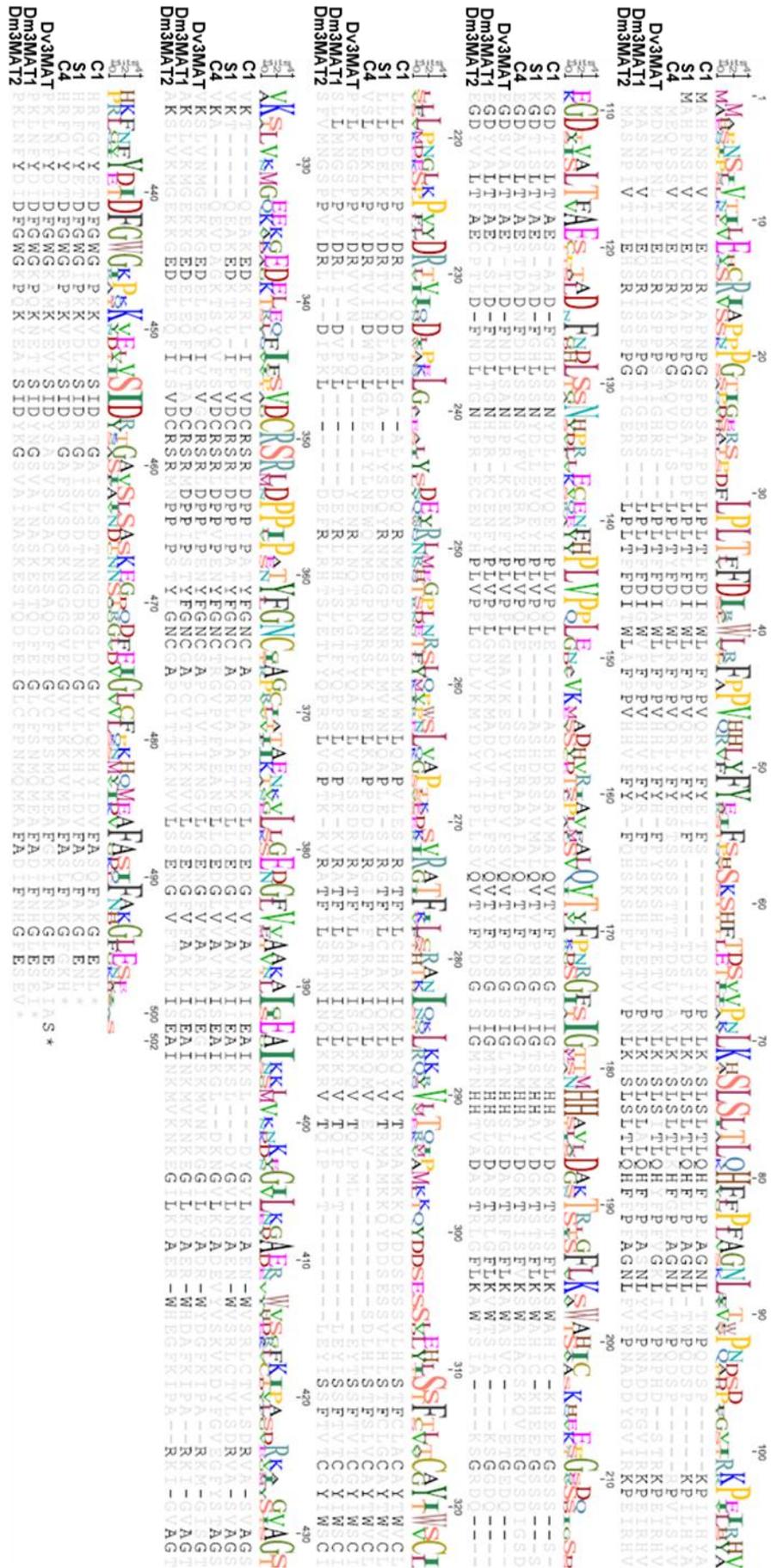


Abbildung 69: Proteinsequenz-Alignment der aktiven FaMATs mit Anthocyan-3-glucosid-6''-O-MATs der Literatur

Für FaMATC3 und FaMATS3 konnte im Malonyltransferase-Aktivitäts-Assay keine Aktivität nachgewiesen werden. Der Grund liegt in der Verkürzung der Sequenz, die u.a. auch zum Verlust der funktionell wichtigen Motive DFGWG und YFGNC führte. Auch die Inaktivität von C5 und S5 gegenüber den Glucosiden kann aus der Proteinsequenz abgeleitet werden. Die Inklusion einer zusätzlichen Aminosäure in das HxxxD Motivs zu HxxxxD könnte in diesem Fall die Ursache sein. Dies könnte jedoch auch zu einem veränderten Substratspektrum führen, d.h. die präferierten Substrate sind noch unbekannt. C2, für das ebenfalls keine Aktivität nachgewiesen werden konnte, wies jedoch sämtliche konservierte Motive auf. Dessen Inaktivität kann also im Gegensatz zu den anderen Kandidaten nicht auf die fehlenden drei bekannten konservierten Motive zurückgeführt werden. Möglicherweise gilt die Inaktivität dieses Enzyms nur für die fünf getesteten Acyl-Akzeptor Substrate oder FaMATC2 benötigt einen anderen Acyl-Donor anstelle von Malonyl-CoA.

Beim Vergleich der identifizierten FaMATs der Erdbeere mit Anthocyan-3-glucosid-6“-O-MATs aus der Literatur (Suzuki et al. 2002; Suzuki et al. 2004a) fallen neben den bereits beschriebenen konservierten Sequenz-Motiven zusätzliche Überlappungen der Sequenzen auf. Insgesamt sind aber nur 21,8 % der Aminosäuren identisch (Abbildung 69). Potenziell lassen sich die spezifisch für die Anthocyan-3-glucosid-6“-O-MAT-Aktivität nötigen Struktur motive folglich erweitern. Bei einem Einzel-Alignment der Erdbeer-MATs mit den MATs aus Dahlie und Chrysanthemen ergibt sich eine Übereinstimmung von mindestens 32,1 % (Tabelle 27). Erwartungsgemäß ist die Übereinstimmung der Sequenzen insbesondere innerhalb einer Spezies bzw. einer Familie besonders hoch. Dahlie und Chrysantheme gehören beide zur Familie der Korbblütler (*Asteraceae*) und sogar zur selben Unterfamilie (*Asteroidae*). *Fragaria x ananassa* gehört hingegen zu den Rosengewächsen und ist daher nur sehr entfernt mit Dahlie und Chrysantheme verwandt. Die Sequenzidentität der beiden FaMATs ist mit maximal 58,4 % geringer als die zwischen Dahlie und Chrysantheme mit mindestens 59,5 %.

Tabelle 27: Sequenzübereinstimmung der FaMATs mit Anthocyan-3-glucosid-6“-O-MATs aus der Literatur – Dv3MAT: MAT aus Dahlie (Suzuki et al. 2002); Dm3MAT1 und Dm3MAT2: MATs aus Chrysanthemen (Suzuki et al. 2004a). rot: > 50 %, blau: < 50 %. Die Farbintensität vertieft sich bis zu 100 % bzw. 0 % Sequenzübereinstimmung.

MAT	FaMATS1	FaMATC1	FaMATC4	Dv3MAT	Dm3MAT1	Dm3MAT2
FaMATS1	100 %	99,4 %	58,4 %	33,2 %	32,6 %	32,6 %
FaMATC1	99,4 %	100 %	58,0 %	32,5 %	32,2 %	32,0 %
FaMATC4	58,4 %	58,0 %	100 %	34,4 %	32,1 %	32,1 %
Dv3MAT	33,2 %	32,5 %	34,4 %	100 %	70,1 %	69,5 %
Dm3MAT1	32,6 %	32,2 %	32,1 %	70,1 %	100 %	88,9 %
Dm3MAT2	32,6 %	32,0 %	32,1 %	69,5 %	88,9 %	100 %

Auch FaMATC2, für das auf Grund der drei enthaltenen konservierten Anthocyan-MAT-Motive eine Aktivität zu erwarten gewesen wäre, wurde mit den Sequenzen der aktiven Anthocyan-Malonyltransferasen verglichen. Bei Inklusion dieser Sequenz in das Alignment aller Proteine reduzierten sich die identischen Stellen von 21,8 % auf 19,2 %. Bei den fehlenden Sequenz-Motiven in C2 handelt es sich um zehn betroffene Aminosäure-Positionen. U.a. fehlten L (98), D (106), N (113), P (122), L (127), C (282), sowie zwei Aminosäuren folgend K, C (302), K (398) und G (443). Möglicherweise sind diese Aminosäuren wichtig für die Bindungen der verwendeten Substrate oder die Proteinstruktur, weswegen C2 keine Aktivität im Assay aufwies.

In der durchgeführten Studie wiesen alle aktiven Enzyme eine Substratpromiskuität auf. Sie akzeptierten, sowohl Anthocyane, Flavonole als auch Furaneol-glucosid als Acyl-Akzeptor. In der Literatur werden AATs hingegen als relativ spezifisch für Anthocyane als Acyl-Akzeptor-Substrate beschrieben. Die Angaben reichen von 6,8 % bis 44 % für die Umsetzung von Flavonolen im Vergleich zu dem am besten umgesetzten Anthocyan (Luo et al. 2007; Suzuki et al. 2002; Suzuki et al. 2004a). In dieser Studie wurde jedoch insbesondere auch das Flavonol Quercetin-3-glucosid sehr gut umgesetzt. Jedoch wurde hier mit 16 h eine im Vergleich deutlich längere Inkubation gewählt. Bei Suzuki et al. 2002 betrug die Inkubationszeit nur 20 min. Liu et al. 2017 inkubierten für ihre Studie der MATs aus *Nicotiana benthamiana* hingegen für 12 h und konnten für diverse Polyphenolklassen (Flavonol-, Dihydroflavon-, Isoflavon-, Cumarin- und Phenylethyl Chromon-Glycoside) eine ähnliche Aktivität feststellen. Es wurden keine Anthocyane getestet. Dieses Beispiel verdeutlicht jedoch die Auswirkungen von Reaktionsbedingungen, wie der Reaktionszeit. Für die vollständige Beurteilung der relativen Umsetzungsrate eines Substrates ist eine genaue Enzymcharakterisierung notwendig.

4.3.2. Malonylierung von HDMF-glucosid

Furaneol (HDMF) ist ein wichtiger Aromastoff der Erdbeere (Schieberle und Hofmann 1997), kommt aber auch in anderen Früchten, wie der Ananas (Rodin et al. 1965), der Tomate (Buttery et al. 1995), der Kiwi (Garcia et al. 2011) und der Litschi (Ong und Acree 1999) vor. Darüber hinaus kann Furaneol auch im Verlauf der Maillard-Reaktion entstehen und ist auf Grund seiner Karamell-Note ein wichtiger Aromastoff bei prozessierten Lebensmitteln (Slaughter 1999).

In Pflanzen liegt ein Teil des Furaneols gebunden als Glucosid oder Malonylglucosid vor (Schwab 2013). Der Vorteil des Glucosids gegenüber dem Aglykon ist eine deutlich erhöhte Stabilität. Roscher et al. (1997) konnten zeigen, dass HDMF-glucosid bei pH 2,0 bis 8,0 eine

deutlich erhöhte Stabilität im Vergleich zum Furaneol aufweist (Halbwertszeit $\geq 365 - 102$ Tage statt Halbwertszeit = 141 - 4 Tage). Die Halbwertszeit von HDMF-malonylglucosid ist nur geringfügig größer als die des HDMFs. Unter den stabilsten Bedingungen aller drei HDMF-Varianten bei pH 3,5 weist das Malonylglucosid sogar die geringste Stabilität aller drei Moleküle auf. Jedoch wird dieses stets zu dem Glucosid abgebaut, dass die deutlich größte pH-Stabilität hat. Das Malonylglucosid bietet durch seine Stabilität gegenüber β -Glucosidasen einen Vorteil im Vergleich zum Glucosid. Für den enzymatischen Abbau ist beim Malonylglucosid zunächst eine Abspaltung der Malonyl-Gruppe durch eine Malonyl-Esterase notwendig.

Studien von Roscher et al. 1998 und Pérez et al. 1999 belegen, dass D-Fruktose-1,6-diphosphat der Ausgangsstoff für die Biosynthese von Furaneol in der Erdbeere ist (Abbildung 70). Mit Hilfe eines oder mehrerer bisher unbekannter Enzyme kann aus dem Zuckerphosphat unter Abspaltung von Phosphat und Wasser HMMF, der Vorläufer von HDMF, entstehen (Schwab et al. 2008). Die Reaktion von HMMF zu HDMF wird durch eine Enon-Oxidoreduktase (FaEO) katalysiert (Raab et al. 2006; Klein et al. 2007). Im Anschluss kann HDMF durch eine O-Methyltransferase (FaOMT) zu dem Aromastoff DMMF reagieren (Wein et al. 2002). Wie bereits erwähnt, wird ein Teil des HDMFs jedoch auch glucosyliert. Song et al. 2016 gelang die Identifizierung mehrerer Glucosyltransferasen in der Erdbeere, die die Bildung von Furaneol-glucosid ermöglichen. Die identifizierten Malonyltransferasen können die daran anschließende Bildung von Furaneol-malonylglucosid katalysieren.

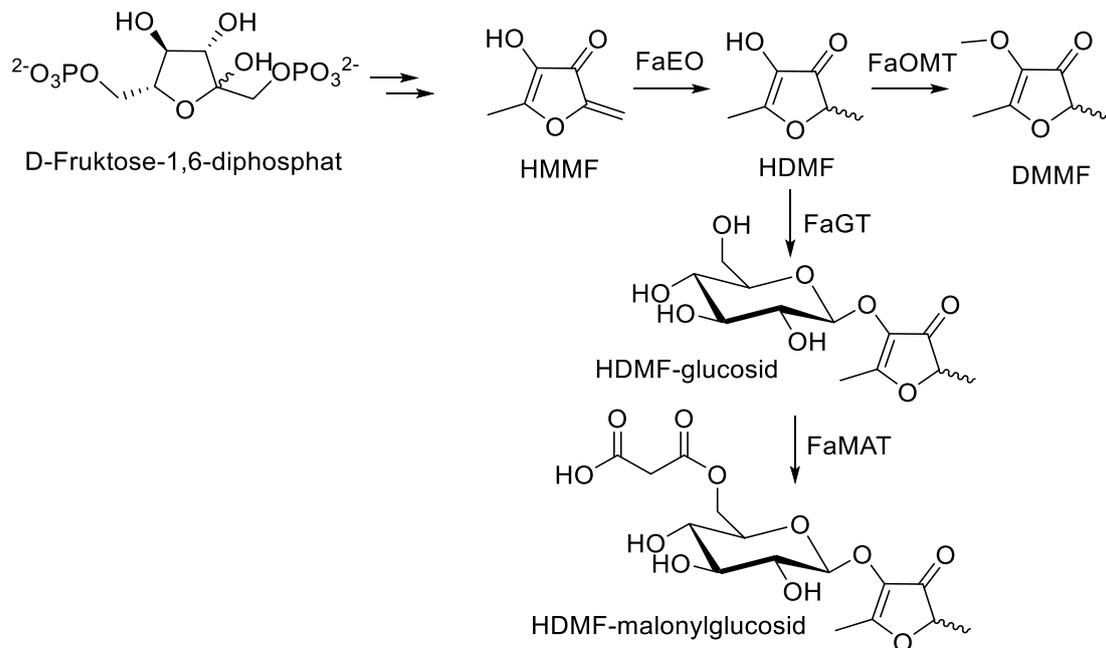


Abbildung 70: Postulierter Biosyntheseweg von Furaneol (HDMF) und dessen Metabolisierung in der Erdbeere – HMMF: 4-Hydroxy-5-methyl-2-methylen-3(2H)-furanon; HDMF (Furaneol): 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon; DMMF: 2,5-Dimethyl-4-methoxy-3(2H)-furanon FaEO: Enon-Oxidoreduktase; FaOMT: O-methyltransferase; FaGT: Glucosyltransferase; FaMAT: Malonyltransferase

Überraschenderweise waren in der LC-MS-Spur der enzymatisch gebildeten Produkte nicht nur, wie erwartet, zwei Produkt-Signale für die malonylierten diastereomeren Glucoside (Abbildung 71), sondern drei Produkt-Signale zu erkennen. Die Fragmentierungsmuster der Massenspektren aller drei Produkte zeigen die Abspaltung von Malonylglucosid zu Furaneol und ermöglichen dadurch für alle Produkte die Identifizierung als Furaneol-malonylglucosid (Abbildung 44). Es ist bekannt, dass auf Grund der Keto-Enol-Tautomerie des HDMFs zwei Diastereomere des HDMF-malonylglucosids in der Erdbeere existieren (Roscher et al. 1996). Vermutlich handelt es sich bei zwei der drei Peaks folglich um die beiden Diastereomere der Keto-Enolform (Abbildung 71). Das Verhältnis der drei Produkte zueinander war für alle drei aktiven FaMATs stets gleich. Die zwei später eluierenden Produkte (Produkt 2 und 3) wiesen mit 41 % bzw. 50 % der Gesamtproduktmenge in etwa den gleichen Anteil auf (Abbildung 42). Produkt 1 hatte hingegen mit nur ca. 9 % einen deutlich geringeren Produktanteil als die beiden anderen HDMF-malonylglucoside. Auf Grund des vergleichbaren und größten Produktanteils, ist anzunehmen, dass es sich bei Produkt 2 und Produkt 3 um die bereits in der Literatur beschriebenen beiden Diastereomere des HDMF-malonylglucosids handelt.

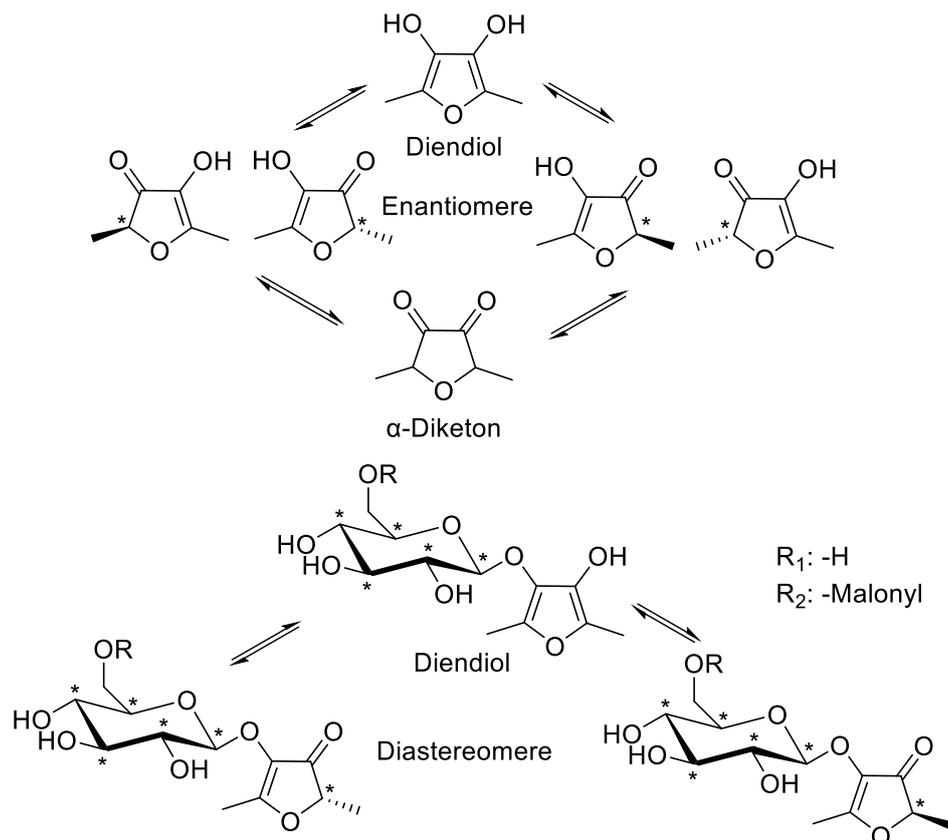


Abbildung 71: Keto-Enol-Tautomerie des HDMF und seiner Derivate

Beim Vergleich der Produktspektren mit den Massen-Spektren eines methanolischen Erdbeerextrakts, fällt auf, dass auch in der Erdbeere dasselbe drei-Peak-Muster zu erkennen ist. D.h. dass die Produkte, die im Assay gebildet wurden, sind auch in Erdbeeren enthalten.

Eine Erklärung für Peak 1 könnte eine Malonylierung des Glucosids nicht an der üblichen Position 6“, sondern an einer anderen Hydroxygruppe des Zuckers sein. Suzuki et al. 2004a konnten mit Dm3MAT2 eine Malonyltransferase identifizieren, die Anthocyane nicht nur an Position 6“ des Zuckers malonyliert, sondern im Anschluss auch eine zusätzliche Malonylierung an Position 3“ ermöglicht. Jedoch wäre für HDMF-O-(3-O-malonyl-β-D-glucosid) auch ein Diastereomeren-Paar zu erwarten. Im Massenspektrum und auch UV-Chromatogramm lässt sich nur ein Peak erkennen.

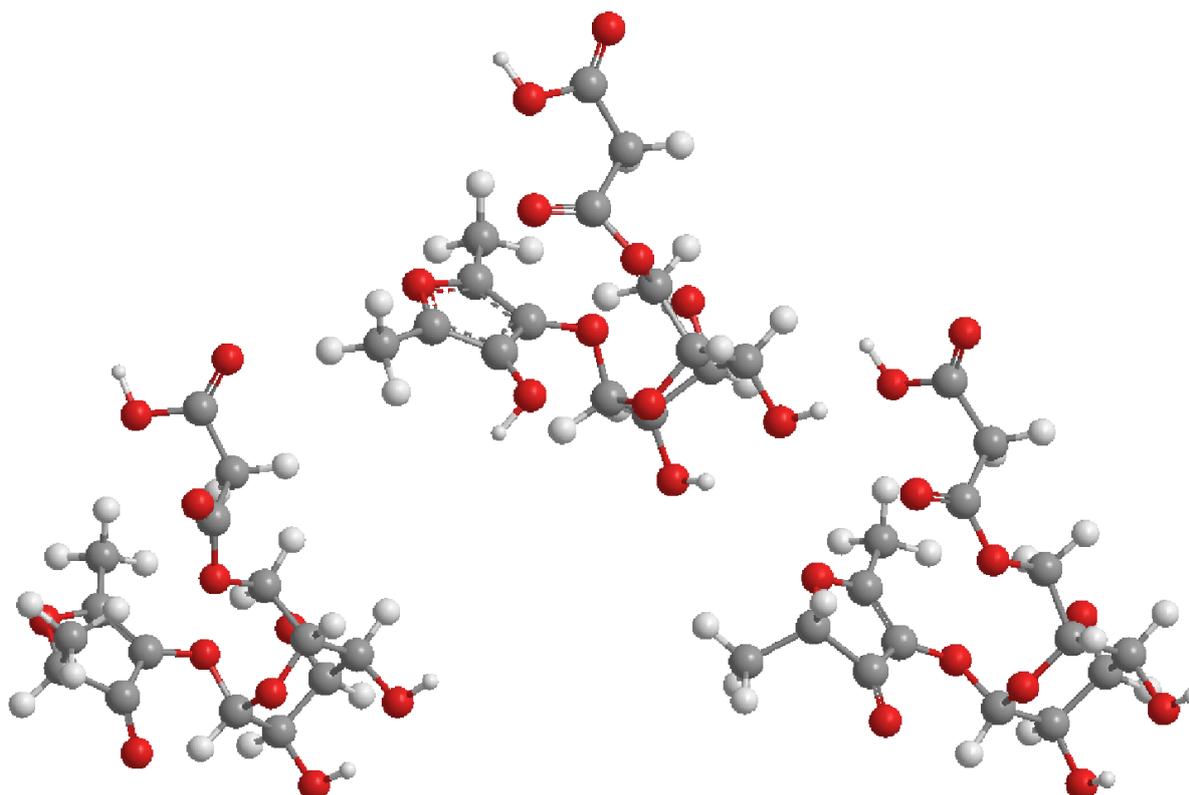


Abbildung 72: 3D Struktur der HDMF-O-(6-O-malonyl-β-D-glucosid) Tautomere – rot: Sauerstoffatom; grau: Kohlenstoffatom; weiß: Wasserstoffatom

Alternativ könnte es sich bei Peak 1 auch um die Diendiol-Form des HDMF-O-(6-O-malonyl-β-D-glucosid) handeln. Die Racemisierung des HDMF ist als relativ langsam beschrieben. Bei pH 7 dauert die Racemisierung mehr als 40 h (Raab et al. 2003). Unter sauren Bedingungen braucht die Racemisierung sogar noch länger. Bei pH 3,8 und pH 5 konnte kaum eine Racemisierung beobachtet werden. Bei pH 2 zeigte sich wieder eine Racemisierung, jedoch langsamer als bei pH 7.

Bisher wurden allerdings keine detektierbaren Mengen der Diendiol-Form des HDMFs und seiner Derivate mittels chromatographischer Methoden nachgewiesen (Emura et al. 2009). Das Keto-Enol-Gleichgewicht des HDMFs liegt auf der Seite des Keto-Enols und nicht auf der Seite des Diendiols oder Diketons (Abbildung 71). Studien konnten jedoch zeigen, dass das Gleichgewicht von cyclischen Keto-Enol-Tautomeren von den Substituenten beeinflusst werden kann (Capon et al. 1988; Fontana und O'Ferrall 1994; Friedrichsen et al. 2000). Bei

der Betrachtung der 3D-Struktur des HDMF-O-(6-O-malonyl- β -D-glucosid) wird deutlich, dass die Malonyl-Gruppe sich sterisch in der Nähe des Furan-Ringes des HDMF befindet (Abbildung 72). Eine intramolekulare Wechselwirkung des HDMF mit der Malonyl-Gruppe könnte das Keto-Enol-Gleichgewicht weiter in Richtung des Diendiols verschieben, wodurch für dieses Molekül auch das Diendiol-Derivat detektierbare Mengen erreicht.

4.3.3. Malonylierung von Flavonoiden

Sowohl FaMATC1, FaMATS1 als auch FaMAT4 katalysierten die Malonylierung der Anthocyane Pelargonidin-3-glucosid und Cyanidin-3-glucosid, sowie der Flavanole Quercetin-3-glucosid und Kaempferol-3-glucosid. Alle Produkte dieser Synthesen konnten bereits in den Früchten der Erdbeere nachgewiesen werden (Hanhineva et al. 2011).

Interessanterweise zeigte FaMATC4 im Vergleich zu FaMATC1 und FaMATS1 eine stärkere Umsetzung der einzelnen Anthocyane, jedoch eine deutlich schwächere Umsetzung von Kaempferol-3-glucosid. Für Quercetin-3-glucosid konnte kein Unterschied zwischen den Enzymen festgestellt werden. Bei der simultanen Umsetzung der beiden Anthocyane zeigte FaMATC4 eine deutlich höhere katalytische Aktivität gegenüber Pelargonidin-3-glucosid im Vergleich zu Cyanidin-3-glucosid. FaMATS1 war aktiver als FaMATC1.

Für die Erdbeervarietät 'Candonga', der Ursprung von FaMATC1 und FaMATC4, konnte im Vergleich zu 'Senga Sengana' (FaMATS1) ein niedrigerer Gehalt an malonylierten Anthocyanen quantifiziert werden. Bei Vergleich der Gesamt-Frucht-Anthocyane wurde Cyanidin-3-glucosid im Verhältnis zu Pelargonidin-3-glucosid bei 'Candonga' besser umgesetzt als bei 'Senga Sengana'. Die Malonyltransferase-Assays weisen darauf hin, dass nicht nur eine Malonyltransferase, sondern vielmehr mehrere Malonyltransferasen an der Malonylierung der Flavonoide beteiligt sind. Die Ergebnisse des Assays können das Metabolitenprofil der beiden Ursprungssorten auf den ersten Blick nicht erklären. In 'Senga Sengana' ist das Allel der potenziell stark aktiven, Pelargonidin-3-glucosid-umsetzenden FaMAT4 auf Grund einer Mutation zu Beginn der korrespondierenden DNA-Sequenz nicht funktionell aktiv. Dadurch würde eher ein höherer Gehalt an malonylierten Anthocyanen in 'Candonga' und nicht in 'Senga Sengana' gebildet werden. Zwischen den beiden allelischen FaMATC1 aus 'Candonga' und FaMATS1 aus 'Senga Sengana' ist aber ein Unterschied feststellbar. FaMATS1 wies eine höhere Aktivität als FaMATC1 auf und bevorzugte Pelargonidin-3-glucosid im Verhältnis zu Cyanidin-3-glucosid. Dadurch spiegelt die enzymatische Aktivität des FaMAT1-Proteins besser die Metabolitenkonzentrationen der beiden Varietäten wider.

Da bei den Genotypen der GoodBerry-Population im Gegensatz zu den malonylierten Anthocyanen kaum eine Änderung der Gehalte der malonylierten Flavonole festgestellt werden konnte, wurde vermutet, dass die für die Umsetzung der Anthocyane verantwortliche Malonyltransferase, Flavonole nicht im selben Maß differenzieren kann wie die Anthocyane. Zwischen FaMATC1 und FaMATS1 war kein signifikanter Unterschied bei der Umsetzung der Flavonole zu erkennen.

Entscheidend für die Auswirkung auf die Metabolitengehalte ist neben der Substratverfügbarkeit nicht nur die Aktivität eines Enzyms, sondern auch dessen Konzentration bzw. die Expression der korrespondierenden Gene. In *Fragaria vesca* sind *FvMAT4* und *FvMAT1*, die Homologen Gene von *FaMAT4* und *FaMAT1* in *Fragaria x ananassa*, sowohl in den Nüsschen als auch im Blütenboden exprimiert. Die Expression von *FvMAT4* nimmt jedoch im Laufe der Reifung ab, wodurch möglicherweise die Beteiligung der erst spät synthetisierten Anthocyane relativiert werden kann. Dasselbe ist auch für *FvMAT1* im Blütenboden mit Ausnahme einer der drei *Vesca*-Varietäten der Fall. Im Gegensatz zu *FvMAT4* wird *FvMAT1* in den Nüsschen durchgehend stark exprimiert. Diese stärkere Expression im reifen Fruchtstadium könnte für eine größere Beteiligung bei der Malonylierung von Anthocyanen sprechen. Ein weiterer Aspekt bei dem Vergleich der beiden Varietäten ist, dass *Fragaria x ananassa* im Gegensatz zu *Fragaria vesca* octaploid ist. Für eine vollständige Bewertung der Funktion eines Gens und der enzymatischen Aktivität des kodierten Proteins sollten alle homologen Gene analysiert werden. Jeweils nur ein Allel von acht möglichen Allelen einer Varietät wurde jeweils isoliert und das Protein auf Aktivität getestet.

4.4. Einfluss der FaFLS

Die Flavonol-Synthase katalysiert die Bildung von Dihydroflavonolen zu den korrespondierenden Flavonolen (Holton et al. 1993b). Darüber hinaus sind aber auch Flavonol-Synthasen bekannt, die neben der FLS-Aktivität eine FHT Aktivität aufweisen und die Synthese von den Flavanonen über die Dihydroflavonole zu den Flavonolen katalysieren können (Lukačič et al. 2003; Park et al. 2019; Xu et al. 2012). Basis ist die hohe strukturelle Ähnlichkeit der beiden Enzymklassen, die beide zu der Enzymfamilie der 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen (2-ODG) gehören (Davies und Schwinn 2006).

Die hier untersuchte FLS-Linie wurde bereits von Ludwig Ring analysiert (Ring 2013). Die meisten Veränderungen der Metabolitengehalte im Vergleich zu den Kontrollpflanzen konnten erneut bestätigt werden. Dies betrifft insbesondere die Reduzierung der Flavonole in allen untersuchten Pflanzenorganen mit Ausnahme der Wurzeln. Bei Ring 2013 war eine stärkere Reduzierung der Flavonole zu erkennen. Eine zusätzliche Übereinstimmung zu Ring 2013 ist

der reduzierte Gehalt an Phenylpropanoiden in der Blüte bzw. in den Kronblättern. Auch der Gehalt an Citronensäure war im Blütenboden großer grüner und reifer Früchte geringer. Bei MALDI-IMS Analysen der Früchte war zwar eine Reduzierung des Citronensäure-Gehalts im grünen Fruchtstadium, jedoch eine Erhöhung in den reifen Früchten zu erkennen (Crecelius et al. 2017). Crecelius et al. 2017 konnten einen Anstieg der Proanthocyanidine im Laufe der Fruchtreifung beobachten. In Erdbeerfrüchten nimmt der Gehalt der Proanthocyanidine normalerweise während der Fruchtentwicklung ab. Für die ebenfalls untersuchten Fruchtextrakte wurde eine Reduktion der Gehalte an Proanthocyanidinen während der Fruchtreifung beobachtet. Der Gegensatz zu den MALDI-IMS Analysen wurde auf das Vorkommen der Metaboliten in den Nüsschen zurückgeführt, die bei den Fruchtextrakten mit in das Extrakt übergehen können.

Im Gegensatz zu Ring 2013 konnte im Vergleich zu den Kontrollfrüchten ein erhöhter Anthocyangehalte in der transgenen Linie festgestellt werden, insbesondere im weißen und weiß-roten Fruchtstadium. Vermutlich war die Expression der FLS in den reifen Früchten reduziert, während die an der Synthese der Anthocyane beteiligten Enzyme (z.B. ANS, GT) insbesondere in der reifen Frucht stark exprimiert waren (Carbone et al. 2009; Almeida et al. 2007). Dadurch ist auch in den Kontroll-Früchten eine Konkurrenz der Flavonol-Synthese und der Anthocyan-Synthese im reifen Fruchtstadium reduziert, wodurch es hier zu einem geringeren Unterschied der siFLS-Linie zu der Kontrolle kommt. Ein weiterer Unterschied im

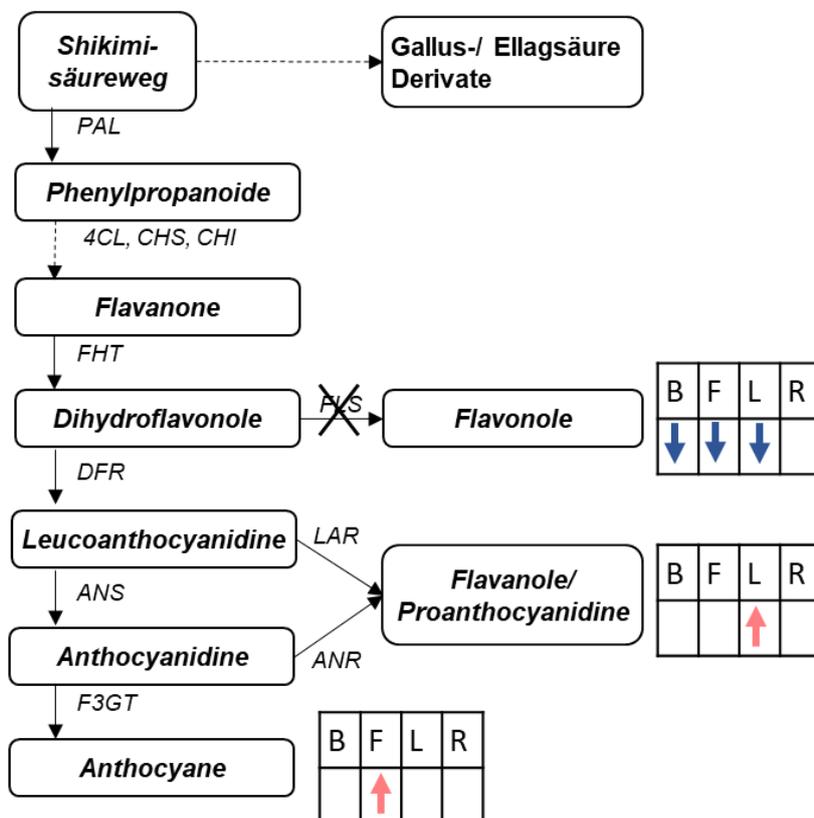


Abbildung 73: Effekte der FLS-Herunterregulierung auf die Polyphenolbiosynthese – B: Blüte; F: Frucht; L: Blatt; R: Wurzel

Vergleich zu Ring 2013 war ein erhöhter Flavanolgehalt. Die Erhöhung der Anthocyanogehalte in den Früchten und der Flavanolgehalte in den Blättern entspricht einer vermehrten Bildung alternativer Metaboliten der Flavonoid-Biosynthese durch die Reduktion des Flavonol-Seitenwegs (Abbildung 73). Der Unterschied zu den Analysen von Ring 2013 könnte zum einen durch die längere Kultivierung der Pflanzen erklärt werden, die zu einer veränderten Anpassung des Metaboliten-Stroms geführt hat, aber auch durch veränderte Umweltbedingungen, oder dass hier die Gehalte nicht auf die Trockenmasse sondern auf das Frischgewicht bezogen wurden. Die beobachtete Veränderung der Metaboliten entspricht den Daten aus der Literatur. Durch eine Herunterregulierung der FLS in Petunie, Lisianthus, Tabak, Arabidopsis oder Zierapfel konnte eine Reduzierung der Flavonole, sowie eine Erhöhung der Anthocyane, der Flavan-3-ole und/ oder der Dihydroflavonole beobachtet werden (Davies et al. 2003; Mahajan et al. 2011; Nguyen et al. 2016; Schijlen et al. 2004; Zhou et al. 2013; Tian et al. 2015; Nielsen et al. 2002; Mahajan et al. 2012). Eine Überexpression der FLS führte zu einer gegenteiligen Veränderung der Metabolitengehalte (Park et al. 2019; Zhou et al. 2013; Tian et al. 2015; Park et al. 2020).

In den Wurzeln der transgenen Erdbeerpflanzen konnte im Gegensatz zu den anderen Pflanzenorganen keine Reduzierung der Flavonole festgestellt werden. Die Bildung der Flavonole in der Wurzel wird vermutlich durch eine Wurzel-spezifische FLS katalysiert oder die Flavonole der Wurzel werden über einen alternativen Biosyntheseweg gebildet.

Flavonole haben vielfältige Aufgaben in Pflanzen. Die Bildung der Flavonole kann durch UVB Strahlung induziert werden und schützt die Pflanze vor dessen Schadefekten (Falcone Ferreyra et al. 2010; Emiliani et al. 2013). Flavonole reduzieren die durch UVB induzierten DNA-Schäden und Schäden an Elementen des Photosystems und schützen vor Fettsäureoxidationen (Emiliani et al. 2013). Neben Sonnenstrahlung kann die Bildung der Flavonole auch durch andere Stressfaktoren, wie einem Pathogenbefall oder Kälte induziert werden (Hamamouch et al. 2020; Bhatia et al. 2018). Die Kälte-induzierte Bildung ist dabei abhängig von Licht und wird in *Arabidopsis* durch COP1 (*constitutive photomorphogenesis protein 1*) und HY5 (*long hypocotyl 5*) unter der Beteiligung der MYB-Transkriptionsfaktoren MYB12, MYB11 und MYB111 reguliert. Die Bildung der Flavonole wird außerdem von NaCl, Ethephon, den Pflanzenhormonen Abscisinsäure, und Auxin, sowie Salicylsäure beeinflusst (Xu et al. 2012; Li et al. 2013). Flavonole sind auch an Wachstumsprozessen beteiligt. Sie ermöglichen die Pollenkeimung und das Pollenschlauchwachstum (Mahajan et al. 2011; Mo et al. 1992). Möglicherweise ist dies auf eine Regulierung der ROS-Homöostase zurückzuführen (Muhlemann et al. 2018). Darüber hinaus beeinflussen Flavonole den Transport von Auxin (Emiliani et al. 2013; Kuhn et al. 2011). Eine erhöhte Bildung der Flavonole führte in *Arabidopsis* zu größeren Blättern auf Grund einer Vergrößerung der

Blattzellen (Emiliani et al. 2013). In Tabak weisen Keimlinge durch eine Überexpression von *FLS* vergrößerte Primärwurzeln und Wurzelhaarlängen auf (Park et al. 2020) und der Quercetin-Gehalt ist erhöht. In Wurzeln beeinflussen Flavonole den Wurzelphototropismus und das Wurzelwachstum durch Regulierung des Übergangs von Proliferation zu Differenzierung (Silva-Navas et al. 2016).

4.5. Einfluss des siFra a 1.02

In zwei unabhängigen Experimenten wurde die Auswirkung einer stabilen Herunterregulierung der Fra a 1.02-Expression auf die Metaboliten der Erdbeerpflanze untersucht. Aus Spanien wurde das Fruchtmaterial mehrerer siFra-Linien und zweier Kontrollen erhalten. Bei den Pflanzen aus Deutschland wurden verschiedene Fruchtstadien und Pflanzengewebe zweier Erntejahre untersucht.

In den Früchten der deutschen siFra-Pflanzen waren die Anthocyane Cyanidin-3-glucosid und Cyanidin-3-malonylglucosid in beiden Erntejahren signifikant reduziert. Konträr dazu waren die Gehalte an Cyanidin-3-glucosid, Cyanidin-3-malonylglucosid und Pelargonidin-3-glucosid in den reifen Früchten aus Spanien erhöht. Bei der Korrelationsanalyse innerhalb der GoodBerry-Population konnte eine negative Korrelation des Fra a 1-Gehaltes mit den Anthocyanen Cyanidin-3-malonylglucosid, Pelargonidin-3-malonylglucosid und Cyanidin-3-glucosid festgestellt werden. Dies entspricht einer Erhöhung dieser Anthocyane bei Reduzierung bzw. Herunterregulierung des Fra a 1-Gehaltes und entspricht somit den Ergebnissen der spanischen Früchte. Muñoz et al. 2010 untersuchte die Auswirkung einer transienten Herunterregulierung von Fra 1.01 und Fra a 1.03 in den Erdbeerfrüchten mittels Agroinfiltration und konnte eine Reduzierung von Pelargonidin-3-glucosid, Cyanidin-3-glucosid und Cyanidin-3-malonylglucosid beobachten. Dies entspricht den Ergebnissen der Früchte aus Deutschland. Im Gegensatz zu Muñoz et al. 2010 waren keine Effekte auf die Pelargonidine zu sehen.

In den Früchten aus Deutschland waren die Gehalte an Kaempferol-cumarylglucosid, Kaempferol-malonylglucosid und Kaempferol-glucosid reduziert, insbesondere in den frühen Fruchtstadien. Muñoz et al. 2010 konnten in der reifen Frucht eine Reduktion an Kaempferol-3-glucosid feststellen.

Fra a 1-Proteine können Flavonoide, wie Quercetin-3-glucuronid, Myricetin und Catechin binden (Casañal et al. 2013). Dadurch verringern sie möglicherweise die Diffusion oder sind beim Transport der Flavonoide in spezifische Zellkompartimente beteiligt.

Die transgenen Pflanzen wiesen einen veränderten Gehalt an Glutathion auf. In den spanischen Früchten war dieser im Vergleich zu den Kontrollen erniedrigt. In den deutschen

siFra-Früchten war der Gehalt an Glutathion 2019 ebenfalls niedriger, 2018 jedoch sogar erhöht. Glutathion wies bei der GoodBerry-Population eine positive Korrelation mit Fra a 1 auf und steht dadurch im Einklang mit den reduzierten Gehalten an Glutathion in den siFra-Linien.

Wie bereits unter 4.1.3 diskutiert, ist Glutathion ein ROS-Regulator (Zagorchev et al. 2013) und beeinflusst auch die Bildung von Pflanzenhormonen und die Expression an der Flavonoid-Synthese beteiligter Gene (Cheng et al. 2015; Dron et al. 1988). Glutathion ist auch an Metaboliten-Transporten beteiligt (Zhao und Dixon 2010). Viele der veränderten Konzentrationen in den siFra-Pflanzen betrafen malonylierte Metaboliten. Die Malonylierung verbessert die Aufnahmefähigkeit in die Vakuole (Gomez et al. 2009; Zhao et al. 2011) und beeinflusst dadurch auch den Transport. Die Veränderungen von Glutathion und insbesondere den malonylierten Anthocyanen nach Herunterregulierung des Fra a 1.02 verdeutlicht erneut die Beteiligung von Fra a 1.02 am Metaboliten-Transportsystem der Zellen.

Die in den Experimenten beobachteten gegenläufigen Effekte lassen sich u.a. durch die verschiedenen Umwelteinflüsse erklären. Jedes der Experimente inklusive der transienten Herunterregulierung durch Muñoz et al. 2010 wurde unter verschiedenen Umweltbedingungen durchgeführt. Die Gehalte an Fra a 1, Glutathion und den Sekundärmetaboliten sind abhängig von äußeren Faktoren (vgl. 4.1.1, Hasanuzzaman et al. 2017). Darüber hinaus ist auch ein Einfluss der Genotypen denkbar. Die Erdbeersorte, die in Deutschland zur Herstellung der transgenen siFra Pflanzen verwendet wurde war 'Senga Sengana' und die bei Muñoz et al. 2010 verwendete Sorte 'Elsanta' haben beide hohe Konzentrationen an malonylierten Anthocyanen, während die Sorte der spanischen siFra-Linien 'Camarosa' deutlich niedrigere Gehalte aufweist. Dadurch könnten in den Kontrollpflanzen andere Transportsysteme bzw. Metabolitenfluss-Steuerungen ausgeprägt sein, wodurch die Veränderung der Fra a 1.02-Expression zu unterschiedlichen Effekten führt. Auch andere genetische Dispositionen der verschiedenen Sorten haben einen Effekt auf den Metabolitenfluss bzw. dessen Regulierung und dadurch potenziell auch auf die Fra a 1.02-Effekte. Auf Grund der hohen Homologie können neben Fra a 1.02 auch andere Homologe Fra a 1-Proteine von der Herunterregulierung betroffen sein. Für die spanischen siFra Linien wurde dies bereits nachgewiesen. Die verschiedenen Fra a 1-Homologen unterscheiden sich in ihren biologischen Aktivitäten (Besbes et al. 2019a; Besbes et al. 2019b; Franz-Oberdorf et al. 2016; Franz-Oberdorf et al. 2017b). Bei Muñoz et al. 2010 waren jeweils Fra a 1.01 und Fra a 1.03 die Zielgene der RNAi-Experimente. Eine unterschiedlich starke Herunterregulierung anderer Fra a 1-Homologe könnte zu den Unterschieden in den Metaboliten-Veränderungen beitragen. Verschiedene Linien einer RNA-Interferenz-induzierten Gen-Stilllegung (RNAi) können sich deutlich voneinander unterscheiden (McGinnis 2010). Die Gründe einer stark variierenden Transgenexpression können auf die Position des Inserts im Genom und andere Effekt

zurückgeführt werden (Schwab et al. 2011). Auch zwischen den spanischen Linien ist eine deutliche Varianz zu erkennen.

Bei der deutschen siFra a 1.02-Linie wurden neben den Früchten auch noch Blüten, Blätter und Wurzeln auf Metaboliten-Veränderungen untersucht. Jedoch lässt sich für einzelne Polyphenolgruppen, wie den Flavonolen oder den Flavanolen, bzw. einzelner Metaboliten bei Vergleich der verschiedenen Pflanzenorgane keine einheitliche Tendenz feststellen. Teils wurden die Gehalte erhöht, teils reduziert oder blieben annähernd konstant. Die Expression der Fra a 1-Homologen unterscheidet sich jedoch stark in den verschiedenen Pflanzenorganen (Muñoz et al. 2010; Besbes et al. 2019b). Mittels qPCR, die vom Julius Kühn-Institut in Dresden durchgeführt wurde, konnte gezeigt werden, dass auch die Reduzierung der Genexpression von Fra a 1.02 in den untersuchten siFra Linien nicht in allen Pflanzenorganen und Fruchtstadien identisch ist. In den jungen Blättern wurde im Gegensatz zu anderen Pflanzengewebe keine Reduktion der Fra-Expression festgestellt. In diesem Blattstadium konnten deutlich weniger Veränderungen der Metaboliten als in den alten Blättern identifiziert werden. In Verbindung mit einer unterschiedlichen Bindung der Homologe an die Flavonoide bzw. biologischen Funktion könnten dies die Gründe für die Organ-spezifischen Veränderungen sein.

Bei Apfel (*Malus domestica*) und Karotte (*Daucus carota*) wurden bereits stabile PR10 reduzierte Genotypen mittels RNAi erzeugt, deren Verzehr deutlich geringere Symptome bei Allergikern bewirkten (Dubois et al. 2015; Krath et al. 2009; Peters et al. 2011). Im Fall der Karotte betraf das Zielgen sowohl Dau c 1.01 als auch Dau c 1.02 (Peters et al. 2011). Während die Transkription von Dau c 1.02 bei den Dau c 1.01_RNAi-Pflanzen nur leicht reduziert wurde, zeigte Dau c 1.02_RNAi eine deutliche Reduktion beider Homologe. Bei Induktion mittels Salicylsäure blieb die Transkription der Zielgene der RNAi-Linien annähernd konstant, während die Transkription im Wildtyps deutlich anstieg. Dies verdeutlicht, dass durch Herunterregulierung der PR-10-Proteine potenziell die Interaktion mit Umweltreizen verändert wird.

4.6. Schlussfolgerung

Der Polyphenolgehalt der Erdbeeren wird durch Umwelt und Genotyp beeinflusst, wobei beide Faktoren die Gehalte einzelner Metaboliten unterschiedlich verändern. Der Umwelteffekt, welcher u.a. durch die Kultivierungsmethode, Nährstoffzufuhr und das Klima geprägt wird betrifft nicht jedes Polyphenol gleich während Genotypeneffekt für die Züchtung neuer Erdbeersorten genutzt werden können, die z.B. reich an speziellen Pflanzeninhaltsstoffen sind.

Zwischen verschiedenen Erdbeergenotypen und Erdbeervarietäten variiert der Gehalt an den malonylierten Anthocyanen Pelargonidin-3-malonylglucosid und Cyanidin-3-malonylglucosid sehr stark. Für diesen Unterschied ist vermutlich die Vererbung eines dominanten Malonyltransferase-Gens verantwortlich. Es konnte gezeigt werden, dass die Malonylierung der Anthocyane und anderer Polyphenole durch mehrere promiskuitive Malonyltransferasen katalysiert wird. Die analysierten rekombinanten Malonyltransferasen der Erdbeere konnten neben Anthocyanen und Flavonolen auch HDMF-glucosid umsetzen.

Im Rahmen der Korrelationsanalysen der GoodBerry-Erdbeer-Population als auch durch die stabile Herunterregulierung der Fra a 1.02-Expression mittels RNA-Interferenz-induzierter Gen-Stillegung wurde bestätigt, dass Fra a 1 die Polyphenol-Biosynthese beeinflusst. Glutathion konnte in Verbindung mit Fra a 1 gebracht werden. Diese Beobachtungen legen nahe, dass Fra a 1 als Regulator oder Transporter in die Biosynthese der Polyphenole involviert ist und stützen dadurch die Ergebnisse vorangegangener Studien. Der Einfluss auf den Metabolitenstrom scheint abhängig vom Genotyp und/ oder der Umwelt zu sein. Diese Erkenntnis kann dazu beitragen Erdbeersorten mit reduziertem Allergengehalt zu züchten. Der Fra a 1-Gehalt der Erdbeeren unterliegt jedoch einer Umwelt-Genotypen-Interaktion, die bei der Beurteilung neuer Sorten berücksichtigt werden sollte.

5. Literatur

Aaby, K.; Ekeberg, D.; Skrede, G. (2007): Characterization of phenolic compounds in strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruits by different HPLC detectors and contribution of individual compounds to total antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (11). 4395–4406.

Aaby, K.; Mazur, S.; Nes, A.; Skrede, G. (2012): Phenolic compounds in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) fruits: Composition in 27 cultivars and changes during ripening. *Food Chemistry* 132 (1). 86–97.

Aaby, K.; Skrede, G.; Wrolstad, R. E. (2005): Phenolic composition and antioxidant activities in flesh and achenes of strawberries (*Fragaria ananassa*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (10). 4032–4040.

Adhikari, A.; Darbar, S.; Chatterjee, T.; Das, M.; Polley, N.; Bhattacharyya, M. et al. (2018): Spectroscopic Studies on Dual Role of Natural Flavonoids in Detoxification of Lead Poisoning: Bench-to-Bedside Preclinical Trial. *ACS Omega* 3 (11). 15975–15987.

Adler, D.; Murdoch, D.; et mult. al. (2020): rgl. **3D Visualization Using OpenGL**. Version 0.100.50. Online verfügbar unter <https://CRAN.R-project.org/package=rgl>.

Afrin, S.; Gasparrini, M.; Forbes-Hernandez, T. Y.; Reboledo-Rodriguez, P.; Mezzetti, B.; Varela-López, A. et al. (2016): Promising Health Benefits of the Strawberry: A Focus on Clinical Studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64 (22). 4435–4449.

Aharoni, A.; Vos, C. H. de; Wein, M.; Sun, Z.; Greco, R.; Kroon, A. et al. (2001): The strawberry FaMYB1 transcription factor suppresses anthocyanin and flavonol accumulation in transgenic tobacco. *The Plant Journal* 28 (3). 319–332.

Ahmadi, H.; Bringhurst, R. S.; Voth, V. (1990): Modes of Inheritance of Photoperiodism in 'Fragaria'. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 115 (1). 146–152.

Alam, M. M.; Hasanuzzaman, M.; Nahar, K.; Fujita, M. (2013): Exogenous salicylic acid ameliorates short-term drought stress in mustard (*Brassica juncea* L.) seedlings by up-regulating the antioxidant defense and glyoxalase system. *Australian Journal of Crop Science* 7 (7). 1053–1063.

Allergome. **A Database of Allergenic Molecules** (2020). Online verfügbar unter <http://www.allergome.org>, 29.02.2020.

Alm, R.; Ekefjård, A.; Krogh, M.; Häkkinen, J.; Emanuelsson, C. (2007): Proteomic variation is as large within as between strawberry varieties. *Journal of Proteome Research* 6 (8). 3011–3020.

Almeida, J. R. M.; D'Amico, E.; Preuss, A.; Carbone, F.; Vos, C. H. R. de; Deiml, B. et al. (2007): Characterization of major enzymes and genes involved in flavonoid and proanthocyanidin biosynthesis during fruit development in strawberry (*Fragaria x ananassa*). *Archives of Biochemistry and Biophysics* 465 (1). 61–71.

Alscher, R. G.; Donahue, J. L.; Cramer, C. L. (1997): Reactive oxygen species and antioxidants: Relationships in green cells. *Physiologia Plantarum* 100 (2). 224–233.

Alvarez-Suarez, J. M.; Giampieri, F.; Tulipani, S.; Casoli, T.; Di Stefano, G.; González-Paramás, A. M. et al. (2014): One-month strawberry-rich anthocyanin supplementation ameliorates cardiovascular risk, oxidative stress markers and platelet activation in humans. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 25 (3). 289–294.

Amadi, C. N.; Offor, S. J.; Frazzoli, C.; Orisakwe, O. E. (2019): Natural antidotes and management of metal toxicity. *Environmental Science and Pollution Research International* 26 (18). 18032–18052.

Amil-Ruiz, F.; Blanco-Portales, R.; Muñoz-Blanco, J.; Caballero, J. L. (2011): The strawberry plant defense mechanism: a molecular review. *Plant & Cell Physiology* 52 (11). 1873–1903.

Amin, K. (2012): The role of mast cells in allergic inflammation. *Respiratory Medicine* 106 (1). 9–14.

Andersen, M.-B. S.; Hall, S.; Dragsted, L. O. (2011): Identification of european allergy patterns to the allergen families PR-10, LTP, and profilin from Rosaceae fruits. *Clinical reviews in allergy & immunology* 41 (1). 4–19.

Anttonen, M. J.; Hoppula, K. I.; Nestby, R.; Verheul, M. J.; Karjalainen, R. O. (2006): Influence of fertilization, mulch color, early forcing, fruit order, planting date, shading, growing Environment, and genotype on the contents of selected phenolics in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (7). 2614–2620.

Anvari, S.; Miller, J.; Yeh, C.-Y.; Davis, C. M. (2019): IgE-Mediated Food Allergy. *Clinical reviews in allergy & immunology* 57 (2). 244–260.

Averbeck, M.; Gebhardt, C.; Emmrich, F.; Treudler, R.; Simon, J. C. (2007): Immunologic principles of allergic disease. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* 5 (11). 1015–1028.

- Bailey-Serres, J.** (2013): Microgenomics: genome-scale, cell-specific monitoring of multiple gene regulation tiers. *Annual Review of Plant Biology* 64. 293–325.
- Bak, S.; Beisson, F.; Bishop, G.; Hamberger, B.; Höfer, R.; Paquette, S.; Werck-Reichhart, D.** (2011): Cytochromes p450. *The Arabidopsis Book* 9. e0144.
- Baldé, A. M.; Calomme, M. A. V.; Pieters, L. J.; Claeys, M. J.; Berghe, D. J.; Vlietinck, A. J.** (1991): Structure and Antimicrobial Activity Relationship of Doubly-Linked Procyanidins. *Planta Medica* 57. A42-A43.
- Baldi, P.; Orsucci, S.; Moser, M.; Brilli, M.; Giongo, L.; Si-Ammour, A.** (2018): Gene expression and metabolite accumulation during strawberry (*Fragaria × ananassa*) fruit development and ripening. *Planta* 248 (5). 1143–1157.
- Banaszewski, K.; Park, E.; Edirisinghe, I.; Cappozzo, J. C.; Burton-Freeman, B. M.** (2013): A pilot study to investigate bioavailability of strawberry anthocyanins and characterize postprandial plasma polyphenols absorption patterns by Q-TOF LC/MS in humans. *Journal of Berry Research* 3. 113–126.
- Barros, J.; Escamilla-Trevino, L.; Song, L.; Rao, X.; Serrani-Yarce, J. C.; Palacios, M. D. et al.** (2019): 4-Coumarate 3-hydroxylase in the lignin biosynthesis pathway is a cytosolic ascorbate peroxidase. *Nature Communications* 10 (1). 1994.
- Baxter, I. R.; Young, J. C.; Armstrong, G.; Foster, N.; Bogenschutz, N.; Cordova, T. et al.** (2005): A plasma membrane H⁺-ATPase is required for the formation of proanthocyanidins in the seed coat endothelium of *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (7). 2649–2654.
- Bayer, A.; Ma, X.; Stöckigt, J.** (2004): Acetyltransfer in natural product biosynthesis--functional cloning and molecular analysis of vinorine synthase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 12 (10). 2787–2795.
- Behrens, C. E.; Smith, K. E.; Iancu, C. V.; Choe, J.-Y.; Dean, J. V.** (2019): Transport of Anthocyanins and other Flavonoids by the *Arabidopsis* ATP-Binding Cassette Transporter AtABCC2. *Scientific Reports* 9 (1). 437.
- Besbes, F.** (2018): Functional characterization of Fra a 1 genes in strawberry plants. Dissertation. **Technische Universität München**, Freising.
- Besbes, F.; Franz-Oberdorf, K.; Schwab, W.** (2019a): Phosphorylation-dependent ribonuclease activity of Fra a 1 proteins. *Journal of Plant Physiology* 233. 1–11.

- Besbes, F.; Habegger, R.; Schwab, W.** (2019b): Induction of PR-10 genes and metabolites in strawberry plants in response to *Verticillium dahliae* infection. *BMC Plant Biology* 19 (1). 128.
- Beutler, E.** (1989): Nutritional and metabolic aspects of glutathione. *Annual Review of Nutrition* 9. 287–302.
- Bhatia, C.; Pandey, A.; Gaddam, S. R.; Hoecker, U.; Trivedi, P. K.** (2018): Low Temperature-Enhanced Flavonol Synthesis Requires Light-Associated Regulatory Components in *Arabidopsis thaliana*. *Plant & Cell Physiology* 59 (10). 2099–2112.
- Biedermann, T.; Winther, L.; Till, S. J.; Panzner, P.; Knulst, A.; Valovirta, E.** (2019): Birch pollen allergy in Europe. *Allergy* 74 (7). 1237–1248.
- Blanco-Portales, R.; Medina-Escobar, N.; López-Ráez, J. A.; González-Reyes, J. A.; Villalba, J. M.; Moyano, E. et al.** (2002): Cloning, expression and immunolocalization pattern of a cinnamyl alcohol dehydrogenase gene from strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. Chandler). *Journal of Experimental Botany* 53 (375). 1723–1734.
- Bogs, J.; Downey, M. O.; Harvey, J. S.; Ashton, A. R.; Tanner, G. J.; Robinson, S. P.** (2005): Proanthocyanidin synthesis and expression of genes encoding leucoanthocyanidin reductase and anthocyanidin reductase in developing grape berries and grapevine leaves. *Plant Physiology* 139 (2). 652–663.
- Bontpart, T.; Cheynier, V.; Ageorges, A.; Terrier, N.** (2015): BAHD or SCPL acyltransferase? What a dilemma for acylation in the world of plant phenolic compounds. *The New Phytologist* 208 (3). 695–707.
- Bontpart, T.; Marlin, T.; Vialet, S.; Guiraud, J.-L.; Pinasseau, L.; Meudec, E. et al.** (2016): Two shikimate dehydrogenases, VvSDH3 and VvSDH4, are involved in gallic acid biosynthesis in grapevine. *Journal of Experimental Botany* 67 (11). 3537–3550.
- Bornsek, S. M.; Ziberna, L.; Polak, T.; Vanzo, A.; Ulrich, N. P.; Abram, V. et al.** (2012): Bilberry and blueberry anthocyanins act as powerful intracellular antioxidants in mammalian cells. *Food Chemistry* 134 (4). 1878–1884.
- Bowman, A. W.; Azzalini, A.** (2018): R package 'sm'. **nonparametric smoothing methods**. Version 2.2-5.6. Online verfügbar unter <http://www.stats.gla.ac.uk/~adrian/sm>.
- Boyce, J. A.; Assa'ad, A.; Burks, A. W.; Jones, S. M.; Sampson, H. A.; Wood, R. A. et al.** (2010): Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: report of the NIAID-sponsored expert panel. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 126 (6 Suppl). S1-58.

Breiteneder, H.; Mills, E. N. C. (2005): Molecular properties of food allergens. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 115 (1). 14-23; quiz 24.

Breiteneder, H.; Pettenburger, K.; Bito, A.; Valenta, R.; Kraft, D.; Rumpold, H. et al. (1989): The gene coding for the major birch pollen allergen Betv1, is highly homologous to a pea disease resistance response gene. *The EMBO Journal* 8 (7). 1935–1938.

Breiteneder, H.; Radauer, C. (2004): A classification of plant food allergens. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 113 (5). 821-30; quiz 831.

Bringhurst, R. S.; Voth, V. (1980): Six new strawberry varieties released. *California Agriculture*. 12–15.

Brouillard, R.; Dubois, J.-E. (1977): Mechanism of the Structural Transformations of Anthocyanins in Acidic Media. *Journal of American Chemical Society* 99 (5). 1359–1364.

Bruyne, T. de; Pieters, L.; Deelstra, H.; Vlietinck, A. (1999): Condensed vegetable tannins: Biodiversity in structure and biological activities. *Biochemical Systematics and Ecology* 27 (4). 445–459.

Buendía, B.; Gil, M. I.; Tudela, J. A.; Gady, A. L.; Medina, J. J.; Soria, C. et al. (2010): HPLC-MS analysis of proanthocyanidin oligomers and other phenolics in 15 strawberry cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 (7). 3916–3926.

Buer, C. S.; Muday, G. K. (2004): The transparent testa4 mutation prevents flavonoid synthesis and alters auxin transport and the response of Arabidopsis roots to gravity and light. *The Plant Cell* 16 (5). 1191–1205.

Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) (2019): Pro-Kopf-Verbrauch von Obst nach Arten. **ohne Zitrusfrüchte**. Online verfügbar unter <https://www.bmel-statistik.de/ernaehrung-fischerei/versorgungsbilanzen/obst-gemuese-zitrusfruechte-schalen-und-trockenobst/>(20.10.2019).

Burks, A. W.; Tang, M.; Sicherer, S.; Muraro, A.; Eigenmann, P. A.; Ebisawa, M. et al. (2012): ICON: food allergy. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 129 (4). 906–920.

Buttery, R. G.; Takeoka, G. R.; Ling, L. C. (1995): Furaneol: Odor Threshold and Importance to Tomato Aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43 (6). 1638–1640.

Cairns, N. G.; Pasternak, M.; Wachter, A.; Cobbett, C. S.; Meyer, A. J. (2006): Maturation of arabidopsis seeds is dependent on glutathione biosynthesis within the embryo. *Plant Physiology* 141 (2). 446–455.

- Cammann, J.; Denzel, K.; Schilling, G.; Gross, G. G.** (1989): Biosynthesis of gallotannins: β -Glucogallin-dependent formation of 1,2,3,4,6-pentagalloylglucose by enzymatic galloylation of 1,2,3,6-tetragalloylglucose. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 278 (1). 58–63.
- Capon, B.; Guo, B. Z.; Kwok, F. C.; Siddhanta, A. K.; Zucco, C.** (1988): Generation of simple enols in solution. *Accounts of Chemical Research* 21 (4). 135–140.
- Carbone, F.; Preuss, A.; Vos, R. C. H. de; D'Amico, E.; Perrotta, G.; Bovy, A. G. et al.** (2009): Developmental, genetic and environmental factors affect the expression of flavonoid genes, enzymes and metabolites in strawberry fruits. *Plant, Cell & Environment* 32 (8). 1117–1131.
- Casado-Díaz, A.; Encinas-Villarejo, S.; Santos, B. d. I.; Schilirò, E.; Yubero-Serrano, E.-M.; Amil-Ruíz, F. et al.** (2006): Analysis of strawberry genes differentially expressed in response to *Colletotrichum* infection. *Physiologia Plantarum* 128 (4). 633–650.
- Casañal, A.; Zander, U.; Muñoz, C.; Dupeux, F.; Luque, I.; Botella, M. A. et al.** (2013): The strawberry pathogenesis-related 10 (PR-10) Fra a proteins control flavonoid biosynthesis by binding to metabolic intermediates. *The Journal of Biological Chemistry* 288 (49). 35322–35332.
- Cassidy, A.; Minihane, A.-M.** (2017): The role of metabolism (and the microbiome) in defining the clinical efficacy of dietary flavonoids. *The American Journal of Clinical Nutrition* 105 (1). 10–22.
- Chapman, M. D.; Pomés, A.; Breiteneder, H.; Ferreira, F.** (2007): Nomenclature and structural biology of allergens. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 119 (2). 414–420.
- DIN 32645**(2008): Chemische Analytik - Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen - Begriffe, Verfahren, Auswertung, 09.03.2020.
- Chen, H.; Kim, H. U.; Weng, H.; Browse, J.** (2011): Malonyl-CoA synthetase, encoded by acyl activating enzyme13, is essential for growth and development of Arabidopsis. *The Plant Cell* 23 (6). 2247–2262.
- Chen, M.; Chory, J.** (2011): Phytochrome signaling mechanisms and the control of plant development. *Trends in Cell Biology* 21 (11). 664–671.
- Cheng, M.-C.; Ko, K.; Chang, W.-L.; Kuo, W.-C.; Chen, G.-H.; Lin, T.-P.** (2015): Increased glutathione contributes to stress tolerance and global translational changes in Arabidopsis. *The Plant Journal* 83 (5). 926–939.

Christensen, A. B.; Gregersen, P. L.; Schröder, J.; Collinge, D. B. (1998): A chalcone synthase with an unusual substrate preference is expressed in barley leaves in response to UV light and pathogen attack. *Plant Molecular Biology* 37 (5). 849–857.

Cobb, A. H.; Reade, J. P.H. (2010): *Herbicides and Plant Physiology*. Wiley-Blackwell, Oxford, UK.

Cocco, C.; Magnani, S.; Maltoni, M. L.; Quacquarelli, I.; Cacchi, M.; Antunes, L. E. C. et al. (2015): Effects of site and genotype on strawberry fruits quality traits and bioactive compounds. *Journal of Berry Research* 5 (3). 145–155.

Constabel, C. P. (2018): Molecular Controls of Proanthocyanidin Synthesis and Structure: Prospects for Genetic Engineering in Crop Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66 (38). 9882–9888.

Crecelius, A. C.; Hölscher, D.; Hoffmann, T.; Schneider, B.; Fischer, T. C.; Hanke, M.-V. et al. (2017): Spatial and Temporal Localization of Flavonoid Metabolites in Strawberry Fruit (*Fragaria × ananassa*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65 (17). 3559–3568.

Czank, C.; Cassidy, A.; Zhang, Q.; Morrison, D. J.; Preston, T.; Kroon, P. A. et al. (2013): Human metabolism and elimination of the anthocyanin, cyanidin-3-glucoside: a (¹³C)-tracer study. *The American Journal of Clinical Nutrition* 97 (5). 995–1003.

Dao, T. T. H.; Linthorst, H. J. M.; Verpoorte, R. (2011): Chalcone synthase and its functions in plant resistance. *Phytochemistry Reviews* 10 (3). 397–412.

Darrow, G. M. (1966): *The Strawberry. History, Breeding and Physiology*. Holt, Rinehart and Winston, New York.

Dash, S.; Mohanty, N. (2002): Response of seedlings to heat-stress in cultivars of wheat: Growth temperature-dependent differential modulation of photosystem 1 and 2 activity, and foliar antioxidant defense capacity. *Journal of Plant Physiology* 159 (1). 49–59.

D'Auria, J. C. (2006): Acyltransferases in plants: a good time to be BAHD. *Current Opinion in Plant Biology* 9 (3). 331–340.

D'Auria, J. C.; Reichelt, M.; Luck, K.; Svatos, A.; Gershenzon, J. (2007): Identification and characterization of the BAHD acyltransferase malonyl CoA: anthocyanidin 5-O-glucoside-6''-O-malonyltransferase (At5MAT) in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* 581 (5). 872–878.

Davies, K. M.; Schwinn, K. E. (2006): Molecular Biology and Biotechnology of Flavonoid Biosynthesis. *in*: Andersen, Ø. M.; Markham, K. R.: *Flavonoids. Chemistry, biochemistry and applications*. CRC Taylor & Francis, Boca Raton. 143–218.

- Davies, K. M.; Schwinn, K. E.; Deroles, S. C.; Manson, D.; Lewis, D. H.; Bloor, S. J.; Bradley, M. J.** (2003): Enhancing anthocyanin production by altering competition for substrate between flavonol synthase and dihydroflavonol 4-reductase. *Euphytica* 131 (3). 259–268.
- Dersch, L. M.; Beckers, V.; Wittmann, C.** (2016): Green pathways: Metabolic network analysis of plant systems. *Metabolic engineering* 34. 1–24.
- Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie** (2009): *Lebensmitteltabelle für die Praxis*. 4. Aufl. Wissenschaftliche Verlagsgesellschafts mbH, Stuttgart.
- Dias, M. I.; Barros, L.; Oliveira, M. B. P.P.; Santos-Buelga, C.; Ferreira, I. C.F.R.** (2015): Phenolic profile and antioxidant properties of commercial and wild *Fragaria vesca* L. roots: A comparison between hydromethanolic and aqueous extracts. *Industrial Crops and Products* 63. 125–132.
- Dinno, A.** (2017): dunn.test. **Dunn's Test of Multiple Comparisons Using Rank Sums**. Version 1.3.5. Online verfügbar unter <https://CRAN.R-project.org/package=dunn.test>.
- Dreborg, S.** (1988): Food allergy in pollen-sensitive patients. *Annals of Allergy* 61 (6 Pt 2). 41–46.
- Dron, M.; Clouse, S. D.; Dixon, R. A.; Lawton, M. A.; Lamb, C. J.** (1988): Glutathione and fungal elicitor regulation of a plant defense gene promoter in electroporated protoplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85 (18). 6738–6742.
- Dubois, A. E. J.; Pagliarani, G.; Brouwer, R. M.; Kollen, B. J.; Dragsted, L. O.; Eriksen, F. D. et al.** (2015): First successful reduction of clinical allergenicity of food by genetic modification: Mal d 1-silenced apples cause fewer allergy symptoms than the wild-type cultivar. *Allergy* 70 (11). 1406–1412.
- Ebner, C.; Hirschwehr, R.; Bauer, L.; Breiteneder, H.; Valenta, R.; Ebner, H. et al.** (1995): Identification of allergens in fruits and vegetables: IgE cross-reactivities with the important birch pollen allergens Bet v 1 and Bet v 2 (birch profilin). *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 95 (5). 962–969.
- Edger, P. P.; Poorten, T. J.; VanBuren, R.; Hardigan, M. A.; Colle, M.; McKain, M. R. et al.** (2019): Origin and evolution of the octoploid strawberry genome. *Nature Genetics* 51 (3). 541–547.
- Effenberger, I.; Harport, M.; Pfannstiel, J.; Klaiber, I.; Schaller, A.** (2017): Expression in *Pichia pastoris* and characterization of two novel dirigent proteins for atropselective formation of gossypol. *Applied Microbiology and Biotechnology* 101 (5). 2021–2032.

Emiliani, J.; Grotewold, E.; Falcone Ferreyra, M. L.; Casati, P. (2013): Flavonols protect Arabidopsis plants against UV-B deleterious effects. *Molecular Plant* 6 (4). 1376–1379.

Emura, M.; Yaguchi, Y.; Nakahashi, A.; Sugimoto, D.; Miura, N.; Monde, K. (2009): Stereochemical studies of odorous 2-substituted-3(2H)-furanones by vibrational circular dichroism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (21). 9909–9915.

Enomoto, H.; Sato, K.; Miyamoto, K.; Ohtsuka, A.; Yamane, H. (2018): Distribution Analysis of Anthocyanins, Sugars, and Organic Acids in Strawberry Fruits Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Imaging Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66 (19). 4958–4965.

Enomoto, H.; Takahashi, S.; Takeda, S.; Hatta, H. (2019): Distribution of Flavan-3-ol Species in Ripe Strawberry Fruit Revealed by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Mass Spectrometry Imaging. *Molecules* 25 (1).

Erdmann, S. M.; Sachs, B.; Schmidt, A.; Merk, H. F.; Scheiner, O.; Moll-Slodowy, S. et al. (2005): In vitro analysis of birch-pollen-associated food allergy by use of recombinant allergens in the basophil activation test. *International Archives of Allergy and Immunology* 136 (3). 230–238.

Fait, A.; Hanhineva, K.; Beleggia, R.; Dai, N.; Rogachev, I.; Nikiforova, V. J. et al. (2008): Reconfiguration of the achene and receptacle metabolic networks during strawberry fruit development. *Plant Physiology* 148 (2). 730–750.

Falcone Ferreyra, M. L.; Rius, S.; Emiliani, J.; Pourcel, L.; Feller, A.; Morohashi, K. et al. (2010): Cloning and characterization of a UV-B-inducible maize flavonol synthase. *The Plant Journal* 62 (1). 77–91.

Falcone Ferreyra, M. L.; Rius, S. P.; Casati, P. (2012): Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Frontiers in Plant Science* 3. 222.

Felgines, C.; Talavéra, S.; Gonthier, M.-P.; Texier, O.; Scalbert, A.; Lamaison, J.-L.; Rémésy, C. (2003): Strawberry Anthocyanins are Recovered in Urine as Glucuroand Sulfoconjugates in Humans. *The Journal of Nutrition* 133 (5). 1296–1301.

Fernandes, H.; Michalska, K.; Sikorski, M.; Jaskolski, M. (2013): Structural and functional aspects of PR-10 proteins. *The FEBS Journal* 280 (5). 1169–1199.

Ferrars, R. M. de; Czank, C.; Zhang, Q.; Botting, N. P.; Kroon, P. A.; Cassidy, A.; Kay, C. D. (2014): The pharmacokinetics of anthocyanins and their metabolites in humans. *British Journal of Pharmacology* 171 (13). 3268–3282.

- Fliegmann, J.; Schröder, G.; Schanz, S.; Britsch, L.; Schröder, J.** (1992): Molecular analysis of chalcone and dihydropinosylvin synthase from Scots pine (*Pinus sylvestris*), and differential regulation of these and related enzyme activities in stressed plants. *Plant Molecular Biology* 18 (3). 489–503.
- Folta, K. M.; Denoyes-Rothan, B.; Rousseau-Gueutin, M.; Stewart, P. J.** (2011): Strawberry. **Genome Composition, Linkage Maps and Markers.** *in:* Folta, K. M.; Kole, C.: Genetics, Genomics and Breeding of Berries. Science Publishers, Enfield (Genetics, Genomics and Breeding of Crop Plant).
- Fontana, A.; O'Ferrall, R. A. M.** (1994): Equilibrium constants for ionisation and enolisation of 2-phenylacetylurea. *Journal of the Chemical Society* (12). 2453.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)** (2019): Crops-Data. Online verfügbar unter <http://faostat.fao.org/>(16.10.2019).
- Foyer, C. H.; Noctor, G.** (2005): Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *The Plant Cell* 17 (7). 1866–1875.
- Franz, K.; Eberlein, B.; Hücherig, S.; Edelmann, K.; Besbes, F.; Ring, J. et al.** (2013): Breeding of hypoallergenic strawberry fruit. *Journal of Berry Research* (3). 197–201.
- Franz-Oberdorf, K.; Eberlein, B.; Edelmann, K.; Bleicher, P.; Kurze, E.; Helm, D. et al.** (2017a): White-fruited strawberry genotypes are not per se hypoallergenic. *Food Research International* 100 (Pt 1). 748–756.
- Franz-Oberdorf, K.; Eberlein, B.; Edelmann, K.; Hücherig, S.; Besbes, F.; Darsow, U. et al.** (2016): Fra a 1.02 Is the Most Potent Isoform of the Bet v 1-like Allergen in Strawberry Fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64 (18). 3688–3696.
- Franz-Oberdorf, K.; Langer, A.; Strasser, R.; Isono, E.; Ranftl, Q. L.; Wunschel, C.; Schwab, W.** (2017b): Physical interaction between the strawberry allergen Fra a 1 and an associated partner FaAP: Interaction of Fra a 1 proteins and FaAP. *Proteins* 85 (10). 1891–1901.
- Friedrichsen, W.; Traulsen, T.; Elguero, J.; Katritzky, A. R.** (2000): Tautomerism of Heterocycles: Five-Membered Rings with One Heteroatom. *in:* Katritzky, A. R.: Advances in heterocyclic chemistry, Bd. 76. London; Academic Press, New York (Advances in Heterocyclic Chemistry, 76). 85–156.

- Fu, L.; Cherayil, B. J.; Shi, H.; Wang, Y.; Zhu, Y.** (2019a): Overview of the Immunology of Food Allergy. *in*: Fu, L.; Cherayil, B. J.; Shi, H.; Wang, Y.; Zhu, Y.: Food allergy. From molecular mechanisms to control strategies. Springer, Singapur.
- Fu, L.; Cherayil, B. J.; Shi, H.; Wang, Y.; Zhu, Y.** (2019b): Species and Structure of Food Allergens: Epitopes and Cross-Reactivity. *in*: Fu, L.; Cherayil, B. J.; Shi, H.; Wang, Y.; Zhu, Y.: Food allergy. From molecular mechanisms to control strategies, Bd. 12. Springer, Singapur. 13–39.
- Gachon, C. M. M.; Langlois-Meurinne, M.; Saindrenan, P.** (2005): Plant secondary metabolism glycosyltransferases: the emerging functional analysis. *Trends in Plant Science* 10 (11). 542–549.
- Gajhede, M.; Osmark, P.; Poulsen, F. M.; Ipsen, H.; Larsen, J. N.; van Joost Neerven, R. J. et al.** (1996): X-ray and NMR structure of Bet v 1, the origin of birch pollen allergy. *Nature Structural Biology* 3 (12). 1040–1045.
- Galbraith, D. W.; Birnbaum, K.** (2006): Global studies of cell type-specific gene expression in plants. *Annual Review of Plant Biology* 57. 451–475.
- Gall, H.; Kalveram, K.-J.; Forck, G.; Sterry, W.** (1994): Kiwi fruit allergy: A new birch pollen-associated food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 94 (1). 70–76.
- Galli, S. J.; Tsai, M.; Piliponsky, A. M.** (2008): The development of allergic inflammation. *Nature* 454 (7203). 445–454.
- Garcia, C. V.; Quek, S.-Y.; Stevenson, R. J.; Winz, R. A.** (2011): Characterization of the bound volatile extract from baby kiwi (*Actinidia arguta*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59 (15). 8358–8365.
- Gasperotti, M.; Masuero, D.; Guella, G.; Palmieri, L.; Martinatti, P.; Pojer, E. et al.** (2013): Evolution of ellagitannin content and profile during fruit ripening in *Fragaria* spp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61 (36). 8597–8607.
- Gechev, T. S.; van Breusegem, F.; Stone, J. M.; Denev, I.; Laloi, C.** (2006): Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *BioEssays* 28 (11). 1091–1101.
- Geroldinger-Simic, M.; Zelniker, T.; Aberer, W.; Ebner, C.; Egger, C.; Greiderer, A. et al.** (2011): Birch pollen-related food allergy: clinical aspects and the role of allergen-specific IgE and IgG4 antibodies. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 127 (3). 616-22.e1.

- Giampieri, F.; Alvarez-Suarez, J. M.; Battino, M.** (2014): Strawberry and human health: effects beyond antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62 (18). 3867–3876.
- Giampieri, F.; Tulipani, S.; Alvarez-Suarez, J. M.; Quiles, J. L.; Mezzetti, B.; Battino, M.** (2012): The strawberry: composition, nutritional quality, and impact on human health. *Nutrition* 28 (1). 9–19.
- Gicen, N. K.; Venis, M. A.; Grierson, D.** (1988): Hormonal regulation of ripening in the strawberry, a non-climacteric fruit. *Planta* 174. 402–406.
- Giusti, M. M.; Rodríguez-Saona, L. E.; Wrolstad, R. E.** (1999): Molar absorptivity and color characteristics of acylated and non-acylated pelargonidin-based anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47 (11). 4631–4637.
- Gomez, C.; Terrier, N.; Torregrosa, L.; Violet, S.; Fournier-Level, A.; Verriès, C. et al.** (2009): Grapevine MATE-type proteins act as vacuolar H⁺-dependent acylated anthocyanin transporters. *Plant Physiology* 150 (1). 402–415.
- Gould, K. S.; Lister, C.** (2006): Flavonoid Functions in Plants. *in: Andersen, Ø. M.; Markham, K. R.: Flavonoids. Chemistry, biochemistry and applications.* CRC Taylor & Francis, Boca Raton. 397–442.
- Graves, S.; Piepho, H.-P.; Selzer, L.; Dorai-Raj, S.** (2019): multcompView. **Visualizations of Paired Comparisons.** Version 0.1-8. Online verfügbar unter <https://CRAN.R-project.org/package=multcompView>.
- Griesser, M.; Hoffmann, T.; Bellido, M. L.; Rosati, C.; Fink, B.; Kurtzer, R. et al.** (2008): Redirection of flavonoid biosynthesis through the down-regulation of an anthocyanidin glucosyltransferase in ripening strawberry fruit. *Plant Physiology* 146 (4). 1528–1539.
- Gu, L.; Kelm, M. A.; Hammerstone, J. F.; Beecher, G.; Holden, J.; Haytowitz, D.; Prior, R. L.** (2003): Screening of foods containing proanthocyanidins and their structural characterization using LC-MS/MS and thiolytic degradation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (25). 7513–7521.
- Guerrero-Chavez, G.; Scampicchio, M.; Andreotti, C.** (2015): Influence of the site altitude on strawberry phenolic composition and quality. *Scientia Horticulturae* 192. 21–28.
- Guilfoyle, T. J.; Hagen, G.** (2007): Auxin response factors. *Current Opinion in Plant Biology* 10 (5). 453–460.
- Hagerman, A. E.; Butler, L. G.** (1981): The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *The Journal of Biological Chemistry* 256 (9). 4494–4497.

- Häkkinen, S. H.; Törrönen, A.R.** (2000): Content of flavonols and selected phenolic acids in strawberries and *Vaccinium* species: influence of cultivar, cultivation site and technique. *Food Research International* 33 (6). 517–524.
- Halbwirth, H.; Puhl, I.; Haas, U.; Jezik, K.; Treutter, D.; Stich, K.** (2006): Two-phase flavonoid formation in developing strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (4). 1479–1485.
- Hamamouch, N.; Winkel, B. S. J.; Li, C.; Davis, E. L.** (2020): Modulation of Arabidopsis Flavonol Biosynthesis Genes by Cyst and Root-Knot Nematodes. *Plants* 9 (2).
- Hancock, J. F.** (1999): Strawberries. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Hancock, J. F.; Sjulín, T. M.; Lobos, G. A.** (2008): Strawberries. *in*: Hancock, J. F.: Temperate Fruit Crop Breeding. germsplasm to genomics. Springer, Berlin. 393–437.
- Hanhineva, K.; Kärenlampi, S. O.; Aharoni, A.** (2011): Recent Advances in Strawberry Metabolomics. *Genes, Genomes and Genomics* 5 (1). 65–75.
- Hanhineva, K.; Kokko, H.; Siljanen, H.; Rogachev, I.; Aharoni, A.; Kärenlampi, S. O.** (2009): Stilbene synthase gene transfer caused alterations in the phenylpropanoid metabolism of transgenic strawberry (*Fragaria x ananassa*). *Journal of Experimental Botany* 60 (7). 2093–2106.
- 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 x ananassa*) flowers. *Phytochemistry* 69 (13). 2463–2481.
- Härtl, K.; Denton, A.; Franz-Oberdorf, K.; Hoffmann, T.; Spornraft, M.; Usadel, B.; Schwab, W.** (2017): Early metabolic and transcriptional variations in fruit of natural white-fruited *Fragaria vesca* genotypes. *Scientific Reports* 7. 45113.
- Hasanuzzaman, M.; Fujita, M.** (2011): Selenium pretreatment upregulates the antioxidant defense and methylglyoxal detoxification system and confers enhanced tolerance to drought stress in rapeseed seedlings. *Biological Trace Element Research* 143 (3). 1758–1776.
- Hasanuzzaman, M.; Nahar, K.; Anee, T. I.; Fujita, M.** (2017): Glutathione in plants: biosynthesis and physiological role in environmental stress tolerance. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 23 (2). 249–268.
- Hatier, J.-H. B.; Gould, K. S.** (2009): Anthocyanin Function in Vegetative Organs. *in*: Gould, K.; Davies, K. M.; Winefield, C.: Anthocyanins. Biosynthesis, functions, and applications. Springer, New York. 1–19.

- Hauser, M.; Egger, M.; Wallner, M.; Wopfner, N.; Schmidt, G.; Ferreira, F.** (2008): Molecular Properties of Plant Food Allergens: A Current Classification into Protein Families. *The Open Immunology Journal* 1 (1). 1–12.
- Hawkins, C.; Caruana, J.; Schiksnis, E.; Liu, Z.** (2016): Genome-scale DNA variant analysis and functional validation of a SNP underlying yellow fruit color in wild strawberry. *Scientific Reports* 6. 29017.
- He, F.; Pan, Q.-H.; Shi, Y.; Duan, C.-Q.** (2008): Biosynthesis and genetic regulation of proanthocyanidins in plants. *Molecules* 13 (10). 2674–2703.
- Hirschey, M. D.; Zhao, Y.** (2015): Metabolic Regulation by Lysine Malonylation, Succinylation, and Glutarylation. *Molecular & Cellular Proteomics* 14 (9). 2308–2315.
- Hjernø, K.; Alm, R.; Canbäck, B.; Matthiesen, R.; Trajkovski, K.; Björk, L. et al.** (2006): Down-regulation of the strawberry Bet v 1-homologous allergen in concert with the flavonoid biosynthesis pathway in colorless strawberry mutant. *Proteomics* 6 (5). 1574–1587.
- Hoffmann, T.; Kalinowski, G.; Schwab, W.** (2006): RNAi-induced silencing of gene expression in strawberry fruit (*Fragaria x ananassa*) by agroinfiltration: a rapid assay for gene function analysis. *The Plant Journal* 48 (5). 818–826.
- Hofmann, A. S.; Gross, G. G.** (1990): Biosynthesis of gallotannins: Formation of polygalloylglucoses by enzymatic acylation of 1,2,3,4,6-penta-O-galloylglucose. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 283 (2). 530–532.
- Hofmann, T.; Glabasnia, A.; Schwarz, B.; Wisman, K. N.; Gangwer, K. A.; Hagerman, A. E.** (2006): Protein binding and astringent taste of a polymeric procyanidin, 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-beta-D-glucopyranose, castalagin, and grandinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (25). 9503–9509.
- Holton, T. A.; Brugliera, F.; Lester, D. R.; Tanaka, Y.; Hyland, C. D.; Menting, J. G. et al.** (1993a): Cloning and expression of cytochrome P450 genes controlling flower colour. *Nature* 366 (6452). 276–279.
- Holton, T. A.; Brugliera, F.; Tanaka, Y.** (1993b): Cloning and expression of flavonol synthase from *Petunia hybrida*. *The Plant Journal* 4 (6). 1003–1010.
- Horikoshi, M.; Tang, Y.** (2016): ggfortify. **Data Visualization Tools for Statistical Analysis Results**. Online verfügbar unter <https://CRAN.R-project.org/package=ggfortify>.
- Hossain, M. R.; Kim, H.-T.; Shanmugam, A.; Nath, U. K.; Goswami, G.; Song, J.-Y. et al.** (2018): Expression Profiling of Regulatory and Biosynthetic Genes in Contrastingly

Anthocyanin Rich Strawberry (*Fragaria × ananassa*) Cultivars Reveals Key Genetic Determinants of Fruit Color. *International Journal of Molecular Sciences* 19 (3).

Hothorn, T.; Hornik, K. (2019): exactRankTests. **Exact Distributions for Rank and Permutation Tests**. Version 0.8-31. Online verfügbar unter <https://CRAN.R-project.org/package=exactRankTests>.

Hou, D.-X.; Kai, K.; Li, J.-J.; Lin, S.; Terahara, N.; Wakamatsu, M. et al. (2004): Anthocyanidins inhibit activator protein 1 activity and cell transformation: structure-activity relationship and molecular mechanisms. *Carcinogenesis* 25 (1). 29–36.

Huang, H.; Ullah, F.; Zhou, D.-X.; Yi, M.; Zhao, Y. (2019): Mechanisms of ROS Regulation of Plant Development and Stress Responses. *Frontiers in Plant Science* 10. 800.

Hughes, J.; Hughes, M. A. (1994): Multiple secondary plant product UDP-glucose glucosyltransferase genes expressed in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cotyledons. *DNA Sequence* 5 (1). 41–49.

Hukkanen, A. T.; Kokko, H. I.; Buchala, A. J.; McDougall, G. J.; Stewart, D.; Kärenlampi, S. O.; Karjalainen, R. O. (2007): Benzothiadiazole induces the accumulation of phenolics and improves resistance to powdery mildew in strawberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (5). 1862–1870.

Hummer, K. E.; Janick, J. (2009): Rosacea: Taxonomy, Economic Importance, Genomics. *in: Folta, K. M.; Gardiner, S. E.: Genetics and Genomics of Rosacea*. Springer, New York (Plant Genetics and Genomics: Crops and Models, 6).

Huston, D. P. (2019): Unneutral neutrophils in patients with late-phase allergic reactions. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 144 (1). 46–48.

Ishibashi, M.; Nabe, T.; Nitta, Y.; Tsuruta, H.; Iduhara, M.; Uno, Y. (2018): Analysis of major paralogs encoding the Fra a 1 allergen based on their organ-specificity in *Fragaria × ananassa*. *Plant Cell Reports* 37 (3). 411–424.

Ishibashi, M.; Okochi, S.; Sone, K.; Noguchi, Y.; Uno, Y. (2019): Seasonal Variation of the Major Allergen Fra a 1 in Strawberry Fruit. *The Horticulture Journal* 88 (3). 354–363.

Ishiguro, T.; Tanabe, K.; Kobayashi, Y.; Mizumoto, S.; Kanai, M.; Kawashima, S. A. (2018): Malonylation of histone H2A at lysine 119 inhibits Bub1-dependent H2A phosphorylation and chromosomal localization of shugoshin proteins. *Scientific Reports* 8 (1). 7671.

- James, A. M.; Ma, D.; Mellway, R.; Gesell, A.; Yoshida, K.; Walker, V. et al.** (2017): Poplar MYB115 and MYB134 Transcription Factors Regulate Proanthocyanidin Synthesis and Structure. *Plant Physiology* 174 (1). 154–171.
- Jenkins, J. A.; Griffiths-Jones, S.; Shewry, P. R.; Breiteneder, H.; Mills, E. N. C.** (2005): Structural relatedness of plant food allergens with specific reference to cross-reactive allergens: an in silico analysis. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 115 (1). 163–170.
- Jersch, S.; Scherer, C.; Huth, G.; Schlösser, E.** (1989): Proanthocyanidins as basis for quiescence of *Botrytis cinerea* in immature strawberry fruits / Proanthocyanidine als Ursache der Quieszenz von *Botrytis cinerea* in unreifen Erdbeerfrüchten. *Journal of Plant Diseases and Protection* 4 (96). 365–378.
- 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 (1). 188–199.
- Johnson, A. L.; Govindarajulu, R.; Ashman, T.-L.** (2014): Bioclimatic evaluation of geographical range in *Fragaria* (Rosaceae): consequences of variation in breeding system, ploidy and species age. *Botanical Journal of the Linnean Society* 176. 99–114.
- Jones, P.; Vogt, T.** (2001): Glycosyltransferases in secondary plant metabolism: tranquilizers and stimulant controllers. *Planta* 213 (2). 164–174.
- Joseph, J. A.; Shukitt-Hale, B.; Denisova, N. A.; Prior, R. L.; Cao, G.; Martin, A. et al.** (1998): Long-Term Dietary Strawberry, Spinach, or Vitamin E Supplementation Retards the Onset of Age-Related Neuronal Signal-Transduction and Cognitive Behavioral Deficits. *The Journal of Neuroscience* 18 (19). 8047–8055.
- Joshi, R.; Trinkl, J.; Haugeneder, A.; Härtl, K.; Franz-Oberdorf, K.; Giri, A. et al.** (2019): Semirational design and engineering of grapevine glucosyltransferases for enhanced activity and modified product selectivity. *Glycobiology* 29 (11). 765–775.
- Josuttis, M.; Carlen, C.; Crespo, P.; Nestby, R.; Toldam-Andersen, T. B.; Dietrich, H.; Krüger, E.** (2012): A comparison of bioactive compounds of strawberry fruit from Europe affected by genotype and latitude. *Journal of Berry Research* 2 (2). 73–95.
- Josuttis, M.; Dietrich, H.; Patz, C.-D.; Krüger, E.** (2011): Effects of air and soil temperatures on the chemical composition of fruit and agronomic performance in strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.). *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 86 (4). 415–421.

Josuttis, M.; Dietrich, H.; Treutter, D.; Will, F.; Linnemannstöns, L.; Krüger, E. (2010): Solar UVB response of bioactives in strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch. L.): a comparison of protected and open-field cultivation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 (24). 12692–12702.

Jouquand, C.; Chandler, C. (2008): A Sensory and Chemical Analysis of Fresh Strawberries Over Harvest Dates and Seasons Reveals Factors That Affect Eating Quality. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 133 (6). 859–867.

Kadomura-Ishikawa, Y.; Miyawaki, K.; Takahashi, A.; Masuda, T.; Noji, S. (2015): Light and abscisic acid independently regulated FaMYB10 in *Fragaria × ananassa* fruit. *Planta* 241 (4). 953–965.

Kahn, A. A. (2002): Characterization of chitinase activities, and cloning, analysis, and expression of genes encoding pathogenesis-related proteins in strawberry. Dissertation. **Louisiana State University**, Louisiana. Department of Biological Sciences.

Kaiser, R.; Mageney, V.; Schwefel, K.; Vollmers, D.; Krüger, A.; Horn, R. (2016): Genotyping of red and white fruited strawberry (*Fragaria* L.) accessions and hybrids based on microsatellite markers and on the genetic diversity in the allergen genes fra a 1 and fra a 3. *Genetic Resources and Crop Evolution* 63 (7). 1203–1217.

Kallam, K.; Appelhagen, I.; Luo, J.; Albert, N.; Zhang, H.; Deroles, S. et al. (2017): Aromatic Decoration Determines the Formation of Anthocyanic Vacuolar Inclusions. *Current Biology* 27 (7). 945–957.

Kannangara, C.G.; Stumpf, P. K. (1972): Fat metabolism in higher plants: LIV. A procaryotic type acetyl CoA carboxylase in spinach chloroplasts. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 152 (1). 83–91.

Karlsson, A. L.; Alm, R.; Ekstrand, B.; Fjellkner-Modig, S.; Schiött, A.; Bengtsson, U. et al. (2004): Bet v 1 homologues in strawberry identified as IgE-binding proteins and presumptive allergens. *Allergy* 59 (12). 1277–1284.

Kårlund, A.; Hanhineva, K.; Lehtonen, M.; McDougall, G. J.; Stewart, D.; Karjalainen, R. O. (2017): Non-targeted metabolite profiling highlights the potential of strawberry leaves as a resource for specific bioactive compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 97 (7). 2182–2190.

Kårlund, A.; Salminen, J.-P.; Koskinen, P.; Ahern, J. R.; Karonen, M.; Tiilikkala, K.; Karjalainen, R. O. (2014): Polyphenols in strawberry (*Fragaria × ananassa*) leaves induced by plant activators. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62 (20). 4592–4600.

Kassambara, A. (2020): ggpubr. '**ggplot2**' Based Publication Ready Plots. Version 0.2.5. Online verfügbar unter <https://CRAN.R-project.org/package=ggpubr>.

Kaushik, S.; Bais, H. P.; Biedrzycki, M. L.; Venkatachalam, L. (2010): Catechin is a phytotoxin and a pro-oxidant secreted from the roots of *Centaurea stoebe*. *Plant Signaling & Behavior* 5 (9). 1088–1098.

Kay, C. D.; Pereira-Caro, G.; Ludwig, I. A.; Clifford, M. N.; Crozier, A. (2017): Anthocyanins and Flavanones Are More Bioavailable than Previously Perceived: A Review of Recent Evidence. *Annual Review of Food Science and Technology* 8. 155–180.

Keilig, K.; Ludwig-Müller, J. (2009): Effect of flavonoids on heavy metal tolerance in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Botanical Studies* 50. 311–318.

Kidd, P. S.; Llugany, M.; Poschenrieder, C.; Gunsé, B.; Barceló, J. (2001): The role of root exudates in aluminium resistance and silicon-induced amelioration of aluminium toxicity in three varieties of maize (*Zea mays* L.). *Journal of Experimental Botany* 52 (359). 1339–1352.

Kim, B.-G.; Sung, S. H.; Chong, Y.; Lim, Y.; Ahn, J.-H. (2010): Plant Flavonoid O-Methyltransferases: Substrate Specificity and Application. *Journal of Plant Biology* 53 (5). 321–329.

Kim, J.; Lee, J. G.; Hong, Y.; Lee, E. J. (2019): Analysis of eight phytohormone concentrations, expression levels of ABA biosynthesis genes, and ripening-related transcription factors during fruit development in strawberry. *Journal of Plant Physiology* 239. 52–60.

King, T. P.; Hoffman, D.; Lowenstein, H.; Marsh, D. G.; Platts-Mills, T. A.; Thomas, W. (1994): Allergen nomenclature. WHO/IUIS Allergen Nomenclature Subcommittee. *International Archives of Allergy and Immunology* 105 (3). 224–233.

King, T. P.; Hoffman, D.; Lowenstein, H.; Marsh, D. G.; Platts-Mills, T. A.; Thomas, W. (1995): Allergen nomenclature. *Allergy* 50 (9). 765–774.

Klein, D.; Fink, B.; Arold, B.; Eisenreich, W.; Schwab, W. (2007): Functional characterization of enone oxidoreductases from strawberry and tomato fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (16). 6705–6711.

Kocsy, G.; Ballmoos, P. von; Rügsegger, A.; Szalai, G.; Galiba, G.; Brunold, C. (2001): Increasing the Glutathione Content in a Chilling-Sensitive Maize Genotype Using Safeners Increased Protection against Chilling-Induced Injury1. *Plant Physiology* 127 (3). 1147–1156.

Kocsy, G.; Szalai, G.; Galiba, G. (2002): Induction of glutathione synthesis and glutathione reductase activity by abiotic stresses in maize and wheat. *The Scientific World Journal* 2. 1699–1705.

Koirala, N.; Pandey, R. P.; van Thang, D.; Jung, H. J.; Sohng, J. K. (2014): Glycosylation and subsequent malonylation of isoflavonoids in *E. coli*: strain development, production and insights into future metabolic perspectives. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 41 (11). 1647–1658.

Kolossova, N. G.; Lebedev, P. A.; Dikalova, A. E. (2004): Comparison of Antioxidants in the Ability to Prevent Cataract in Prematurely Aging OXYS Rats. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 3. 249–251.

Krath, B. N.; Eriksen, F. D.; Pedersen, B. H.; Gilissen, L. J. W. J.; van de Weg, W. E.; Dragsted, L. O. (2009): Development of hypo-allergenic apples: silencing of the major allergen Mal d 1 gene in 'Elstar' apple and the effect of grafting. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 84 (6). 52–57.

Krikorian, R.; Shidler, M. D.; Nash, T. A.; Kalt, W.; Vinqvist-Tymchuk, M. R.; Shukitt-Hale, B.; Joseph, J. A. (2010): Blueberry supplementation improves memory in older adults. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 (7). 3996–4000.

Kuhn, B. M.; Geisler, M.; Bigler, L.; Ringli, C. (2011): Flavonols accumulate asymmetrically and affect auxin transport in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 156 (2). 585–595.

Kumar Singh, A.; Cabral, C.; Kumar, R.; Ganguly, R.; Kumar Rana, H.; Gupta, A. et al. (2019): Beneficial Effects of Dietary Polyphenols on Gut Microbiota and Strategies to Improve Delivery Efficiency. *Nutrients* 11 (9).

Kurze, E.; Kock, V.; Lo Scalzo, R.; Olbricht, K.; Schwab, W. (2018): Effect of the Strawberry Genotype, Cultivation and Processing on the Fra a 1 Allergen Content. *Nutrients* 10 (7).

La Barbera, G.; Capriotti, A. L.; Cavaliere, C.; Piovesana, S.; Samperi, R.; Zenezini Chiozzi, R.; Laganà, A. (2017): Comprehensive polyphenol profiling of a strawberry extract (*Fragaria x ananassa*) by ultra-high-performance liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 409 (8). 2127–2142.

Labesse, G.; Vidal-Cros, A.; Chomilier, J.; Gaudry, M.; Mornon, J. P. (1994): Structural comparisons lead to the definition of a new superfamily of NAD(P)(H)-accepting oxidoreductases: the single-domain reductases/epimerases/dehydrogenases (the 'RED' family). *The Biochemical Journal* 304 (Pt 1). 95–99.

- Landry, L. G.; Chapple, C. C.; Last, R. L.** (1995): Arabidopsis mutants lacking phenolic sunscreens exhibit enhanced ultraviolet-B injury and oxidative damage. *Plant Physiology* 109 (4). 1159–1166.
- Li, J.; Schuman, M. C.; Halitschke, R.; Li, X.; Guo, H.; Grabe, V. et al.** (2018): The decoration of specialized metabolites influences stylar development. *eLife* 7.
- Li, X.; Kim, Y. B.; Kim, Y.; Zhao, S.; Kim, H. H.; Chung, E. et al.** (2013): Differential stress-response expression of two flavonol synthase genes and accumulation of flavonols in tartary buckwheat. *Journal of Plant Physiology* 170 (18). 1630–1636.
- Li, Z.; Wakao, S.; Fischer, B. B.; Niyogi, K. K.** (2009): Sensing and responding to excess light. *Annual Review of Plant Biology* 60. 239–260.
- Liston, A.; Cronn, R.; Ashman, T.-L.** (2014): Fragaria: a genus with deep historical roots and ripe for evolutionary and ecological insights. *American Journal of Botany* 101 (10). 1686–1699.
- Liu, Y.; Wang, X.; Mo, T.; Yan, Y.; Song, Y.; Zhao, Y. et al.** (2017): Identification and functional application of a new malonyltransferase NbMaT1 towards diverse aromatic glycosides from *Nicotiana benthamiana*. *RSC Advances* 7 (34). 21028–21035.
- Longley, A. E.** (1926): Chromosomes and their significance in strawberry classification. *Journal of Agricultural Research* 32 (6). 559–568.
- Lopes-da-Silva, F.; Escribano-Bailón, M. T.; Pérez Alonso, J. J.; Rivas-Gonzalo, J. C.; Santos-Buelga, C.** (2007): Anthocyanin pigments in strawberry. *LWT - Food Science and Technology* 40 (2). 374–382.
- López-Puertollano, D.; Agulló, C.; Mercader, J. V.; Abad-Somovilla, A.; Abad-Fuentes, A.** (2020): Click Chemistry-Assisted Bioconjugates for Hapten Immunodiagnostics. *Bioconjugate chemistry* 31 (3). 956–964.
- Lukačín, R.; Wellmann, F.; Britsch, L.; Martens, S.; Matern, U.** (2003): Flavonol synthase from *Citrus unshiu* is a bifunctional dioxygenase. *Phytochemistry* 62 (3). 287–292.
- Lunkenbein, S.; Coiner, H.; Vos, C. H. R. de; Schaart, J. G.; Boone, M. J.; Krens, F. A. et al.** (2006a): Molecular characterization of a stable antisense chalcone synthase phenotype in strawberry (*Fragaria x ananassa*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (6). 2145–2153.
- Lunkenbein, S.; Salentijn, E. M. J.; Coiner, H. A.; Boone, M. J.; Krens, F. A.; Schwab, W.** (2006b): Up- and down-regulation of *Fragaria x ananassa* O-methyltransferase: impacts on furanone and phenylpropanoid metabolism. *Journal of Experimental Botany* 57 (10). 2445–2453.

Luo, J.; Nishiyama, Y.; Fuell, C.; Taguchi, G.; Elliott, K.; Hill, L. et al. (2007): Convergent evolution in the BAHD family of acyl transferases: identification and characterization of anthocyanin acyl transferases from *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 50 (4). 678–695.

Lyons, S. A.; Burney, P. G. J.; Ballmer-Weber, B. K.; Fernandez-Rivas, M.; Barreales, L.; Clausen, M. et al. (2019): Food Allergy in Adults: Substantial Variation in Prevalence and Causative Foods Across Europe. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 7 (6). 1920-1928.e11.

Mackenzie, P. I.; Owens, I. S.; Burchell, B.; Bock, K. W.; Bairoch, A.; Bélanger, A. et al. (1997): The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence. *Pharmacogenetics* 7 (4). 255–269.

Mahajan, M.; Ahuja, P. S.; Yadav, S. K. (2011): Post-transcriptional silencing of flavonol synthase mRNA in tobacco leads to fruits with arrested seed set. *PloS one* 6 (12). e28315.

Mahajan, M.; Joshi, R.; Gulati, A.; Yadav, S. K. (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 (5). 725–733.

Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C.; Jiménez, L. (2004): Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition* 79. 727–747.

Mangiafico, S. (2020): rcompanion. **Functions to Support Extension Education Program.** Version 2.3.25. Online verfügbar unter <https://CRAN.R-project.org/package=rcompanion>.

Manjasetty, B. A.; Yu, X.-H.; Panjekar, S.; Taguchi, G.; Chance, M. R.; Liu, C.-J. (2012): Structural basis for modification of flavonol and naphthol glucoconjugates by *Nicotiana tabacum* malonyltransferase (NtMaT1). *Planta* 236 (3). 781–793.

Marsh, D. G.; Goodfriend, L.; King, T. P.; Lowenstein, H.; Platts-Mills, T. A. (1986): Allergen nomenclature. *Bulletin of the World Health Organization* 64 (5). 767–774.

Martinez, M.; Abraham, Z.; Gambardella, M.; Echaide, M.; Carbonero, P.; Diaz, I. (2005): The strawberry gene *Cyf1* encodes a phytocystatin with antifungal properties. *Journal of Experimental Botany* 56 (417). 1821–1829.

Martínez, G. A.; Civello, P. M.; Chaves, A. R.; Añón, M. C. (2001): Characterization of peroxidase-mediated chlorophyll bleaching in strawberry fruit. *Phytochemistry* 58 (3). 379–387.

Masella, R.; Di Benedetto, R.; Vari, R.; Filesi, C.; Giovannini, C. (2005): Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 16 (10). 577–586.

- Matern, U.; Feser, C.; Hammer, D.** (1983): Further Characterization and regulation of Malonyl-Coenzyme A: Flavonoid Glucoside Malonyltransferases from Parsley Cell Suspension Cultures. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 226 (1). 206–217.
- Matsushita, K.; Sakayori, T.; Ikeda, T.** (2016): The Effect of High Air Temperature on Anthocyanin Concentration and the Expressions of Its Biosynthetic Genes in Strawberry. *Environment Control in Biology* 54 (2). 101–107.
- Mazza, G.** (1993): Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains. CRC Press, Boca Raton.
- Mazza, G.; Kay, C. D.; Cottrell, T.; Holub, B. J.** (2002): Absorption of anthocyanins from blueberries and serum antioxidant status in human subjects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (26). 7731–7737.
- McGinnis, K. M.** (2010): RNAi for functional genomics in plants. *Briefings in Functional Genomics* 9 (2). 111–117.
- Medina-Puche, L.; Cumplido-Laso, G.; Amil-Ruiz, F.; Hoffmann, T.; Ring, L.; Rodríguez-Franco, A. et al.** (2014): MYB10 plays a major role in the regulation of flavonoid/phenylpropanoid metabolism during ripening of *Fragaria x ananassa* fruits. *Journal of Experimental Botany* 65 (2). 401–417.
- Medina-Puche, L.; Martínez-Rivas, F. J.; Molina-Hidalgo, F. J.; Mercado, J. A.; Moyano, E.; Rodríguez-Franco, A. et al.** (2019): An atypical HLH transcriptional regulator plays a novel and important role in strawberry ripened receptacle. *BMC Plant Biology* 19 (1). 586.
- Meister, A.** (1994): Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. *The Journal of Biological Chemistry* 269 (13). 9397–9400.
- Mendel, G.** (1866): Versuche über Pflanzen-Hybriden. In: Verhandlungen des Naturforschenden Vereines in Brünn 4 (1866), S. 3-47. http://www.deutschestextarchiv.de/book/view/mendel_pflanzenhybriden_1866?p=33, Brünn (S. 3-47), 26.03.2020.
- Mendiburu, d. F.** (2020): agricolae. **Statistical Procedures for Agricultural Research.** Version 1.3-2. Online verfügbar unter <https://CRAN.R-project.org/package=agricolae>.
- Mensink, G. B. M.; Weißenborn, A.; Richter, A.** (2016): Folatversorgung in Deutschland. *Journal of Health Monitoring* 1 (2). 26–30.
- Meyer, A. J.** (2008): The integration of glutathione homeostasis and redox signaling. *Journal of Plant Physiology* 165 (13). 1390–1403.

- Meyer, K.; Cusumano, J. C.; Somerville, C.; Chapple, C. C.** (1996): Ferulate-5-hydroxylase from *Arabidopsis thaliana* defines a new family of cytochrome P450-dependent monooxygenases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (14). 6869–6874.
- Mezzetti, B.; Giampieri, F.; Zhang, Y.-T.; Zhong, C.-F.** (2018): Status of strawberry breeding programs and cultivation systems in Europe and the rest of the world. *Journal of Berry Research* 8 (3). 205–221.
- Milkowski, C.; Strack, D.** (2004): Serine carboxypeptidase-like acyltransferases. *Phytochemistry* 65 (5). 517–524.
- Milton Bache, S.; Wickham, H.** (2014): magrittr. **A Forward-Pipe Operator for R.** Version 1.5. Online verfügbar unter <https://CRAN.R-project.org/package=magrittr>.
- Mínguez, J. J. M.; Navarro, C. S.** (2017): Strawberry Cultivation in Spain. Berry School. IFAPA. UMA, Málaga(23.03.2017).
- Mo, Y.; Nagel, C.; Taylor, L. P.** (1992): Biochemical complementation of chalcone synthase mutants defines a role for flavonols in functional pollen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (15). 7213–7217.
- Moor, U.; Karp, K.; Pöldma, P.; Pae, A.** (2005): Cultural Systems Affect Content of Anthocyanins and Vitamin C in Strawberry Fruits. *European Journal of Horticultural Science* 70 (4). 195–201.
- Moyano, E.; Portero-Robles, I.; Medina-Escobar, N.; Valpuesta, V.; Muñoz-Blanco, J.; Caballero, J. L.** (1998): A fruit-specific putative dihydroflavonol 4-reductase gene is differentially expressed in strawberry during the ripening process. *Plant Physiology* 117 (2). 711–716.
- Mugford, S. T.; Qi, X.; Bakht, S.; Hill, L.; Wegel, E.; Hughes, R. K. et al.** (2009): A serine carboxypeptidase-like acyltransferase is required for synthesis of antimicrobial compounds and disease resistance in oats. *The Plant Cell* 21 (8). 2473–2484.
- Muhlemann, J. K.; Younts, T. L. B.; Muday, G. K.** (2018): Flavonols control pollen tube growth and integrity by regulating ROS homeostasis during high-temperature stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115 (47). E111188-E111197.
- Muñoz, C.; Hoffmann, T.; Escobar, N. M.; Ludemann, F.; Botella, M. A.; Valpuesta, V.; Schwab, W.** (2010): The strawberry fruit Fra a allergen functions in flavonoid biosynthesis. *Molecular Plant* 3 (1). 113–124.

- Muñoz, C.; Sánchez-Sevilla, J. F.; Botella, M. A.; Hoffmann, T.; Schwab, W.; Valpuesta, V.** (2011): Polyphenol composition in the ripe fruits of *Fragaria* species and transcriptional analyses of key genes in the pathway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59 (23). 12598–12604.
- Musidlowska-Persson, A.; Alm, R.; Emanuelsson, C.** (2007): Cloning and sequencing of the Bet v 1-homologous allergen Fra a 1 in strawberry (*Fragaria ananassa*) shows the presence of an intron and little variability in amino acid sequence. *Molecular Immunology* 44 (6). 1245–1252.
- Nakayama, T.; Suzuki, H.; Nishino, T.** (2003): Anthocyanin acyltransferases: specificities, mechanism, phylogenetics, and applications. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 23 (2-6). 117–132.
- Nemec, S.** (1976): Response of three root rot fungi to strawberry phenolics and the relation of phenolics to disease resistance. *Mycopathologia* 1 (59). 37–40.
- Neri, D.; Baruzzi, G.; Massetani, F.; Faedi, W.** (2012): Strawberry production in forced and protected culture in Europe as a response to climate change. *Canadian Journal of Plant Science* 92 (6). 1021–1036.
- Neuwirth, E.** (2014): RColorBrewer. **ColorBrewer Palettes**. Version 1.1-2. Online verfügbar unter <https://CRAN.R-project.org/package=RColorBrewer>.
- Nguyen, N. H.; Kim, J. H.; Kwon, J.; Jeong, C. Y.; Lee, W.; Lee, D. et al.** (2016): Characterization of *Arabidopsis thaliana* FLAVONOL SYNTHASE 1 (FLS1) -overexpression plants in response to abiotic stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 103. 133–142.
- Nielsen, K.; Deroles, S. C.; Markham, K. R.; Bradley, M. J.; Podivinsky, E.; Manson, D.** (2002): Antisense flavonol synthase alters copigmentation and flower color in *lisianthus*. *Molecular Breeding* 9 (4). 217–229.
- Niemetz, R.; Gross, G. G.** (2001): Gallotannin biosynthesis: b-glucogallin: hexagalloyl 3-O-galloyltransferase from *Rhus typhina* leaves. *Phytochemistry* 58. 657–661.
- Niemetz, R.; Gross, G. G.** (2003): Ellagitannin biosynthesis: laccase-catalyzed dimerization of tellimagrandin II to cornusiiin E in *Tellima grandiflora*. *Phytochemistry* 64 (7). 1197–1201.
- Niemetz, R.; Gross, G. G.** (2005): Enzymology of gallotannin and ellagitannin biosynthesis. *Phytochemistry* 66 (17). 2001–2011.
- Nitsch, J. P.** (1950): Growth and Morphogenesis of the Strawberry as Related to Auxin. *American Journal of Botany* 37 (3). 211.

Nizioł, J.; Misiorek, M.; Ruman, T. (2019): Mass spectrometry imaging of low molecular weight metabolites in strawberry fruit (*Fragaria x ananassa* Duch.) cv. Primoris with 109Ag nanoparticle enhanced target. *Phytochemistry* 159. 11–19.

Noctor, G.; Gomez, L.; Vanacker, H.; Foyer, C. H. (2002): Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. *Journal of Experimental Botany* 53 (372). 1283–1304.

Noctor, G.; Mhamdi, A.; Chaouch, S.; Han, Y.; Neukermans, J.; Marquez-Garcia, B. et al. (2012): Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant, Cell & Environment* 35 (2). 454–484.

Nuzzi, M.; Lo Scalzo, R.; Testoni, A.; Rizzolo, A. (2008): Evaluation of Fruit Aroma Quality: Comparison Between Gas Chromatography–Olfactometry (GC–O) and Odour Activity Value (OAV) Aroma Patterns of Strawberries. *Food Analytical Methods* 1 (4). 270–282.

Ogle, D. H.; Wheeler, P.; Dinno, A. (2020): FSA. **Fisheries Stock Analysis**. Version 0.8.30. Online verfügbar unter <https://github.com/droglenc/FSA>.

Ohlrogge, J. B.; Jaworski, J. G. (1997): Regulation of fatty acid synthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48. 109–136.

Okochi, S.; Ishibashi, M.; Yoshikawa, H.; Uno, Y. (2020): Response of the Major Allergen Fra a 1.01 in Strawberry to Cold. *The Horticulture Journal* 89 (2). 182–190.

Okutsu, K.; Matsushita, K.; Ikeda Takashi (2018): Differential Anthocyanin Concentrations and Expression of Anthocyanin Biosynthesis Genes in Strawberry ‘Sachinoka’ during Fruit Ripening under High-temperature Stress. *Environment Control in Biology* 56 (1). 1–6.

Ong, P. K.; Acree, T. E. (1999): Similarities in the aroma chemistry of Gewürztraminer variety wines and lychee (*Litchi chinesis* sonn.) fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47 (2). 665–670.

Orozco-Navarrete, B.; Kaczmarska, Z.; Dupeux, F.; Garrido-Arandia, M.; Pott, D.; Perales, A. D. et al. (2020): Structural Bases for the Allergenicity of Fra a 1.02 in Strawberry Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

Oszmiański, J.; Wojdyło, A.; Gorzelany, J.; Kapusta, I. (2011): Identification and characterization of low molecular weight polyphenols in berry leaf extracts by HPLC-DAD and LC-ESI/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59 (24). 12830–12835.

Palencia, P.; Giné Bordonaba, J.; Martínez, F.; Terry, L. A. (2016): Investigating the effect of different soilless substrates on strawberry productivity and fruit composition. *Scientia Horticulturae* 203. 12–19.

Palme, K.; Gälweiler, L. (1999): PIN-pointing the molecular basis of auxin transport. *Current Opinion in Plant Biology* 2 (5). 375–381.

Palmieri, L.; Masuero, D.; Martinatti, P.; Baratto, G.; Martens, S.; Vrhovsek, U. (2017): Genotype-by-environment effect on bioactive compounds in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 97 (12). 4180–4189.

Paquette, M.; Medina Larqué, A. S.; Weisnagel, S. J.; Desjardins, Y.; Marois, J.; Pilon, G. et al. (2017): Strawberry and cranberry polyphenols improve insulin sensitivity in insulin-resistant, non-diabetic adults: a parallel, double-blind, controlled and randomised clinical trial. *The British Journal of Nutrition* 117 (4). 519–531.

Park, S.; Kim, D.-H.; Park, B.-R.; Lee, J.-Y.; Lim, S.-H. (2019): Molecular and Functional Characterization of *Oryza sativa* Flavonol Synthase (OsFLS), a Bifunctional Dioxygenase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 67 (26). 7399–7409.

Park, S.; Kim, D.-H.; Yang, J.-H.; Lee, J.-Y.; Lim, S.-H. (2020): Increased Flavonol Levels in Tobacco Expressing AcFLS Affect Flower Color and Root Growth. *International Journal of Molecular Sciences* 21 (3).

Paulsmeyer, M.; Chatham, L.; Becker, T.; West, M.; West, L.; Juvik, J. (2017): Survey of Anthocyanin Composition and Concentration in Diverse Maize Germplasms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65 (21). 4341–4350.

Peer, W. A.; Murphy, A. S. (2007): Flavonoids and auxin transport: modulators or regulators? *Trends in Plant Science* 12 (12). 556–563.

Peleg, H.; Gacon, K.; Schlich, P.; Noble, A. C. (1999): Bitterness and astringency of flavan-3-ol monomers, dimers and trimers. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79 (8). 1123–1128.

Peng, C.; Lu, Z.; Xie, Z.; Cheng, Z.; Chen, Y.; Tan, M. et al. (2011): The first identification of lysine malonylation substrates and its regulatory enzyme. *Molecular & Cellular Proteomics* 10 (12). M111.012658.

Pérez, A. G.; Olías, R.; Olías, J. M.; Sanz, C. (1999): Biosynthesis of 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone and derivatives in in vitro grown strawberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47 (2). 655–658.

Peters, S.; Imani, J.; Mahler, V.; Foetisch, K.; Kaul, S.; Paulus, K. E. et al. (2011): Dau c 1.01 and Dau c 1.02-silenced transgenic carrot plants show reduced allergenicity to patients with carrot allergy. *Transgenic Research* 20 (3). 547–556.

Peterson, B. G.; Carl, P. (2020): PerformanceAnalytics. **Econometric Tools for Performance and Risk Analysis**. Version 2.0.4. Online verfügbar unter <https://CRAN.R-project.org/package=PerformanceAnalytics>.

Petit, A. (2017): Strawberry breeding in France. 1st Berry School. **Ciref**. UMA, Málaga(21.03.2017).

Poms, R. E.; Klein, C. L.; Anklam, E. (2004): Methods for allergen analysis in food: a review. *Food Additives and Contaminants* 21 (1). 1–31.

Preciado-Rangel, P.; Troyo-Diéguez, E.; Valdez-Aguilar, L. A.; García-Hernández, J. L.; Luna-Ortega, J. G. (2020): Interactive Effects of the Potassium and Nitrogen Relationship on Yield and Quality of Strawberry Grown Under Soilless Conditions. *Plants* 9 (4).

Prescott, A. G. (2000): Two-oxoacid-dependent dioxygenases: Inefficient enzymes or evolutionary driving force? *in*: Romeo, J.; Ibraim, R.; Varin, L.; Luca, V. de: Evolution of Metabolic Pathways. 34. Aufl. Elsevier Science, Oxford. 249–284.

Protein Data Bank (PDB) (2020). Online verfügbar unter <https://www.rcsb.org/>, 23.02.2020.

Puehringer, H. M.; Zinoecker, I.; Marzban, G.; Katinger, H.; Laimer, M. (2003): MdAP, a novel protein in apple, is associated with the major allergen Mal d 1. *Gene* 321. 173–183.

Puhl, I.; Treutter, D. (2008): Ontogenetic variation of catechin biosynthesis as basis for infection and quiescence of *Botrytis cinerea* in developing strawberry fruits. *Journal of Plant Diseases and Protection* 6 (115). 1861–3829.

Quideau, S. (2009): Chemistry and biology of ellagitannins. **An underestimated class of bioactive plant polyphenols**. World Scientific, Hackensack, NJ.

Raab, T.; Hauck, T.; Knecht, A.; Schmitt, U.; Holzgrabe, U.; Schwab, W. (2003): Tautomerism of 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone: evidence for its enantioselective biosynthesis. *Chirality* 15 (7). 573–578.

Raab, T.; López-Ráez, J. A.; Klein, D.; Caballero, J. L.; 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 (4). 1023–1037.

Radauer, C.; Breiteneder, H. (2007): Evolutionary biology of plant food allergens. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 120 (3). 518–525.

Rafiei, H.; Omidian, K.; Bandy, B. (2019): Phenolic Breakdown Products of Cyanidin and Quercetin Contribute to Protection against Mitochondrial Impairment and Reactive Oxygen

Species Generation in an In Vitro Model of Hepatocyte Steatosis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 67 (22). 6241–6247.

Ramakrishna, A.; Ravishankar, G. A. (2011): Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior* 6 (11). 1720–1731.

Rinaldo, A. R.; Cavallini, E.; Jia, Y.; Moss, S. M. A.; McDavid, D. A. J.; Hooper, L. C. et al. (2015): A Grapevine Anthocyanin Acyltransferase, Transcriptionally Regulated by VvMYBA, Can Produce Most Acylated Anthocyanins Present in Grape Skins. *Plant Physiology* 169 (3). 1897–1916.

Ring, L. (2013): Untersuchungen zur Regulation der Polyphenolbiosynthese in der Erdbeerfrucht (*Fragaria x ananassa*) mittels Metabolite Profiling. **Technische Universität München**, Freising.

Ring, L.; Yeh, S.-Y.; Hücherig, S.; Hoffmann, T.; Blanco-Portales, R.; Fouche, M. et al. (2013): Metabolic interaction between anthocyanin and lignin biosynthesis is associated with peroxidase FaPRX27 in strawberry fruit. *Plant Physiology* 163 (1). 43–60.

Rodin, J. O.; Himel, C. M.; Silverstein, R. M.; Leeper, R. W.; Gortner, W. A. (1965): Volatile Flavor and Aroma Components of Pineapple. I. Isolation and Tentative Identification of 2,5-Dimethyl-4-Hydroxy-3(2H)-Furanone. *Journal of Food Science* 30 (2). 280–285.

Roscher, R.; Bringmann, G.; Schreier, P.; Schwab, W. (1998): Radiotracer Studies on the Formation of 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2 H)-furanone in Detached Ripening Strawberry Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46 (4). 1488–1493.

Roscher, R.; Herderich, M.; Steffen, J. P.; Schreier, P.; Schwab, W. (1996): 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3[2H]-furanone 6'O-melonyl-beta-D-glucopyranoside in strawberry fruits. *Phytochemistry* 43 (1). 155–159.

Roscher, R.; Schwab, W.; Schreier, P. (1997): Stability of naturally occurring 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3 [2H]-furanone derivatives. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* 204 (6). 438–441.

Rösler, J.; Krekel, F.; Amrhein, N.; Schmid, J. (1997): Maize phenylalanine ammonia-lyase has tyrosine ammonia-lyase activity. *Plant Physiology* 113 (1). 175–179.

Rosli, H. G.; Civello, P. M.; Martínez, G. A. (2004): Changes in cell wall composition of three *Fragaria x ananassa* cultivars with different softening rate during ripening. *Plant Physiology and Biochemistry* 42 (10). 823–831.

Ross, J.; Li, Y.; Lim, E.; Bowles, D. J. (2001): Higher plant glycosyltransferases. *Genome Biology* 2 (2). reviews3004.1-3004.6.

- Rossetto, M.; Vanzani, P.; Mattivi, F.; Lunelli, M.; Scarpa, M.; Rigo, A.** (2002): Synergistic antioxidant effect of catechin and malvidin 3-glucoside on free radical-initiated peroxidation of linoleic acid in micelles. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 408. 239–245.
- Rousseau-Gueutin, M.; Gaston, A.; Aïnouche, A.; Aïnouche, M. L.; Olbricht, K.; Staudt, G. et al.** (2009): Tracking the evolutionary history of polyploidy in *Fragaria L.* (strawberry): new insights from phylogenetic analyses of low-copy nuclear genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 51 (3). 515–530.
- Roxas, V. P.; Smith, R. K.; Allen, E. R.; Allen, R. D.** (1997): Overexpression of glutathione S-transferase/glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress. *Nature Biotechnology* 15 (10). 988–991.
- RÖMPP.** Georg Thieme Verlag (2019). <https://roempp.thieme.de/roempp4.0/do/Welcome.do>, 25.11.2019.
- Ruiz, J. M.; Blumwald, E.** (2002): Salinity-induced glutathione synthesis in *Brassica napus*. *Planta* 214 (6). 965–969.
- Salvatierra, A.; Pimentel, P.; Moya-León, M. A.; Herrera, R.** (2013): Increased accumulation of anthocyanins in *Fragaria chiloensis* fruits by transient suppression of FcMYB1 gene. *Phytochemistry* 90. 25–36.
- Sasaki, Y.; Nagano, Y.** (2004): Plant acetyl-CoA carboxylase: structure, biosynthesis, regulation, and gene manipulation for plant breeding. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 68 (6). 1175–1184.
- 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 (1). 227–232.
- Schijlen, E. G. W. M.; Ric de Vos, C. H.; van Tunen, A. J.; Bovy, A. G.** (2004): Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants. *Phytochemistry* 65 (19). 2631–2648.
- Schmid, J.; Amrhein, N.** (1995): Molecular organisation of the shikimate pathway in higher plants. *Phytochemistry* 39 (4). 737–749.
- Schneider, C.** (2005): Entwicklung, Optimierung und Validierung eines Immunoassays zur sensitiven Detektion des endokrinen Disruptors 17 α -Ethinylestradiol. Dissertation. **Universität Bonn**, Bonn.
- Schoch, G.; Goepfert, S.; Morant, M.; Hehn, A.; Meyer, D.; Ullmann, P.; Werck-Reichhart, D.** (2001): CYP98A3 from *Arabidopsis thaliana* is a 3'-hydroxylase of phenolic esters, a missing

link in the phenylpropanoid pathway. *The Journal of Biological Chemistry* 276 (39). 36566–36574.

Schulenburg, K.; Feller, A.; Hoffmann, T.; Schecker, J. H.; Martens, S.; Schwab, W. (2016): Formation of β -glucogallin, the precursor of ellagic acid in strawberry and raspberry. *Journal of Experimental Botany* 67 (8). 2299–2308.

Schwab, W. (2013): Natural 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone (Furaneol®). *Molecules* 18 (6). 6936–6951.

Schwab, W.; Davidovich-Rikanati, R.; Lewinsohn, E. (2008): Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. *The Plant Journal* 54 (4). 712–732.

Schwab, W.; Hoffmann, T.; Kalinowski, G.; Preuß, A. (2011): Functional Genomics in Strawberry Fruit through RNAi-mediated Silencing. *Genes, Genomes and Genomics* 5 (1). 91–101.

Schwab, W.; Schaart, J. G.; Rosati, C. (2009): Functional Molecular Biology research in *Fragaria*. in: Folta, K. M.; Gardiner, S. E.: Genetics and Genomics of Rosacea. Springer, New York (Plant Genetics and Genomics: Crops and Models, 6). 457–486.

Schweimer, K.; Sticht, H.; Nerkamp, J.; Boehm, M.; Breitenbach, M.; Vieths, S.; Rösch, P. (1999): NMR spectroscopy reveals common structural features of the birch pollen allergen Bet v 1 and the cherry allergen Pru a 1. *Applied Magnetic Resonance* 17 (2-3). 449–464.

Schwieterman, M. L.; Colquhoun, T. A.; Jaworski, E. A.; Bartoshuk, L. M.; Gilbert, J. L.; Tieman, D. M. et al. (2014): Strawberry flavor: diverse chemical compositions, a seasonal influence, and effects on sensory perception. *PloS one* 9 (2). e88446.

Seeram, N. P. (2008): Berry fruits: compositional elements, biochemical activities, and the impact of their intake on human health, performance, and disease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (3). 627–629.

Seutter von Loetzen, C.; Hoffmann, T.; Hartl, M. J.; Schweimer, K.; Schwab, W.; Rösch, P.; Hartl-Spiegelhauer, O. (2014): Secret of the major birch pollen allergen Bet v 1: identification of the physiological ligand. *The Biochemical Journal* 457 (3). 379–390.

Seutter von Loetzen, C.; Jacob, T.; Hartl-Spiegelhauer, O.; Vogel, L.; Schiller, D.; Spörlein-Güttler, C. et al. (2015): Ligand Recognition of the Major Birch Pollen Allergen Bet v 1 is Isoform Dependent. *PloS one* 10 (6).

Seutter von Loetzen, C.; Reuter, A.; Spiric, J.; Schulenburg, T.; Bellinghausen, I.; Völker, E. et al. (2019): Quality and potency profile of eight recombinant isoallergens, largely

mimicking total Bet v 1-specific IgE binding of birch pollen. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 49 (5). 712–723.

Seutter von Loetzen, C.; Schweimer, K.; Schwab, W.; Rösch, P.; Hartl-Spiegelhauer, O. (2012): Solution structure of the strawberry allergen Fra a 1. *Bioscience Reports* 32 (6). 567–575.

Severo, J.; Oliveira, I. R. de; Tiecher, A.; Chaves, F. C.; Rombaldi, C. V. (2015): Postharvest UV-C treatment increases bioactive, ester volatile compounds and a putative allergenic protein in strawberry. *LWT - Food Science and Technology* 64 (2). 685–692.

Shulaev, V.; Korban, S. S.; Sosinski, B.; Abbott, A. G.; Aldwinckle, H. S.; Folta, K. M. et al. (2008): Multiple models for Rosaceae genomics. *Plant Physiology* 147 (3). 985–1003.

Shulaev, V.; Sargent, D. J.; Crowhurst, R. N.; Mockler, T. C.; Folkerts, O.; Delcher, A. L. et al. (2011): The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). *Nature Genetics* 43 (2). 109–116.

Signorell, A.; et mult. al. (2020): DescTools. **Tools for descriptive statistics**. Version 0.99.32.

Silva-Navas, J.; Moreno-Risueno, M. A.; Manzano, C.; Téllez-Robledo, B.; Navarro-Neila, S.; Carrasco, V. et al. (2016): Flavonols Mediate Root Phototropism and Growth through Regulation of Proliferation-to-Differentiation Transition. *The Plant Cell* 28 (6). 1372–1387.

Sinha, M.; Singh, R. P.; Kushwaha, G. S.; Iqbal, N.; Singh, A.; Kaushik, S. et al. (2014): Current overview of allergens of plant pathogenesis related protein families. *The Scientific World Journal* 2014. 543195.

Slaughter, J. C. (1999): The naturally occurring furanones: formation and function from pheromone to food. *Biological Reviews* 74 (3). 259–276.

Slovin, J. P.; Michael, T. P. (2011): Strawberry. **Structural and Functional Genomics**. in: Folta, K. M.; Kole, C.: Genetics, Genomics and Breeding of Berries. Science Publishers, Enfield (Genetics, Genomics and Breeding of Crop Plant). 162–193.

Slowikowski, K. (2019): ggrepel. **Automatically Position Non-Overlapping Text Labels with 'ggplot2'**. Version 0.8.1. Online verfügbar unter <https://CRAN.R-project.org/package=ggrepel>.

Smith, C. A. (2010): LC/MS Preprocessing and Analysis with xcms.

- Song, C.; Hong, X.; Zhao, S.; Liu, J.; Schulenburg, K.; Huang, F.-C. et al.** (2016): Glucosylation of 4-Hydroxy-2,5-Dimethyl-3(2H)-Furanone, the Key Strawberry Flavor Compound in Strawberry Fruit. *Plant Physiology* 171 (1). 139–151.
- Song, C.; Le Gu; Liu, J.; Zhao, S.; Hong, X.; Schulenburg, K.; Schwab, W.** (2015): Functional Characterization and Substrate Promiscuity of UGT71 Glycosyltransferases from Strawberry (*Fragaria × ananassa*). *Plant & Cell Physiology* 56 (12). 2478–2493.
- Soria, C.** (2017): Strawberry breeding in Spain. 1st Berry School. **INRA**. UMA, Málaga(21.03.2017).
- Spiric, J.; Engin, A. M.; Karas, M.; Reuter, A.** (2015): Quality Control of Biomedical Allergen Products - Highly Complex Isoallergen Composition Challenges Standard MS Database Search and Requires Manual Data Analyses. *PLoS one* 10 (11). e0142404.
- Statistisches Bundesamt (StBA)** (2018): Gemüseerhebung. **Anbau und Ernte von Gemüse und Erdbeeren**. Fachserie 3 (3.1.3). Online verfügbar unter https://www.destatis.de/DE/Themen/Branchen-Unternehmen/Landwirtschaft-Forstwirtschaft-Fischerei/Obst-Gemuese-Gartenbau/Publikationen/Downloads-Gemuese/gemueseerhebung-2030313187004.pdf?__blob=publicationFile, 21.10.2019.
- Staudt, G.** (1962): Taxonomic studies in the genus *fragaria* typification of *fragaria* species known at the time of linnaeus. *Canadian Journal of Botany* 40 (6). 869–886.
- Staudt, G.** (1999): Systematics and Geographic Distribution of the American Strawberry Species. **Taxonomic Studies in the Genus *Fragaria* (Rosaceae: Potentillae)**. University of California Publications in Botany, Berkeley (81).
- Stewart, P. J.** (2011): Strawberry. ***Fragaria* History and Breeding**. in: Folta, K. M.; Kole, C.: Genetics, Genomics and Breeding of Berries. Science Publishers, Enfield (Genetics, Genomics and Breeding of Crop Plant). 114–137.
- Steyn, W. J.** (2009): Prevalence and Functions of Anthocyanins in Fruits. in: Gould, K.; Davies, K. M.; Winefield, C.: Anthocyanins. Biosynthesis, functions, and applications. Springer, New York. 85–105.
- Steyn, W. J.; Wand, S. J. E.; Holcroft, D. M.; Jacobs, G.** (2002): Anthocyanins in vegetative tissues: a proposed unified function in photoprotection. *New Phytologist* 155 (3). 349–361.
- Striegel, L.; Chebib, S.; Netzel, M. E.; Rychlik, M.** (2018): Improved Stable Isotope Dilution Assay for Dietary Foliates Using LC-MS/MS and Its Application to Strawberries. *Frontiers in Chemistry* 6. 11.

Sugiyama, M.; Katsube, T.; Koyama, A.; Itamura, H. (2013): Varietal differences in the flavonol content of mulberry (*Morus* spp.) leaves and genetic analysis of quercetin 3-(6-malonylglucoside) for component breeding. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61 (38). 9140–9147.

Suzuki, H.; Nakayama, T.; Nishino, T. (2003): Proposed mechanism and functional amino acid residues of malonyl-CoA:anthocyanin 5-O-glucoside-6"-O-malonyltransferase from flowers of *Salvia splendens*, a member of the versatile plant acyltransferase family. *Biochemistry* 42 (6). 1764–1771.

Suzuki, H.; Nakayama, T.; Yamaguchi, M.-A.; Nishino, T. (2004a): cDNA cloning and characterization of two *Dendranthemaxmorifolium* anthocyanin malonyltransferases with different functional activities. *Plant Science* 166 (1). 89–96.

Suzuki, H.; Nakayama, T.; Yonekura-Sakakibara, K.; Fukui, Y.; Nakamura, N.; Nakao, M. et al. (2001): Malonyl-CoA:anthocyanin 5-O-glucoside-6"-O-malonyltransferase from scarlet sage (*Salvia splendens*) flowers. Enzyme purification, gene cloning, expression, and characterization. *The Journal of Biological Chemistry* 276 (52). 49013–49019.

Suzuki, H.; Nakayama, T.; Yonekura-Sakakibara, K.; Fukui, Y.; Nakamura, N.; Yamaguchi, M.-A. et al. (2002): cDNA cloning, heterologous expressions, and functional characterization of malonyl-coenzyme A: anthocyanidin 3-o-glucoside-6"-o-malonyltransferase from dahlia flowers. *Plant Physiology* 130 (4). 2142–2151.

Suzuki, H.; Sawada, S.'y.; Watanabe, K.; Nagae, S.; Yamaguchi, M.-A.; Nakayama, T.; Nishino, T. (2004b): Identification and characterization of a novel anthocyanin malonyltransferase from scarlet sage (*Salvia splendens*) flowers: an enzyme that is phylogenetically separated from other anthocyanin acyltransferases. *The Plant Journal* 38 (6). 994–1003.

Taguchi, G.; Shitchi, Y.; Shirasawa, S.; Yamamoto, H.; Hayashida, N. (2005): Molecular cloning, characterization, and downregulation of an acyltransferase that catalyzes the malonylation of flavonoid and naphthol glucosides in tobacco cells. *The Plant Journal* 42 (4). 481–491.

Takechi, M.; Tanaka, Y.; Takehara, M.; Nonaka, G.-I.; Nishioka, I. (1985): Structure and antiherpetic activity among the Tannins. *Phytochemistry* 24 (10). 2245–2250.

Tenessen, J. A.; Govindarajulu, R.; Ashman, T.-L.; Liston, A. (2014): Evolutionary origins and dynamics of octoploid strawberry subgenomes revealed by dense targeted capture linkage maps. *Genome Biology and Evolution* 6 (12). 3295–3313.

Tian, J.; Han, Z.-y.; Zhang, J.; Hu, Y.; Song, T.; Yao, Y. (2015): The Balance of Expression of Dihydroflavonol 4-reductase and Flavonol Synthase Regulates Flavonoid Biosynthesis and Red Foliage Coloration in Crabapples. *Scientific Reports* 5. 12228.

Tiffney, B. H. (2004): Vertebrate Dispersal of Seed Plants Through Time. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 35 (1). 1–29.

Tikunov, Y. M.; Vos, R. C. H. de; González Paramás, A. M. x.; Hall, R. D.; Bovy, A. G. (2010): A role for differential glycoconjugation in the emission of phenylpropanoid volatiles from tomato fruit discovered using a metabolic data fusion approach. *Plant Physiology* 152 (1). 55–70.

Tobimatsu, Y.; Schuetz, M. (2019): Lignin polymerization: how do plants manage the chemistry so well? *Current Opinion in Biotechnology* 56. 75–81.

Toufektsian, M.-C.; Lorgetil, M.; Nagy, N.; Salen, P.; Donati, M. B.; Giordano, L. et al. (2008): Chronic Dietary Intake of Plant-Derived Anthocyanins Protects the Rat Heart against Ischemia-Reperfusion Injury. *The Journal of Nutrition* 138 (4). 747–752.

Treftz, C.; Omaye, S. T. (2015): Nutrient Analysis of Soil and Soilless Strawberries and Raspberries Grown in a Greenhouse. *Food and Nutrition Sciences* 06 (09). 805–815.

Trejo-Téllez, L. I.; Gómez-Merino, F. C. (2014): Nutrient management in strawberry. Effects on yield, quality and plant health. in: Malone, N.: Strawberries. Nova Publishers, New York (Nutrition and diet research progress).

Tsuda, T. (2012): Dietary anthocyanin-rich plants: biochemical basis and recent progress in health benefits studies. *Molecular Nutrition & Food Research* 56 (1). 159–170.

Tulipani, S.; Marzban, G.; Herndl, A.; Laimer, M.; Mezzetti, B.; Battino, M. (2011): Influence of environmental and genetic factors on health-related compounds in strawberry. *Food Chemistry* 124 (3). 906–913.

Tulipani, S.; Romandini, S.; Alvarez Suarez, J. M.; Capocasa, F.; Mezzetti, B.; Busco, F. et al. (2008): Folate content in different strawberry genotypes and folate status in healthy subjects after strawberry consumption. *BioFactors* 34. 47–55.

Ulrich, D.; Kecke, S.; Olbricht, K. (2018): What Do We Know about the Chemistry of Strawberry Aroma? *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66 (13). 3291–3301.

Ulrich, D.; Olbricht, K. (2017): Searching for chemical and sensory parameters for flavor enhancement in strawberry breeding. *Acta Horticulturae* (1156). 653–660.

- Unno, H.; Ichimaida, F.; Suzuki, H.; Takahashi, S.; Tanaka, Y.; Saito, A. et al.** (2007): Structural and mutational studies of anthocyanin malonyltransferases establish the features of BAHD enzyme catalysis. *The Journal of Biological Chemistry* 282 (21). 15812–15822.
- Urrutia, M.; Schwab, W.; Hoffmann, T.; Monfort, A.** (2016): Genetic dissection of the (poly)phenol profile of diploid strawberry (*Fragaria vesca*) fruits using a NIL collection. *Plant Science* 242. 151–168.
- Valenta, R.** (2002): The future of antigen-specific immunotherapy of allergy. *Nature Reviews Immunology* 2 (6). 446–453.
- Vallarino, J. G.; Osorio, S.; Bombarely, A.; Casañal, A.; Cruz-Rus, E.; Sánchez-Sevilla, J. F. et al.** (2015): Central role of FaGAMYB in the transition of the strawberry receptacle from development to ripening. *The New Phytologist* 208 (2). 482–496.
- van Buren, J. P.; Bertino, J. J.; Robinson, W. B.** (1968): The Stability of Wine Anthocyanins on Exposure to Heat and Light. *American Journal of Enology and Viticulture* 19 (3). 147–154.
- van Hoed, V.; Clercq, N. de; Echim, C.; Andjelkovic, M.; Leber, E.; Dewettinck, K.; Verhe, R.** (2009): Berry seeds: a source of specialty oils with high content of bioactives and nutritional value. *Journal of Food Lipids* 16 (1). 33–49.
- van Loon, L. C.; Rep, M.; Pieterse, C. M. J.** (2006): Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* 44. 135–162.
- Vanholme, R.; Cesarino, I.; Rataj, K.; Xiao, Y.; Sundin, L.; Goeminne, G. et al.** (2013): Caffeoyl shikimate esterase (CSE) is an enzyme in the lignin biosynthetic pathway in *Arabidopsis*. *Science (New York, N.Y.)* 341 (6150). 1103–1106.
- LMIV 1169/2011:** Verordnung (EU) Nr. 1169/2011 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 25. Oktober betreffend die Information der Verbraucher über Lebensmittel (ABl. L 304 S. 18, ber. ABl. 2014 L 331 S. 41, ber. ABl. 2015 L 50 S. 48, ber. ABl. 2016 L 266 S. 7) Celex-Nr. 3 2011 R 1169 Zuletzt geändert durch Art. 33 ÄndVO (EU) 2015/2283 vom 25.11.2015 (ABl. L 327 S. 1)
- Vetter, J.** (2000): Plant cyanogenic glycosides. *Toxicon* 38 (1). 11–36.
- Vieths, S.; Scheurer, S.; Ballmer-Weber, B.** (2002): Current Understanding of Cross-Reactivity of Food Allergens and Pollen. *Annals New York Academy of Sciences* 964. 47–68.
- Visco, V.; Dolecek, C.; Denépoux, S.; Le Mao, J.; Guret, C.; Rousset, F. et al.** (1996): Human IgG monoclonal antibodies that modulate the binding of specific IgE to birch pollen Bet v 1. *Journal of Immunology* 157 (2). 956–962.

- Wang, P.; Liu, Y.; Zhang, L.; Wang, W.; Hou, H.; Zhao, Y. et al.** (2020): Functional demonstration of plant flavonoid carbocations proposed to be involved in the biosynthesis of proanthocyanidins. *The Plant Journal* 101 (1). 18–36.
- Wang, S. Y.; Millner, P.** (2009): Effect of different cultural systems on antioxidant capacity, phenolic content, and fruit quality of strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (20). 9651–9657.
- Wang, S. Y.; Zheng, W.** (2001): Effect of plant growth temperature on antioxidant capacity in strawberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (10). 4977–4982.
- Wang, S. Y.; Zheng, W.; Galletta, G. J.** (2002): Cultural system affects fruit quality and antioxidant capacity in strawberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (22). 6534–6542.
- Wang, X.** (2009): Structure, mechanism and engineering of plant natural product glycosyltransferases. *FEBS Letters* 583 (20). 3303–3309.
- Wei, T.; Simko, V.** (2017): R package "corrplot". **Visualization of a Correlation Matrix.** Version 0.84. Online verfügbar unter <https://github.com/taiyun/corrplot>.
- 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 (6). 755–765.
- Weisel, T.; Baum, M.; Eisenbrand, G.; Dietrich, H.; Will, F.; Stockis, J.-P. et al.** (2006): An anthocyanin/polyphenolic-rich fruit juice reduces oxidative DNA damage and increases glutathione level in healthy probands. *Biotechnology Journal* 1 (4). 388–397.
- Wickham, H.; François, R.; Henry, L.; Müller, K.** (2019): dplyr. **A Grammar of Data Manipulation.** Version 0.8.3. Online verfügbar unter <https://CRAN.R-project.org/package=dplyr>.
- Wilkinson, L.** (1999): The grammar of graphics. Springer, New York, NY (Statistics and computing).
- Willson, M. F.; Whelan, C. J.** (1990): The Evolution of Fruit Color in Fleshy-Fruited Plants. *The American Naturalist* 136 (6). 790–809.
- Wilmouth, R. C.; Turnbull, J. J.; Welford, R. W. D.; Clifton, I. J.; Prescott, A. G.; Schofield, C. J.** (2002): Structure and Mechanism of Anthocyanidin Synthase from *Arabidopsis thaliana*. *Structure* 10. 93–103.

- Withopf, B.; Richling, E.; Roscher, R.; Schwab, W.; Schreier, P.** (1997): Sensitive and Selective Screening for 6'-O-Malonylated Glucoconjugates in Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45 (3). 907–911.
- Xing, L.; Zhang, H.; Qi, R.; Tsao, R.; Mine, Y.** (2019): Recent Advances in the Understanding of the Health Benefits and Molecular Mechanisms Associated with Green Tea Polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 67 (4). 1029–1043.
- Xu, F.; Li, L.; Zhang, W.; Cheng, H.; Sun, N.; Cheng, S.; Wang, Y.** (2012): Isolation, characterization, and function analysis of a flavonol synthase gene from *Ginkgo biloba*. *Molecular Biology Reports* 39 (3). 2285–2296.
- Xu, P.; Zawora, C.; Li, Y.; Wu, J.; Liu, L.; Liu, Z. et al.** (2018): Transcriptome sequencing reveals role of light in promoting anthocyanin accumulation of strawberry fruit. *Plant Growth Regulation* 86 (1). 121–132.
- Xu, Y.; Charles, M. T.; Luo, Z.; Mimeo, B.; Veronneau, P.-Y.; Rolland, D.; Roussel, D.** (2017): Preharvest Ultraviolet C Irradiation Increased the Level of Polyphenol Accumulation and Flavonoid Pathway Gene Expression in Strawberry Fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65 (46). 9970–9979.
- Yamamoto, M.; Nakatsuka, S.; Otani, H.; Kohmoto, K.; Nishimura, S.** (2000): (+)-Catechin acts as an infection-inhibiting factor in strawberry leaf. *Phytopathology* 90 (6). 595–600.
- Yegorov, O.** (2016): rml. **Robust Fitting of Linear Model**. Version 1.2. Online verfügbar unter <https://CRAN.R-project.org/package=rml>.
- Yeh, S.-Y.** (2012): The lignification of strawberry fruit: molecular basis and effects on fruit quality. Dissertation. **Technische Universität München**, Freising.
- Yeh, S.-Y.; Huang, F.-C.; Hoffmann, T.; Mayershofer, M.; Schwab, W.** (2014): FaPOD27 functions in the metabolism of polyphenols in strawberry fruit (*Fragaria* sp.). *Frontiers in Plant Science* 5. 518.
- Yoshida, Y.; Tamura, H.** (2005): Variation in Concentration and Composition of Anthocyanins among Strawberry Cultivars. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 74 (1). 36–41.
- Yoshida, Y.; Tamura, H.; Koyama, N.** (2000): Inheritance of pelargonidin malonylglucoside synthesis in strawberry. *Acta Horticulturae* (522). 147–153.
- Yubero-Serrano, E.-M.; Moyano, E.; Medina-Escobar, N.; Muñoz-Blanco, J.; Caballero, J.-L.** (2003): Identification of a strawberry gene encoding a non-specific lipid transfer protein

that responds to ABA, wounding and cold stress. *Journal of Experimental Botany* 54 (389). 1865–1877.

Zagorchev, L.; Seal, C. E.; Kranner, I.; Odjakova, M. (2013): A central role for thiols in plant tolerance to abiotic stress. *International Journal of Molecular Sciences* 14 (4). 7405–7432.

Zhang, J.; Chen, S.; Li, Y.; Di, B.; Zhang, J.; Liu, Y. (2008a): Effect of high temperature and excessive light on glutathione content in apple peel. *Frontiers of Agriculture in China* 2 (1). 97–102.

Zhang, J.; Zhang, Y.; Dou, Y.; Li, W.; Wang, S.; Shi, W. et al. (2017): Single nucleotide mutation in FvMYB10 may lead to the yellow fruit in *Fragaria vesca*. *Molecular Breeding* 37 (3). 61.

Zhang, Y.; Seeram, N. P.; Lee, R.; Feng, L.; Heber, D. (2008b): Isolation and identification of strawberry phenolics with antioxidant and human cancer cell antiproliferative properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (3). 670–675.

Zhao, F.; Li, G.; Hu, P.; Zhao, X.; Li, L.; Wei, W. et al. (2018): Identification of basic/helix-loop-helix transcription factors reveals candidate genes involved in anthocyanin biosynthesis from the strawberry white-flesh mutant. *Scientific Reports* 8 (1). 2721.

Zhao, J. (2015): Flavonoid transport mechanisms: how to go, and with whom. *Trends in Plant Science* 20 (9). 576–585.

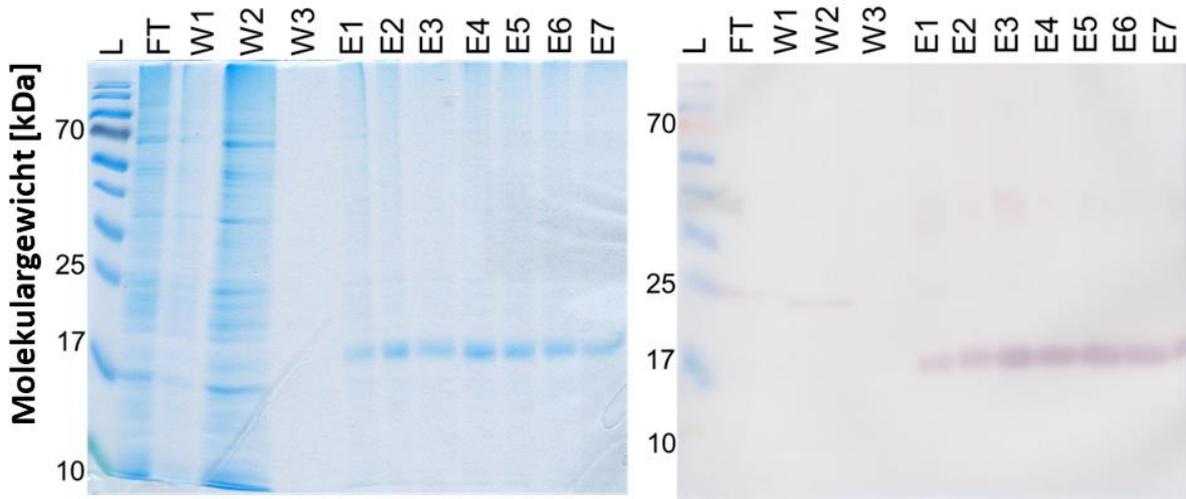
Zhao, J.; Dixon, R. A. (2010): The 'ins' and 'outs' of flavonoid transport. *Trends in Plant Science* 15 (2). 72–80.

Zhao, J.; Huhman, D.; Shadle, G.; He, X.-Z.; Sumner, L. W.; Tang, Y.; Dixon, R. A. (2011): MATE2 Mediates Vacuolar Sequestration of Flavonoid Glycosides and Glycoside Malonates in *Medicago truncatula*. *The Plant Cell* 23. 1536–1555.

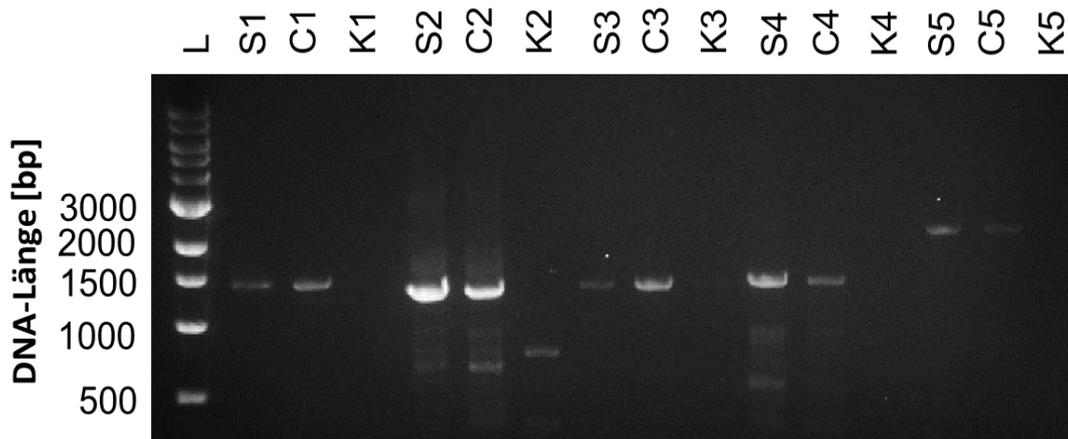
Zhou, X.-W.; Fan, Z.-Q.; Chen, Y.; Zhu, Y.-L.; Li, J.-Y.; Yin, H.-F. (2013): Functional analyses of a flavonol synthase-like gene from *Camellia nitidissima* reveal its roles in flavonoid metabolism during floral pigmentation. *Journal of Biosciences* 38 (3). 593–604.

Zuidmeer, L.; Salentijn, E.; Rivas, M. F.; Mancebo, E. G.; Asero, R.; Matos, C. I. et al. (2006): The role of profilin and lipid transfer protein in strawberry allergy in the Mediterranean area. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 36 (5). 666–675.

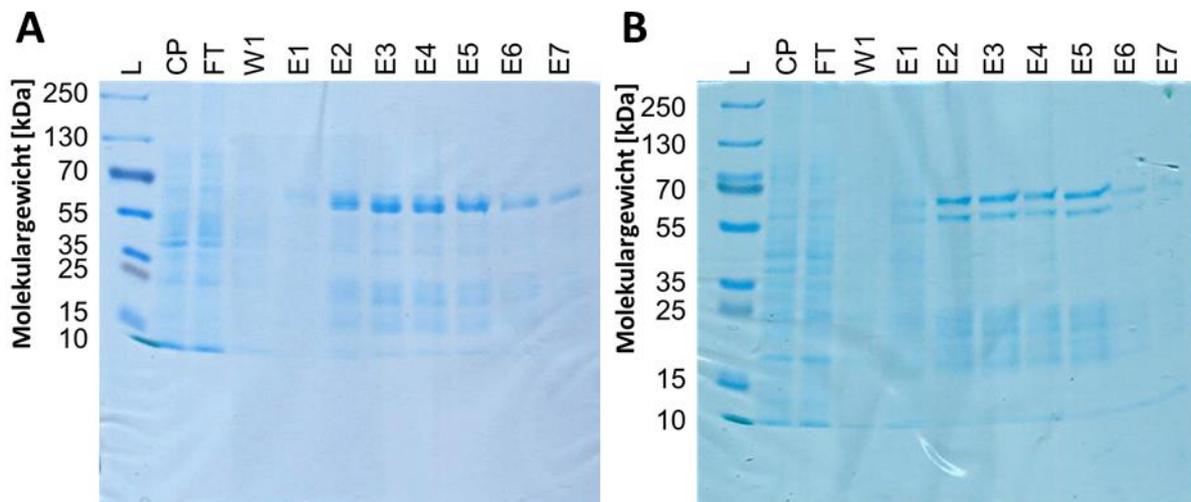
6. Anhang

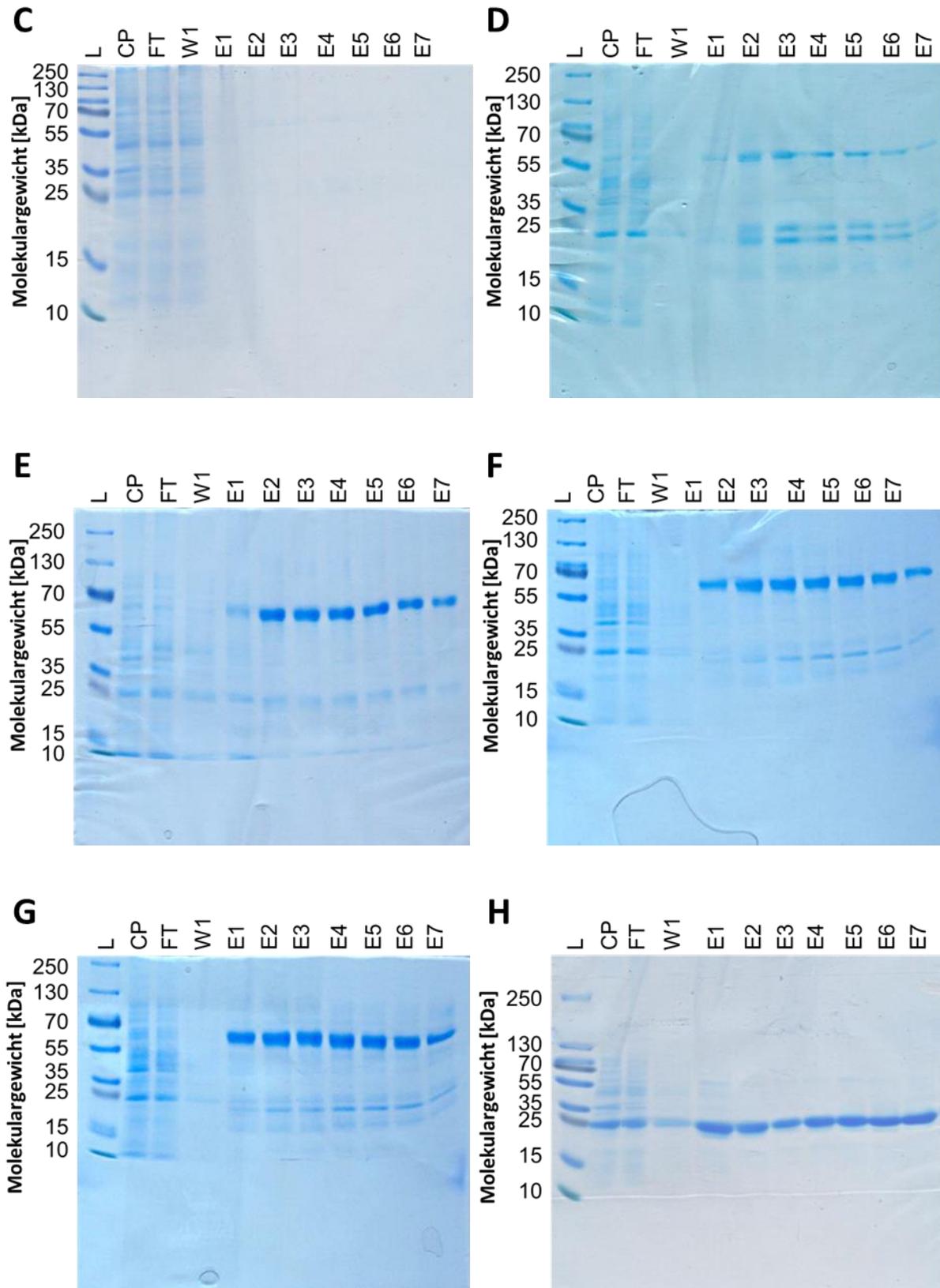


Anhang Abbildung 1: SDS-PAGE und Western-Blot von Fra a 1.02 rekombinant : L – Protein-Molekulargewichtsleiter, FT – Durchfluss, W1-3 – Waschfraktionen 1-3, E1-7 – Protein-Eluate 1-7



Anhang Abbildung 2: Agarosegel der amplifizierten Malonyltransferase-Kandidatengene für die Klonierung: L – DNA-Molekulargewichtsleiter, S1-S5 – DNA-Amplifikate aus 'Senga Sengana', C1-C5 – DNA-Amplifikate aus 'Candongga', K1-K4 – Negativkontrollen





Anhang Abbildung 3: SDS-PAGE rek. Malonyltransferasen: L – Protein-Molekulargewichtsleiter, CP – unaufgereinigtes Rohprotein (Crude Protein), FT – Durchfluss, W1 – Waschfraktionen 1, E1-7 – Protein-Euate 1-7; A: S1, B: C1, C: C2, D: C3, E: C4, F: C5, G: S5, H: Empty Vector Kontrolle

Nucleotid-Sequenz FaMATC1

ATGGCACATCCAAACTCACTTGTAATGTGGTGGAAAGTTTGCAGGGTCGCTCCAAACCCAGGCTC
ACCTGACTCAGCCACACCAGATTTCCCTTCTCTAACCTTGTTTGATATACGTTGGTTAAGGTTTGC
ACCGGTGCAGCGCCTGTACTTCTATGAAATATTTTCCACTGATTCCATAGTCCCCAAACTCAAAGC
CTCCCTCTCTCTCACACTCCAACACTTTCTGCCCTTGCTGGAAACCTCACTTGGCCCCAAGACT
CCCCAAACCCATTCTCCATTATGCCAAAGGTGACACCATTTCACTTACTGTAGCTGAATCCGCTG
CTGATTTTGGCCATCTTTCAAGCAATTACGACTTGCTTGAAGTCCAAGAATACCATCCTCTTGAC
CTCAATTGGAAGCATCTCATGATCGATCTGCAGTAATGGCATTGCAAGTCACTGTCTTCCCCAACA
GAGGCTTTACCATTGGAACATCGATGCACCATGCTGTTTTGGATGGTAAAACCTTCAACCTCCTTCC
TTAAGTCATGGGCTCACATATGCAAACATGAAGAACCGGGATCTTCATCTAGTTTGTGTTACCAG
ATGAGCTAAAGCCATTTTATGACAGAACGGTCATCCAAGACTTGGCAGAGCTTGGGGCACTCTAC
TCGGACCAATACCGAAACATGGAGGGCCCCGACAATAGAAGCTTGATGGTTTGAATCTTCAAGC
TCCAGTACTAGAGTCAATTCGAGGTACCTTCAAGCTCTGTCATGCAAAAATACAAAACTAAGGCA
ATATGTCATGACTAGGATGGCAATGAAGAAACAATATGATGATTCTGAATCTTCAGTACTTCATTTA
TCAACGTTTTGTCTAGCATGTGCCTATACATGGGTTTTGCTTAGTCAAACTCAAGAAGCTAAAGAA
GATAAGACAAGACTCATATTTCCGGTGGACTGCAGATCTCGCCTAGACCCTCCTATACCTGCAAC
ATATTTTGGTAACTGCATAGCAGGCCGTTTTGGCAATTGCAGAAACAAAAGGGCTATTGGGAGAAG
ATGGATTGGTTGTGGCTGTGAATGCAATCATTGAAGCTATAAAAAGTTTGGATTATGGAGTCTTGA
ATGGGGCAGAGAATTGGGTTTCAAGATTGTGCACTGTGCTGAGTGATAGAGTAGCTTCAGTTGCT
GGCTCACATCGGTTTTGGTGTATGAACTGACTTTGGGTGGGGAATACCCAAGAAAGTTGATCT
TGTTTTCTATAGATAGGACAGGAGCAATCTCCCTTTCAGATACCAATAATGGTGACAGAGGTTTGA
TGTTGGATTGTTTTACAAAACATTATATAGATGTTTTTGCATCACAATTTGCCAAAGGCCTTGAA
AACCTTTGA

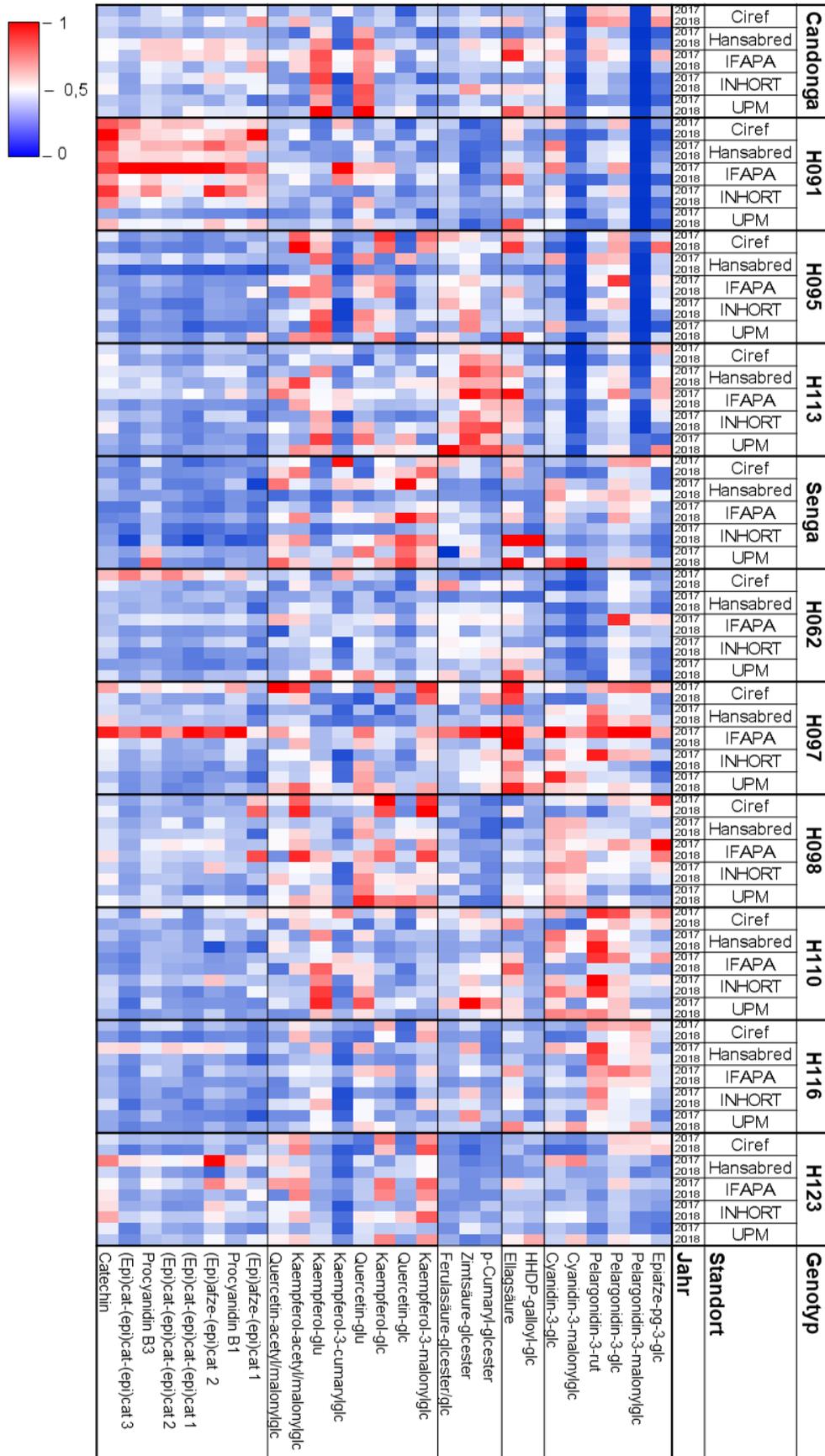
Nucleotid-Sequenz FaMATS1

ATGGCACATCCAAACTCACTTGTAATGTGGTGGAAAGTTTGCAGGGTCGCTCCAAACCCAGGCTC
ACCAGACTCAGCCACACCAGATTTCCCTTCTCTAACCTTGTTTGATATACGTTGGTTAAGGTTTGC
ACCGGTGCAGCGCCTGTACTTCTATGAAATATTTTCCACTGATTCCATAGTCCCCAAACTCAAAGC
CTCCCTCTCTCTCACACTCCAACACTTTCTGCCCTTGCTGGAAACCTCACTTGGCCCCAAGACT
CCCCAAACCCATTCTCCATTATGCCAAAGGTGACACCATTTCACTTACTGTAGCTGAATCCACTG
CTGATTTTGGCCATCTTTCAAGCAATTACGACTTGCTTGAAGTCCAAGAATACCATCCTCTTGAC
CTCAATTGGAAGCATCTCATGATCGATCTGCAGTAATGGCATTGCAAGTACCGTCTTCCCCAAC
AGAGGCTTACCATTGGAACATCGATGCACCATGCTGTTTTGGATGGTAAAACCTTCAACCTCCTTC
CTTAAGTCATGGGCTCACATATGCAAACATGAAGAACCGGGATCTTCATCTAGTTTGTGTTACCA
GATGAGCTAAAGCCATTTTATGACAGAACGGTCATCCAAGACTTGGCAGAGCTTGGGGCACTCTA
CTCGGACCAATACCGAAACATGGAGGGCCCCGACAATAGAAGCTTGATGGTTTGAATCTTCAAG
CTCCACTAGAGTCAATTCGAGGTACCTTCAAGCTCTGTCATGCAAAAATACAAAACTAAGGCAAT
ATGTCATGACTAGGATGGCAATGAAGAAACAATATGATGATTCTGAATCTTCAGTACTTCATTTATC
AACGTTTTGTCTAGGATGTGCCTATACATGGGTTTTGCTTAGTCAAACTCAAGAAGCTAAAGAAGA

TAAGACAAGACTCATATTTCCGGTGGACTGCAGATCTCGCCTAGACCCTCCTATACCTGCAACAT
ATTTTGGTAACTGCATAGCAGGCCGTTTGGCAATTGCAGAAACAAAAGGGCTATTGGGAGAAGAT
GGATTGGTTGTGGCTGTGAATGCAATCATTGAAGCTATAAAAAGTTTGGATTATGGAGTCTTGAAT
GGGGCAGAGAATTGGGTTTCAAGATTGTGCACTGTGCTGAGTGATAGAGTAGCTTCAGTTGCTG
GCTCACATCGGTTTGGTGTATGAACTGACTTTGGGTGGGGAATACCCAAGAAAGTTGATCTT
GTTTCTATAGATAGGACAGGAGCAATCTCCCTTTCAGATACCAATAATGGTGACAGAGGTTTGGAT
GTTGGATTGGTTTTACAAAACATTATATAGATGTTTTTGCATCACAATTTGCCAAAGGCCTTGAAA
ACCTTTGA

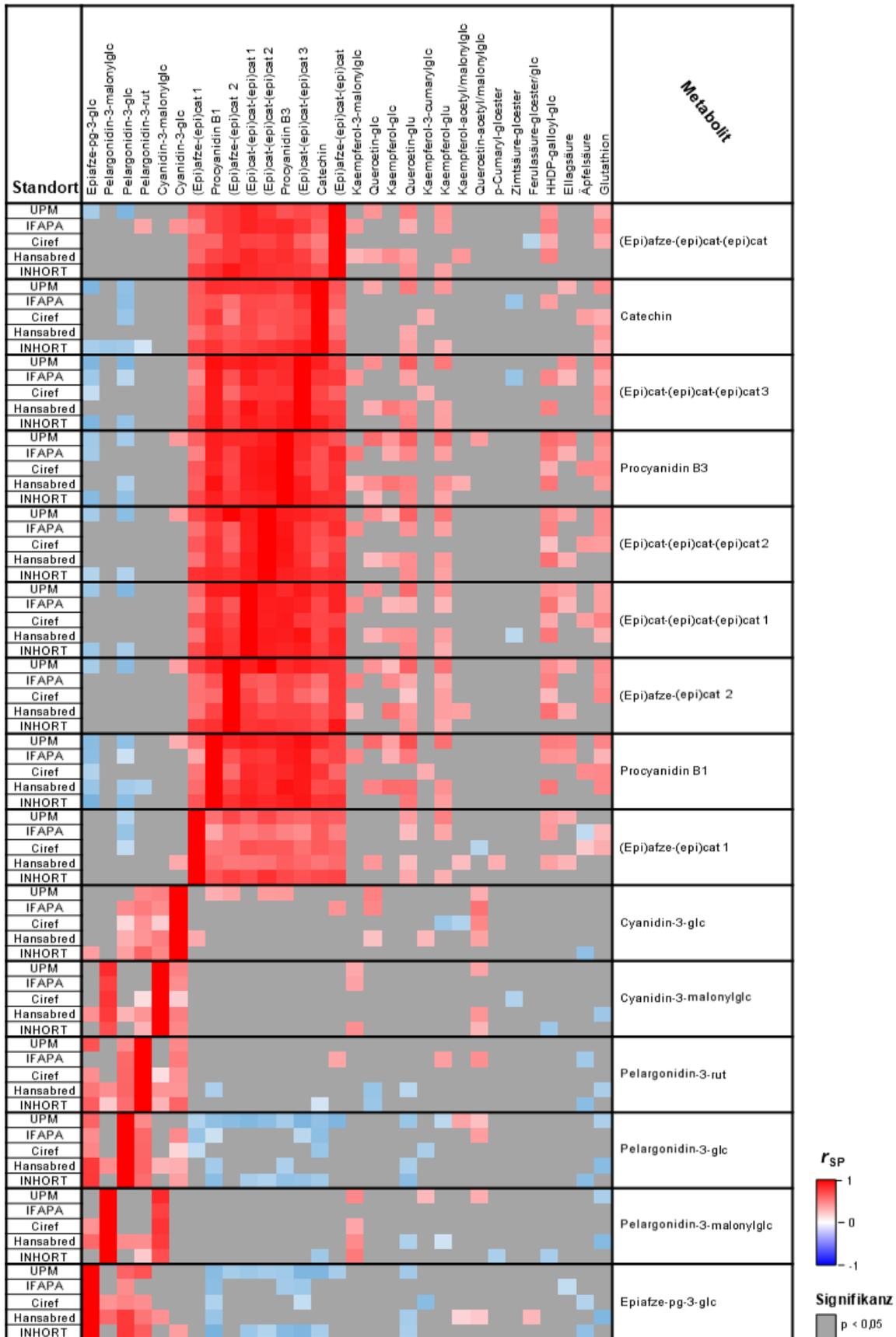
Nucleotid-Sequenz FaMATC4

ATGGAGCAACCAAGCTCGGTGAACTGGTGGAGATTTGCAGGGTGGCTCCAAAACCAGGGGCAC
AAGTAGATCTGTTGTCCCTTCTCCTCACCTACTTTGACTCGCTCTGGCTAAGGTTCCCACCCGTAC
AACGCCTTTACTTCTATGAATCAACATCTTCTTCTTCCACTACTACTACCGATTCTCTACTTGCCTA
TCTCAAACCTCACTCTCTCTCACTCTCAAACACTTCGGACCTCTCGCCGAAACCTAACTTGGC
CTCAGGACTCCCCAGACCCGTTCTCAGCTATGTCTGAAGGCGACGCGTTTTCGCTCACAGTAGC
CGAATCGACCGATGCTGATAATTCGACCACCTTTCGAGCAACAGCGTCTTTGTCTGAATCCAGAG
CTTACCATCCACTTGTTCCCAATTGGAGTCGTCTCACGAACGAGCTGCAGCCATTGCCTTGCAA
ATAACCCTATTTCTGGCCGTGGCTTTGCCATTGGAACAGCCATGCACCATGCCATCCTTGACGG
CAAAACATCAATCTCGTTTGTAAAGTCGTGGGCTCATGCATGCAGCAAACAAGTCGAAAATGGCG
TGTCCGATATTGGATCAGATGTCTCGTTACCGGAGAAGTTGAAGCCGTTATATGACAGAACGGTC
ATCCATGACTGGACTGGGCTCGGACTCGAATCCATCTACTTGAACGAATGGCAAACATGGATGG
CCCCAACACAGAAGCCTAAAGATTTGGGAGTTGAAAGCTCCACCAGATGACTCAGTTCGAGGCA
TCTTTGAGTTCACACGCGCAAATATACAAACCCTAAGGCAGATGGTAGTAGAAAAAGTTTCTGATC
TTCATTTGTCAACGTTTTCTCTAGTGTGTGCTTATACTTGGGTTTGTTTAGTCAAGGCACAAGAAGT
AGACGCCGAAAAACTTCATATCAGGTATTTAGTGTGGACTGTAGGTCTCGCTTGGACCCTCCGG
TACCGGAAAACTATTTCCGGAACTGCACGAGGGGTGTGCCGGTGTTCAGAGGCAAATGAGTT
ATTGGGTGAAGATGGGTTGGTCGTGGCGGTCACAGCAATTAGTGAAGCTATAAAGGGTTTGGAC
AAGAATGGGGTTTTGAAGGGGGCCGACGAGGTTTACGTTTCGAAAGTCAAGGACTATTTTGGGG
TTGAGGGATTCTATTCTACTGCTGGTTCTCACCGATTTTCAGATATATGATACCGACTTCGGATGGG
GTAGGCCGACGAAAGTTGAGGTGGTTTCTATAGATAGGACCCGAGCATTTCAGTGTCCGATTCC
AAGAATGGTGGTGGAGGTGTAGAGGTCCGGGTGGTTCTGAAGAAACATGTTATGGAGGCTTTTG
CTTCTCTATTTGCTAAAGGTTTTGGAAAACACTGA



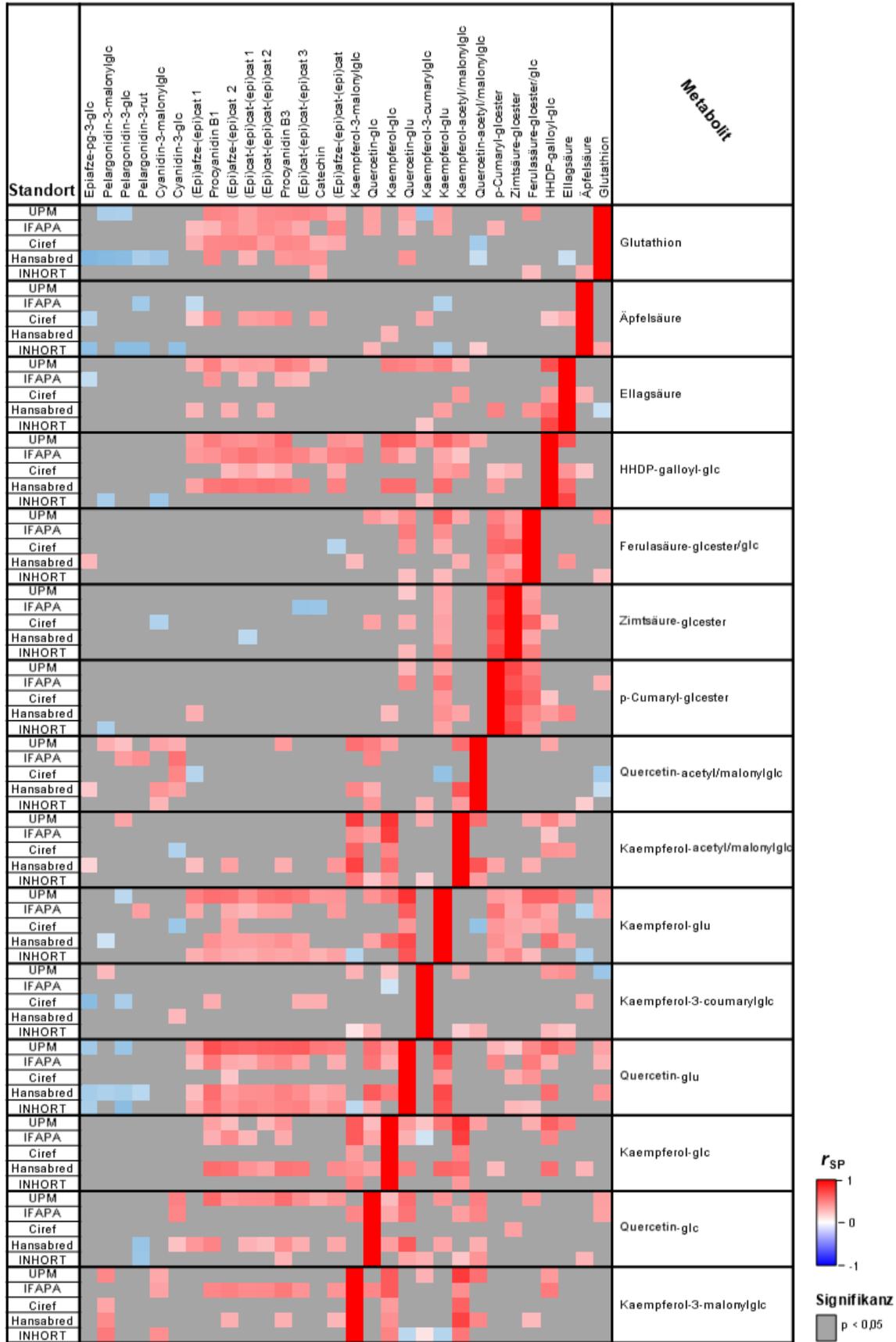
Anhang Abbildung 4: Heatmap der Metabolitengehalte der GoodBerry-Kreuzungspopulation (Datenset 17/18); dargestellt werden die relativen Konzentrationen der einzelnen Metaboliten pro Erntejahr und Standort; 1: höchste gemessene Konzentration des Metaboliten im Datenset, 0,5: 50 % der höchsten gemessenen Konzentration, 0: 0 % der höchsten gemessenen Konzentration.

6.Anhang



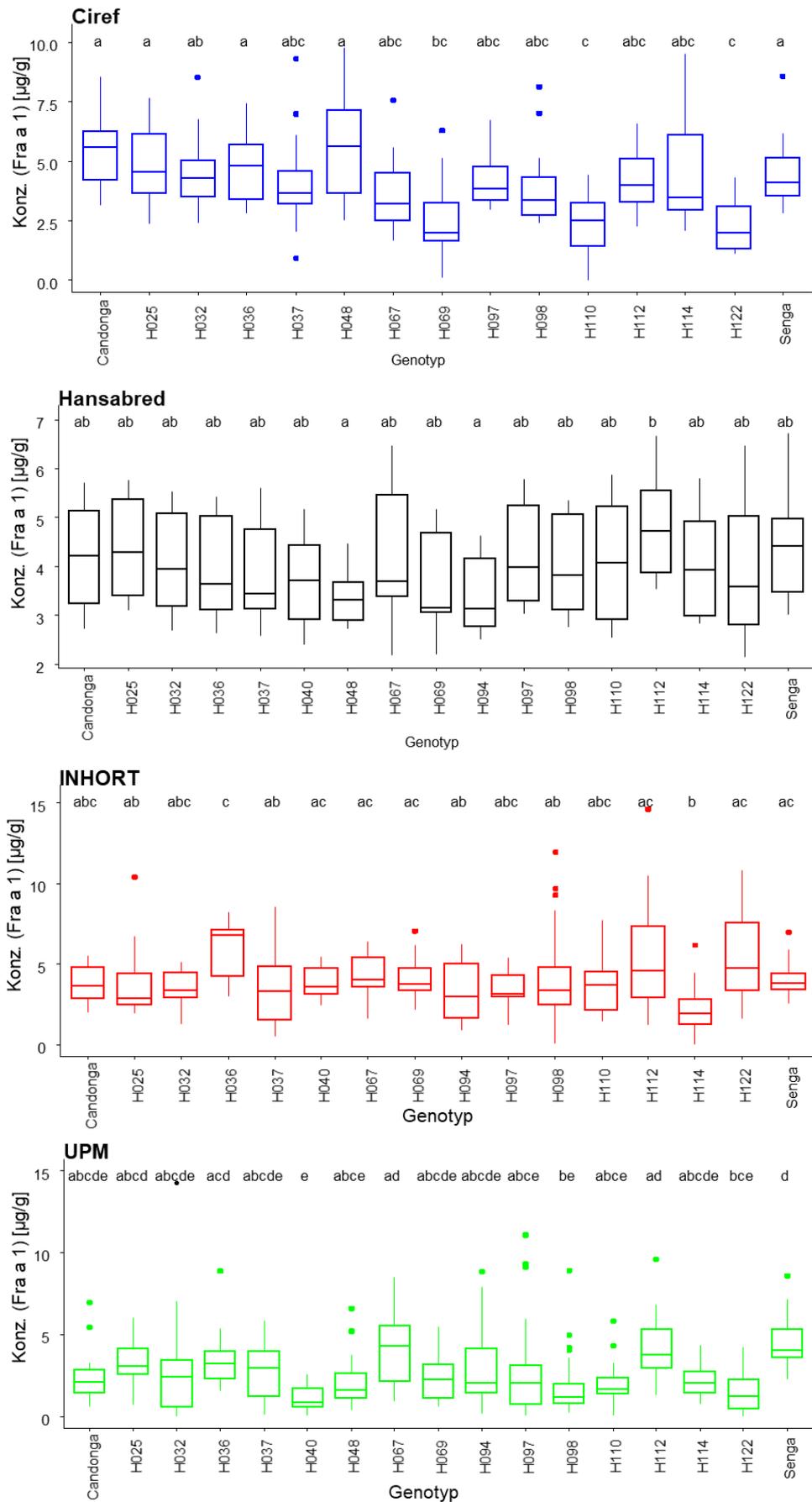
Anhang Abbildung 5: Heatmap der Spearman-Korrelation der Metabolitenkonzentrationen ausgewählter Proben der GoodBerry-Population im Erntejahr 2018 (Datenset 18) getrennt nach Standort (Teil 1); dargestellt werden die Korrelationskoeffizienten (r_{SP}), rot: positive Korrelation, blau: negative Korrelation, grau: keine signifikante Korrelation ($p \leq 0,05$).

6.Anhang

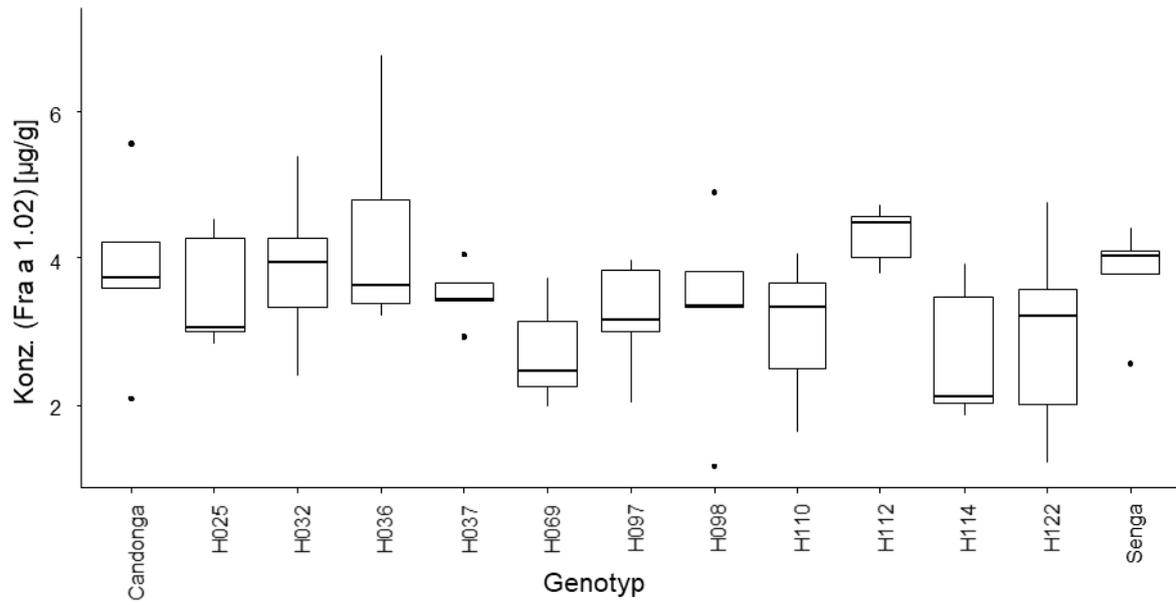


Anhang Abbildung 6: Heatmap der Spearman-Korrelation der Metabolitenkonzentrationen ausgewählter Proben der GoodBerry-Population im Erntejahr 2018 (Datenset 18) getrennt nach Standort (Teil 2); dargestellt werden die Korrelationskoeffizienten (r_{SP}), rot: positive Korrelation, blau: negative Korrelation, grau: keine signifikante Korrelation ($p \leq 0,05$).

6.Anhang



Anhang Abbildung 7: Allergengehalte (Fra a 1) ausgewählter Genotypen der GoodBerry-Population an den einzelnen Standorten im Erntejahr 2018: (Datenset 18) – Buchstaben (a-e) symbolisieren signifikante Unterschiede (Dunn-Bonferroni-Test, $p \leq 0,05$)



Anhang Abbildung 8: Allergengehalte (Fra a 1) ausgewählter Genotypen der GoodBerry-Population über alle Standorte: (Datenset 18) – keine signifikanten Unterschiede (Dunn-Bonferroni-Test, $p \leq 0,05$)

Anlage (CD)

Tabellen der Rohdaten

- **Französische Kreuzungspopulation** (*Metabolic Profiling*)
- **GoodBerry-Kreuzungspopulation** (*Metabolic Profiling, Allergengehalte*)
- **siFLS-Pflanzen** (*Metabolic Profiling*)
- **siFra a 1.02-Pflanzen** (*Metabolic Profiling*)
- **Spanische siFra a 1.02-Früchte** (*Metabolic Profiling, ungerichtete Analyse*)